

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**COMPLEXO *Pestalotioid* ASSOCIADO A DOENÇAS EM
MANGUEIRAS E GOIABEIRAS: ABORDAGEM
FILOGENÉTICA E PATOGÊNICA**

Larissa Nogueira de Souza
Engenheira Agrônoma

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**COMPLEXO *Pestalotioid* ASSOCIADO A DOENÇAS EM
MANGUEIRAS E GOIABEIRAS: ABORDAGEM
FILOGENÉTICA E PATOGÊNICA**

Larissa Nogueira de Souza

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Goes

Coorientadora: Dra. Andressa de Souza Pollo

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Produção Vegetal).

2017

Ficha catalográfica

S729c Souza, Larissa Nogueira de
Complexo *Pestalotioid* associado a doenças em mangueiras e
goiabeiras: abordagem filogenética e patogênica / Larissa Nogueira
de Souza. -- Jaboticabal, 2017
iii, 52 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientador: Antonio de Goes
Coorientadora: Andressa de Souza Pollo
Banca examinadora: Daniel Rufino Amaral, Rita de Cássia Panizzi
Costa Aguiar Alves
Bibliografia

1. ITS e TEF1 2. *Mangifera indica*. 3. *Psidium guajava*. 3. Teste
de patogenicidade. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.4: 634.4

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: COMPLEXO *Pestalotioid* ASSOCIADO A DOENÇAS EM MANGUEIRAS E
GOIABEIRAS: ABORDAGEM FILOGENÉTICA E PATOGÊNICA

AUTORA: LARISSA NOGUEIRA DE SOUZA

ORIENTADOR: ANTONIO DE GÓES

COORIENTADORA: ANDRESSA DE SOUZA POLLO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA
(PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:

Andressa de Souza Pollo

Pesquisadora Dra. ANDRESSA DE SOUZA POLLO
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Daniel R. Amaral

Prof. Dr. DANIEL RUFINO AMARAL
Instituto Federal do Triângulo Mineiro / Uberaba/MG

Rita de Cássia Panizzi

Profa. Dra. RITA DE CÁSSIA PANIZZI
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 24 de fevereiro de 2017.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Larissa Nogueira de Souza – Natural de Frutal-MG, nascida em 23 de julho de 1991, filha de Luisa Helena de Souza. cursou Ensino Médio concomitantemente com o curso Técnico em Agricultura e Zootecnia no Centro Federal de Educação Tecnológica de Uberaba-MG, tendo finalizado no ano de 2008. Ingressou no Ensino Superior no ano de 2009, no curso de Engenharia Agrônoma, no Instituto Federal do Triângulo Mineiro – Câmpus de Uberaba, obtendo o título de Engenheira Agrônoma, em fevereiro de 2014, com Trabalho de Conclusão de Curso realizado sob orientação do Prof. Dr. Daniel Rufino Amaral, intitulado “Controle da ferrugem asiática da soja com diferentes épocas de aplicação de fungicidas e linhagens convencionais”. Durante o curso, foi bolsista voluntária de iniciação científica em 2009, e bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais-FAPEMIG, nos anos de 2010 a 2014, área de atuação em fitopatologia. Participou como rondonista na equipe de agricultura e meio ambiente, no projeto Rondon, no ano de 2013, Operação Canudos. Em março de 2015, ingressou no curso de mestrado em Agronomia, no Programa de Produção Vegetal da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Antonio de Goes e coorientação da Dra. Andressa de Souza Pollo. Durante o curso de mestrado, foi bolsista da Capes e desenvolveu o projeto de dissertação na área de fitopatologia.

"Com Jesus o jugo é suave e o fardo é leve"

(Mateus 11:28-30).

Oração Nossa:

Senhor, ensina-nos a orar sem esquecer o trabalho, a dar sem olhar a quem, a servir sem perguntar até quando, a sofrer sem magoar seja a quem for, a progredir sem perder a simplicidade, a semear o bem sem pensar nos resultados, a desculpar sem condições, a marchar para a frente sem contar os obstáculos, a ver sem malícia, a escutar sem corromper os assuntos, a falar sem ferir, a compreender o próximo sem exigir entendimento, a respeitar os semelhantes sem reclamar consideração, a dar o melhor de nós, além da execução do próprio dever sem cobrar taxas de reconhecimento. Senhor, fortalece em nós a paciência para com as dificuldades dos outros, assim como precisamos da paciência dos outros para com as nossas próprias dificuldades. Ajuda-nos para que a ninguém façamos aquilo que não desejamos para nós. Auxilia-nos sobretudo a reconhecer que a nossa felicidade mais alta será invariavelmente aquela de cumprir os desígnios, onde e como queiras, hoje, agora e sempre.

(Emmanuel, Mensagem psicografada por Chico Xavier).

Somos detentores de um pseudoconhecimento, pois a vida é um incessante aprendizado, por isso o apóstolo Paulo nos disse: "Em tudo, dai graças, porque esta é a vontade de Deus em Jesus Cristo para convosco".

(1-Tessalonicenses, 5:18).

A Ciência contribui com o desvendar da grandeza de Deus e a sua infinita perfeição, pois ao estudar seres quase imperceptíveis a olho nu, os fungos mostram-se de grande complexidade, além de contribuírem para dinâmica da vida, e, assim, percebe-se quão intensa a sabedoria divina.

(Larissa Nogueira de Souza)

Dedico,

Agradeço a Deus, por permitir e sustentar a minha caminhada, e à espiritualidade amiga, por ajudar a cumprir a vontade de Deus;

A minha mãe Luisa Helena de Souza, pelo suporte imprescindível ao longo desta jornada, com seus incentivos constantes e um carinho mais que especial.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Jesus e toda a espiritualidade amiga, na qual essa caminhada não aconteceria sem sua permissão e auxílio, com fortalecimento através das preces em momentos de fraquezas e incertezas.

Aos meus familiares e em especial minha mãe Luisa, sempre presente em todos os momentos, amparando-me e motivando-me; avó 'Paixão' e tia 'Maria', *in memoriam*, são os meus exemplos de garra, determinação e superação.

À Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, e ao Programa de Produção Vegetal, por propiciar-me a oportunidade de adquirir novos conhecimentos e, sobretudo, de tornar-me mais preparada para a vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa.

Ao orientador Prof. Dr. Antonio de Goes, pela paciência, confiança, compreensão, ensinamentos e colaboração em minha formação.

À coorientadora Dra. Andressa de Souza Pollo, pela colaboração em todo o trabalho, disponibilidade e por proporcionar imenso aprendizado.

À Profa. Dra. Rita de Cássia Panizzi pela paciência e ajuda em diversas ocasiões.

Aos integrantes do Departamento de Fitossanidade, em especial à equipe do Laboratório de Nematologia, pelos empréstimos de equipamentos e pela colaboração.

Ao Laboratório de Fitopatologia e ao Laboratório de Epidemiologia Molecular, que possibilitaram a execução deste trabalho.

Aos integrantes do laboratório de Fitopatologia, Profa. Dra. Margarete, Luiz, Rosângela, Wanderley, Danilo, Eduardo, Fernanda, Guilherme, Ivan, João, Luiz, Marcos, Matheus e Olavo, pela convivência diária e por diversas contribuições e auxílio. À Roberta, pela colaboração em várias situações.

Aos funcionários da Seção Técnica de Pós-Graduação, Biblioteca e Seção Técnica de Saúde (Unamos), em especial à Fernanda, pela orientação e aporte.

Ao Prof. Dr. José Carlos Barbosa e Walter Maldonado Jr., pela ajuda com as análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Daniel Rufino Amaral, pelos ensinamentos e oportunidades fornecidas durante a graduação. Obrigada pela confiança, incentivo e amizade.

Ao Ovídio, pelo subsídio profissional ofertado na área da saúde.

Aos produtores de manga e goiaba da microrregião de Jaboticabal, por terem fornecido as amostras de campo.

Aos membros da banca examinadora da qualificação e da defesa e dissertação, pela disponibilidade e generosas contribuições.

Aos meus amigos, pelo apoio, incentivo, carinho, auxílio nas dificuldades e cooperação na tarefa, e por momentos bons que passamos juntos: Aline, Constanza, Daniele, Elizabeth, Gilmar Jr., Gustavo, Jeane Dayse, Kleber, Luan, Mariana, Nadia, Nicolas, Renato, Roberta Vidal e Tassio. Em especial, Edgard Henrique, pela imensa ajuda e contribuição, Adão Felipe, Jordana, Stefany e Taynara eu agradeço-lhes notadamente por tornarem os dias mais difíceis, em mais suaves, por todo o apoio e companheirismo.

Externo meu agradecimento a todos os que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, tanto quanto para meu aprimoramento pessoal e profissional, mas que, pela minha fragilidade humana de esquecimento, não mencionei.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Doenças fúngicas de mangueiras e goiabeiras	4
2.1.1 Complexo <i>Pestalotioid</i>	6
2.1.1.1 Histórico	6
2.1.1.2 Aspectos Gerais.....	8
2.1.1.3 Caracterização molecular do complexo <i>Pestalotioid</i>	9
2.1.1.4 Teste de patogenicidade.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Coleta e descrição do material biológico	11
3.2 Isolamento	14
3.3 Caracterização molecular dos isolados	15
3.3.1 Extração de DNA	15
3.3.2 Sequenciamento	16
3.3.3 Análises filogenéticas	17
3.4 Testes de patogenicidade	17
3.5 Metodologia de avaliação	19
3.6 Delineamento experimental.....	19
4 RESULTADOS	21
4.1 Isolamento	21
4.2 Sequenciamento gênico	22
4.3 Teste de patogenicidade dos isolados obtidos de goiabeiras	28
4.4 Teste de patogenicidade dos isolados obtidos de mangueiras	36
5 DISCUSSÃO.....	39
6 CONCLUSÕES.....	44
7 REFERÊNCIAS	45

COMPLEXO *Pestalotioid* ASSOCIADO A DOENÇAS EM MANGUEIRAS E GOIABEIRAS: ABORDAGEM FILOGENÉTICA E PATOGÊNICA

RESUMO – O clima tropical brasileiro propicia o desenvolvimento de inúmeras doenças fúngicas nas culturas produzidas, incluindo as fruteiras tropicais. O Brasil é um grande produtor de frutas, incluindo goiaba e manga, que são inclusive exportadas para outros países. Além das doenças conhecidas que incidem sobre essas culturas, sintomas atípicos têm sido observados em condições de campo, sem relação específica com patógenos já identificados. Assim, este trabalho teve por objetivo isolar fungos de tecidos lesionados de frutos, folhas e ramos de goiabeiras, assim como de folhas de mangueiras para estabelecer suas relações parasitárias e identificá-los molecularmente. Foram obtidos 25 isolados de goiabeiras de três municípios e dois isolados de mangueiras de um município do Estado de São Paulo. Os isolados tiveram sua região ITS rDNA (*Internal Transcribed Spacer*) e a região parcial do gene TEF1 (*translation elongation factor 1-alpha*) sequenciadas, o que proporcionou a identificação acurada dos isolados, em gênero. Os isolados de goiabeiras foram identificados como *Neopestalotiopsis* spp., sendo esse o primeiro relato em goiabeiras, e os isolados de mangueiras foram agrupados juntamente com as espécies *Pseudopestalotiopsis theae* e *Pestalotiopsis trachicarpicola*, sendo este também o primeiro relato dessas espécies em mangueiras. Os isolados de goiabeiras e de mangueiras foram inoculados em folhas destacadas de goiabeira ‘Paluma’, em condições de laboratório, com fermento e sem fermento. Em adição, os isolados oriundos de mangueiras foram inoculados em folhas destacadas de mangueiras ‘Tommy Atkins’. Os isolados causaram sintomas característicos daqueles dos quais provieram, sendo com maior severidade quando em folhas previamente feridas. No entanto, os isolados de *Neopestalotiopsis* spp. também foram capazes de ocasionar sintomas em folhas intactas. Concluiu-se que novos gêneros de fungos estão associados a lesões em mangueiras e goiabeiras no Brasil, os quais apresentam falta de especificidade de tecidos e hospedeiros, representando novo risco à sanidade das plantas.

Palavras-chave: ITS e TEF1, *Mangifera indica*, *Psidium guajava*, teste de patogenicidade

***Pestalotioid* COMPLEX ASSOCIATED TO MANGO AND GUAVA
DISEASES: PHYLOGENETIC AND PATHOGENIC APPROACH**

ABSTRACT – The Brazilian tropical climate promotes the development of numerous fungal diseases in the crops produced in the country, including tropical fruit crops. Brazil is a major producer of fruits, including guava and mango, which are even exported to other countries. Besides the known diseases that affect these crops, atypical symptoms have been observed under field conditions, with no specific relation to pathogens already identified. Thus, this work aimed to isolate fungi from such lesions of fruits, leaves and branches of guava plants, as well as from leaves of mango plants to identify them molecularly and prove their symptomatic association with such crops. We obtained 25 isolates from guava plants located in three municipalities and two isolates from mango plants located in one municipality of São Paulo state. These isolates were submitted to sequencing of ITS rDNA region (Internal Transcribed Spacer) and the partial TEF1 gene (translation elongation factor 1-alpha), which provided the accurate identification of the isolates in genus. The isolates from guava plants were identified as *Neopestalotiopsis* spp. It is the first report of this genus in guava. Moreover, the isolates from mango plants were grouped with the species *Pseudopestalotiopsis theae* and *Pestalotiopsis trachicarpicola*. It is also the first report of these species in mango trees. Guava and mango isolates were inoculated on 'Paluma' guava leaves under laboratory conditions, with injury and without injury. In addition, the isolates from mango plants were inoculated on detached leaves of 'Tommy Atkins' mango. The isolates were able to cause symptoms similar to those from which they came in greater severity in wounded leaves. However, the isolates of *Neopestalotiopsis* spp. were also capable of causing symptoms on intact leaves. Thus, it was concluded that new genotypes of fungi are associated with lesions in mango and guava plants in Brazil, which present lack of tissue and host specificity, representing a new risk to the orchards sanity.

Keywords: ITS e TEF1, *Mangifera indica*, Pathogenicity test, *Psidium guajava*,

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a área de cultivo de frutas é de aproximadamente 2,2 milhões de hectares, onde são produzidas 43,6 milhões de toneladas, sendo considerado como terceiro maior produtor mundial de frutas (AGRIANUAL, 2016). O País exporta cerca de 673 mil toneladas de frutas frescas, sendo 70% destinadas à União Europeia. As exportações de frutas pelo Brasil geram um faturamento de 636 milhões de dólares (BRAZILIAN FRUIT, 2017). Dentre as frutas mundialmente consumidas e produzidas pelo Brasil, destacam-se a manga (*Mangifera indica* L.) e a goiaba (*Psidium guajava* L.). Em 2013, o Brasil produziu 1,163 milhão de toneladas de manga e 349,6 mil toneladas de goiaba. Desse total, o Estado de São Paulo foi responsável pela produção de 18,42% de manga e 39,49% de goiaba (AGRIANUAL, 2016).

O clima tropical brasileiro propicia a produção de frutas, mas também favorece o desenvolvimento de doenças fúngicas, que afetam diretamente a produção e a qualidade destas, tanto na fase de pré, quanto na de pós-colheita.

Nos últimos anos, produtores de goiabas do Estado de São Paulo têm verificado sintomas atípicos em frutos, folhas e ramos, em todas as variedades, especialmente em Paluma, Pedro Sato e Tailandesa. Os sintomas caracterizam-se pela presença de manchas foliares marrons/acinzentadas, necrose em ramos e lesões em frutos, inicialmente pequenas, deprimidas, castanhas e com bordas escuras, que aumentam de tamanho e tornam-se avermelhadas. Os prejuízos causados têm sido muito elevados. Em mangueiras, de forma semelhante e simultaneamente, observaram-se lesões de cor castanha/acinzentada em folhas, que aumentam de tamanho e número, ocupando quase toda a área fotossintetizante.

No caso de goiabeiras, os sintomas descritos assemelham-se àqueles relatados no Hawaii (KEITH; VELASQUEZ; ZEE, 2006; KEITH; ZEE, 2010), enquanto os de mangueira, às descrições feitas na Itália (ISMAIL; CIRVILERI; POLIZZI, 2013) e na China (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2013b). Nesses países, a literatura aponta como agente causal fungos do gênero *Pestalotiopsis*.

Fungos do gênero *Pestalotiopsis* são comuns em regiões tropicais e subtropicais, sendo citados como patógenos em ampla gama de hospedeiros, nos

quais reduzem a produção e geram perdas econômicas (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2011).

No Brasil, *Pestalotiopsis psidii* (Pat.) Venk. foi descrita como agente responsável por podridão seca do caule em mudas de goiabeira, no Ceará (CARDOSO et al., 2002), e, também, causando lesões em frutos de goiaba na fase de pós-colheita (FISCHER et al., 2011). *Pestalotiopsis mangiferae*, por outro lado, é citada em mangueira, causando podridão em frutos na fase de pós-colheita (BATISTA; BARBOSA, 2008). Entretanto, tais patógenos foram mencionados como sendo de importância secundária e a identificação destes foi realizada apenas com base em características morfológicas, uma variável contestada pela baixa confiabilidade.

Comumente, a taxonomia dos patógenos associados às plantas era feita com base nas características morfoculturais, faixas de hospedeiros, e aos tipos de sintomas produzidos. Entretanto, em decorrência das confusões e equívocos, além das dificuldades intrínsecas, considera-se mais apropriado o emprego de técnicas clássicas, em conjunto com modernas tecnologias, com ênfase aos estudos moleculares. A identificação molecular por ser mais sensível e específica, mostra-se mais eficiente e com maior idoneidade na taxonomia (CROUS; HAWKSWORTH; WINGFIELD, 2015).

A identificação de gêneros e de espécies de *Pestalotiopsis* tem sido revista com base no sequenciamento da região ITS e genes codificadores da β -tubulina (TUB) e fator de alongação 1- α (TEF1), assim como pela combinação destes resultados com dados morfoculturais (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2012; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014). A recente revisão do gênero *Pestalotiopsis* possibilitou a inserção de dois novos gêneros: *Neopestalotiopsis* e *Pseudopestalotiopsis*. O complexo destes gêneros passou a ser denominado *Pestalotioid*, cuja importância tem sido reavaliada devido aos danos ocasionados nas culturas pelas espécies desse complexo (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2016).

O diagnóstico correto dos agentes causais das doenças, decorrentes do complexo *Pestalotioid*, contribui diretamente para a elaboração de medidas de controle mais eficientes (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2017) e para o manejo

da cultura. Neste contexto, a determinação dos possíveis agentes causais, associados às doenças em mangueira e goiabeira no Brasil, constitui-se em grande prioridade e de relevância científica e técnica, para garantir a sanidade e a sustentabilidade dos polos produtivos de manga e de goiaba.

O objetivo desse estudo foi isolar, identificar molecularmente, avaliar a patogenicidade e completar o postulado de Koch, dos gêneros e de espécies de fungos associados aos sintomas atípicos em goiabeiras e mangueiras daqueles descritos na literatura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doenças fúngicas de mangueiras e goiabeiras

Uma série de doenças fúngicas já foram descritas, ocorrendo em mangueiras e goiabeiras. Em ambas as fruteiras, indistintamente, a antracnose, causada por fungos do gênero *Colletotrichum*, é uma das doenças mais importantes, ocasionando perdas de produção e depreciação dos frutos (PLOETZ, 2003).

Em mangueiras, são descritas várias doenças de importância econômica, com destaque para oídio (*Pseudoidium anacardii*), a malformação floral ou cacho branco (resultante do complexo *Fusarium* e ácaros) e alguns outros patógenos, normalmente associados a manchas ou a podridões nos frutos, como *Rhizopus stolonifer*, *Hendersonia crebemma*, *Elsinoe indica*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora palmivora*, *Verticillium albo-atrum*, *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria alternata* e *Denticularia mangiferae*, dentre outros (PRUSKY et al., 1997; PLOETZ, 2003; NISHIYAMA, 2009).

Em goiabeiras, destacam-se as doenças ocasionadas pelos fungos *Puccinia psidii*, agente causal da ferrugem, cuja doença é de considerável importância; *Phytophthora* spp., que causa podridão do fruto; e *Rhizoctonia solani*, *Myxosporium psidii* e outros, são comparativamente de menor importância. Além destes, várias espécies de fungos estão associadas a doenças em pós-colheita (PLOETZ, 2003).

Em goiabeiras, sintomas atípicos de antracnose, em frutos, como lesões pequenas com coloração vermelha a púrpura, têm sido associados a fungos do gênero *Mycosphaerella* (JACOBS; TRUTER; SCHOEMAN, 2014) e a *Phyllosticta capitalensis* (WICKERT et al., 2014). Ademais, outros autores relataram sintomas semelhantes, em folhas e nos frutos, atribuindo a *Pestalotiopsis psidii*, *P. microspora*, *P. clavispora*, *P. neglecta*, *P. versigulate* e *Pestalotiosis* spp., como agentes causais (KEITH; VELASQUEZ; ZEE, 2006; KEITH; ZEE, 2010; EL-ARGAWY, 2015). Entretanto, em várias destas situações, embora a recuperação de *Colletotrichum* nas lesões tenha sido muito frequente, tem-se atribuído a outros patógenos ainda não identificados, porém relacionados ao complexo *Pestalotioid* (MISRA, 2004; JACOBS et al., 2014).

A espécie *P. psidii* (Pat.) Venk. (sin. *Pestalotia psidii*), inclusive, já foi associada a mancha e podridão em fruto de goiaba, porém como de importância secundária (VENTURA; COSTA, 2003; COLLETTI et al., 2014).

Os fungos *Pestalotioid* representam um complexo de fungos que abrangem vários gêneros com similaridade morfológica a *Pestalotiopsis*. Fungos do complexo *Pestalotioid* encontram-se associados a diversas doenças em mangueira e goiabeira, às vezes com prejuízos econômicos à cultura, ocasionando manchas foliares, lesões nos frutos e podridões em pós-colheita (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2016).

Em mangueiras, os fungos do complexo *Pestalotioid* encontram-se associados à podridão-do-pedúnculo, danos em pós-colheita e outras doenças. As espécies *Pestalotiopsis* spp., *P. mangiferae*, encontram-se associadas a manchas foliares (KO et al., 2007) que, dependendo da incidência e da severidade, resultam em redução do crescimento vegetativo e produção de frutos, e, inclusive, em determinadas circunstâncias, até mesmo a morte de plantas (ISMAIL; CIRVILLERI; POLIZZI, 2013). Outras espécies do complexo *Pestalotioid*, tal como *Neopestalotiopsis egyptiaca*, também têm sido associadas a manchas foliares atípicas nas plantas (CROUS; HAWKSWORTH; WINGFIELD, 2015).

A espécie *P. mangifolia* (Guba) J. Xiang Zhang e T. Xu foi encontrada associadas à mancha foliar, *P. versicolor* (Speg.) Steyaert foi detectada em flores, *P. glandicola* (Castagne) Steyaert, em pós-colheita (ULLASA; RAWAL, 1989), e *P. mangiferae* (Henn.) Steyaert (sin., *Pestalotia mangiferae* Henn.), associada a manchas acinzentadas em tecidos foliares (SANTOS-FILHO; MATOS, 2004; MORDUE, 2007).

No Brasil, já foram descritas a ocorrência das espécies *Pestalotia dictaeta*, *Pestalotia mangifera* e *Pestalotia osyridis*, em mangueira, e as espécies *Pestalotiopsis psidii*, *Pestalotiopsis mangifolia* e *Pestalotiopsis microspora*, em goiabeira; já as espécies *Pestalotiopsis* sp., *Pestalotia* sp. e *Pestalotiopsis neglecta* foram relatadas em ambas as culturas (MENDES et al., 1998).

2.1.1 Complexo *Pestalotioid*

2.1.1.1 Histórico

O complexo de *Pestalotioid* é composto por fungos que possuem conídios semelhantes a *Pestalotiopsis*, com cinco células, células medianas pigmentadas e extremidades hialinas. O gênero *Pestalotiopsis* foi inserido por Steyaert (1949), que propôs alterações taxonômicas com base nas formas dos conídios. Três gêneros de fungos foram propostos, sendo: *Pestalotia*, *Pestalotiopsis* e *Truncatella*. Neste estudo, espécies que possuíam conídios com seis células foram mantidas no gênero *Pestalotia*, e os demais, em *Truncatella*. Posteriormente, o autor subdividiu o gênero *Pestalotiopsis*, agrupando as espécies com base no número de apêndices apicais e coloração das células medianas em “Versicolorous e Concolorous”. Porém, as alterações propostas por Steyaert não foram aceitas por Moreau (1949), Guba (1956, 1961) e Dube e Bilgrami (1965), advindo, posteriormente, nova classificação, proposta por Guba (1961), na qual se consideravam: o número de células, a cor das células medianas e a morfologia dos apêndices apical e basal. Desta forma, mediante esses critérios, foram descritas diferentes categorias e seções do gênero *Pestalotia*.

Novas evidências em apoio à divisão de *Pestalotia* surgiram e foram argumentadas por Sutton (1980). Nessa revisão do gênero, foi sustentada a realocação das espécies em *Pestalotia*, *Pestalotiopsis* e *Truncatella*. Entretanto, dificuldades, complexidade e conflitos técnicos na taxonomia de *Pestalotiopsis* foram reconhecidos.

Nag Raj (1985, 1993) foi convergente com a ideia da redistribuição das espécies de *Pestalotia* para outros gêneros; porém, segundo seu entendimento, o gênero *Pestalotiopsis* também teria englobar as espécies de conídio com três células.

Em 2003, Jeewon e colaboradores verificaram que apenas caracteres como pigmentação das células medianas e apêndices apicais seriam confiáveis para separar as espécies do gênero *Pestalotiopsis*, mas as análises moleculares devem ser associadas para obter a correta identificação das espécies.

Recentes revisões do gênero *Pestalotiopsis* têm sido realizadas mediante análises moleculares e morfológicas, as quais têm propiciado novas alterações taxonômicas (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2016).

LIU et al. (2010) discordaram de Jeewon et al. (2003) quanto aos critérios básicos de características morfológicas, utilizados na segregação das espécies de *Pestalotiopsis*, tais como a pigmentação das células medianas, uma vez que o uso de meio de cultura artificial pode resultar em diferenças do grau de pigmentação. Outros trabalhos também evidenciaram que as características morfológicas do conídio podem ser influenciadas pelo hospedeiro e pelo ambiente (HYDE et al., 2014). Outra dificuldade na segregação morfológica está relacionada às sutis diferenças fenotípicas entre as espécies, que geram equívocos taxonômicos. Assim, a melhor resolução de táxons irmãos é obtida mediante o sequenciamento de DNA (MARACHCHIKUMBURA et al., 2016).

A investigação do gênero, realizada por Maharachchikumbura et al. (2014), combinando dados morfológicos e moleculares nas observações de espécie-tipo e espécime-tipo, resultou na construção da filogenia de *Amphisphaeriaceae*, com alterações taxonômicas. Algumas espécies de *Pestalotiopsis* foram realocadas para dois novos gêneros, *Neopestalotiopsis* e *Pseudopestalotiopsis*, pertencendo à ordem *Xylariales*.

Com base em evidências morfológicas e filogenéticas, Crous, Hawksworth e Wingfield (2015) inseriram os gêneros *Pestalotiopsis*, *Neopestalotiopsis* e *Pseudopestalotiopsis* em uma nova família, a *Pestalotiopsidaceae* Maharachch. e K. D. Hyde, perfazendo a acomodação na subclasse *Xylariomycetidae* O. E. Erikss e Winka e ordem *Amphisphaeriales* D. Hawksw. e O. E. Erikss. A nova família *Pestalotiopsidaceae* acomoda os gêneros *Ciliochorella* Syd., *Neopestalotiopsis* Maharachch. et al., *Pestalotiopsis* Steyaert., *Pseudopestalotiopsis* Maharachch. et al., e *Seiridium* Nees (CROUS; HAWKSWORTH; WINGFIELD, 2015).

Maharachchikumbura et al. (2016) salientam a importância de estudos que abordam aspectos ecológicos dos fungos *Pestalotioid*, quanto à distribuição geográfica e à especificidade.

Embora a identificação fenotípica da maioria dos fungos *Pestalotioid* não seja a mais recomendada, algumas características morfológicas permitem classificá-los em gêneros (HYDE et al., 2014; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2016).

Segundo Maharachchikumbura et al. (2014), os gêneros podem ser distinguidos com base na morfologia do conídio, especificamente com relação à pigmentação das três células medianas. Os membros do gênero *Pestalotiopsis* distinguem-se dos demais por apresentarem conídios fusiformes, com cinco células, sendo as três células medianas concolor marrom-claras, com extremidade hialina. Por outro lado, *Pseudopestalotiopsis* possui células medianas “concolorous” marrom-escuras. Já *Neopestalotiopsis* apresenta conídios fusiformes, com cinco células, com células medianas “versicolorous” (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014; RUVISHIKA et al., 2015).

2.1.1.2 Aspectos Gerais

Os fungos de *Pestalotioid* eram considerados de importância secundária e iniciavam o processo infeccioso a partir de aberturas naturais e/ou de ferimentos ocasionados por insetos, pesticidas ou danos provocados pelo sol (HOPKINS; MCQUILKEN, 2000; AGRIOS, 2005). Entretanto, atualmente, esses fungos têm ocasionado significativas perdas econômicas em ampla gama de culturas (ÚRBEZ-TORRES et al., 2011; ARZANLOU et al., 2013; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014; JAYAWARDENE et al., 2015; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2016).

O complexo *Pestalotioid* engloba indivíduos saprofíticos, endofíticos e patogênicos (SURYANARAYANAN et al., 2011; XU et al., 2014), e são regularmente encontrados em ecossistemas tropicais e subtropicais (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2011). As condições favoráveis para o desenvolvimento das doenças causadas por *Pestalotioid* são alta precipitação e altas temperaturas (HOPKINS; MCQUILKEN, 2000; ELLIOTT, 2015).

Recentemente, com as descobertas de que espécies endofíticas são capazes de produzir numerosos metabólitos secundários com características fisiológicas diversas, como atividades antitumorais, antifúngicas, antimicrobianas e outras, foram impulsionados os estudos envolvendo *Pestalotiopsis* (XU et al., 2010; XU et al.,

2014). Já foram registrados 196 metabólitos secundários produzidos pelo gênero *Pestalotiopsis* (YANG et al., 2012).

Fungos do complexo *Pestalotioid* são seres patogênicos para uma enorme quantidade de espécies vegetais, com capacidade de ocasionar diversas doenças, cujos sintomas variam de acordo com a espécie e o local do tecido vegetal infectado. No geral, manifestam-se pequenas lesões de coloração marrom, com formato circular, com bordos definidos, que evoluem e coalescem, com alteração da coloração e formação de áreas irregulares e necróticas (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014; JAYAWARDENEET et al., 2015).

A ausência de especificidade das espécies de *Pestalotiopsis*, em conjunto com a capacidade de infectarem uma planta sem haver a manifestação de sintomas, aumenta as chances de sua dispersão (RUVISHIKA et. al., 2015); dessa maneira, as vegetações próximas ao pomar podem ser fontes de inóculo (KEITH; VELASQUEZ; ZEE, 2006).

2.1.1.3 Caracterização molecular do complexo *Pestalotioid*

Devido à similaridade morfológica entre espécies do gênero fúngico, a identificação passou a ser mais bem-sucedida por meio do sequenciamento de DNA (CROUS; HAWKSWORTH; WINGFIELD, 2015). Por este motivo, gêneros e espécies fúngicas têm sido revisados, e modificações taxonômicas têm sido realizadas, nas quais gêneros e espécies foram realocados de famílias, de gêneros e de espécies diferentes daqueles considerados nos primeiros relatos. Como, por exemplo, as espécies de *Pestalotiopsis* que passam a ser compreendidos por complexo *Pestalotioid*.

No caso do complexo *Pestalotioid*, a revisão molecular dos gêneros e de espécies tem propiciado mudanças muito significativas e que ainda estão em andamento. Em 2012, Maharachchikumbura e colaboradores testaram o sequenciamento de dez regiões gênicas diferentes (actina, calmodulina, glutamina sintase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, ITS, LSU, 18S rDNA, RNA polimerase II, TEF e TUB) para reavaliar as espécies do complexo *Pestalotioid*. Os autores concluíram que, juntamente com dados morfológicos, o sequenciamento da região ITS e dos genes codificadores da β -tubulina, e o fator de alongação 1- α poderiam fornecer resultados mais acurados para tal fim. Sequências concatenadas

dessas regiões resultaram em clados fortemente suportados (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014).

A região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) compreende a região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal. Por ser uma região que resolve a identificação em gênero e espécie dos fungos, tornou-se a mais empregada em estudos filogenéticos desde o desenho dos oligonucleotídeos por White et al. (1990), os quais são estáveis e amplificam esta região da maioria das espécies de fungos já estudada. Com o avanço das técnicas de biologia molecular, regiões gênicas conservadas têm sido utilizadas em conjunto com a região ITS para resolver de maneira definitiva a identificação de espécies crípticas (HYDE et al., 2014; CROUS; HAWKSWORTH; WINGFIELD, 2015).

2.1.1.4 Teste de patogenicidade

O estabelecimento da relação causal entre uma doença e um microrganismo só pode ser confirmado após o cumprimento de uma série de etapas, conhecida por Postulados de Koch, os quais envolvem isolamento, inoculação e reisolamento do patógeno para a confirmação do agente causal da doença (AGRIOS, 2005). Ao realizar o teste de patogenicidade, confirma-se a capacidade de um isolado causar doença no hospedeiro, comprovando-se ser patogênico ao produzir sintomas visíveis no hospedeiro vegetal.

O grau de patogenicidade pode variar dentre os isolados fúngicos, bem como do tipo de hospedeiro, já que algumas espécies fúngicas são capazes de infectar uma gama de hospedeiros, enquanto outras são específicas. Além disso, o gênero *Pestalotiopsis* é composto por um elevado número de espécies endofíticas (YANG et al., 2012; MAHARACHCHUMBURA et al., 2014). Portanto, essas características justificam a execução do teste de patogenicidade para avaliar a patogenicidade das espécies desse gênero em seus hospedeiros.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e descrição do material biológico

Foram coletados folhas, frutos e ramos de goiabeiras, exibindo lesões de coloração marrom, seguidos por necrose, em pomares comerciais localizados em três municípios do Estado de São Paulo. Também foram coletadas folhas de mangueiras 'Tommy Atkins,' exibindo manchas de coloração marrom, às vezes acinzentadas, em um pomar comercial localizado em Ibitirama, distrito de Monte Alto-SP (Tabela 1). De acordo com a classificação de Köppen, essas regiões são de clima do tipo subtropical mesotérmico, com inverno seco e verão quente (Cwa), e clima tropical megatérmico inverno seco (Aw).

Tabela 1. Informações geográficas e climáticas dos municípios de Vista Alegre do Alto, Fernando Prestes e Monte Alto-São Paulo, Brasil, nos quais as amostras foram coletadas.

Município	Latitude				Longitude				Altitude	Clima*	Cultura
Ibitirama**	20°	32'	27"	S	41°	40'	01"	W	770 m	Cwa	Goiabeira
Vista Alegre do Alto	21°	10'	15"	S	48°	37'	44"	W	619 m	AW	Goiabeira
Fernando Prestes	21°	15'	50"	S	48°	41'	06"	W	545 m	Aw	Goiabeira
Monte Alto	21°	15'	39"	S	48°	29'	45"	W	735 m	Cwa	Mangueira

*Classificação climática de acordo com Köppen & Geiger (1930). Cwa: Inverno seco e verão quente; Aw: clima tropical megatérmico com inverno seco. **Distrito do município de Monte Alto

Em goiabeiras de diferentes variedades, foram coletadas folhas jovens completamente desenvolvidas e folhas em estágio mais avançado de desenvolvimento. As folhas jovens apresentavam manchas marrons pequenas (cerca de 0,5 cm), com bordas escuras, evidentes nos dois lados da folha, e as lesões mais desenvolvidas apresentavam centro mais claro e acinzentado, com bordas escuras. Com a coalescência, as lesões tornavam-se grandes, ocupando extensa parte do limbo foliar, seguidas por necroses (Figura 1 A-C). Em folhas nas fases prévias de senescência, a necrose mostrava-se mais evidente, sendo comum a presença de estruturas reprodutivas do patógeno (Figura 1 D-E). Já os ramos doentes exibiam necrose extensiva, com secamento acompanhado de queda de folhas. Os tecidos lesionados tornavam-se enegrecidos (Figura 1 F-G).

Os frutos de goiabeiras coletados para isolamento eram geralmente jovens, verdes e ainda aderidos à planta, sobre os quais foram observadas numerosas

lesões pequenas (cerca de 0,2 cm), de coloração castanha. Ainda em frutos verdes, estas lesões, em estágio mais avançado da infecção, apresentavam-se castanhas e deprimidas, em cujo centro era possível observar estruturas reprodutivas do patógeno (Figura 1 H). Em frutos com estágio mais avançado de maturação, as lesões apresentavam-se maiores, com cerca de 0,5 a 1,0 cm, deprimidas, de tonalidade mais clara no centro, normalmente de cor palha, e bordas bem definidas, de tonalidade vermelha a amarronzada, em cujo centro se observaram estruturas reprodutivas do fungo (Figura 1 I-J). Nesta fase, e devido à morfologia das lesões, a doença era denominada de Pinta-vermelha.

Para o caso de mangueiras, as amostradas coletadas para o isolamento foram folhas fisiologicamente maduras que apresentavam manchas de tamanho irregular (cerca de 0,5 a 1,0 cm), de coloração marrom-escura, e com bordas escuras; e manchas cinzas com bordas marrom-escuras (Figura 2). Ao contrário do observado em folha de goiabeiras, em folhas de mangueiras não houve variação quanto aos tipos de sintomas em decorrência do estágio de desenvolvimento foliar.

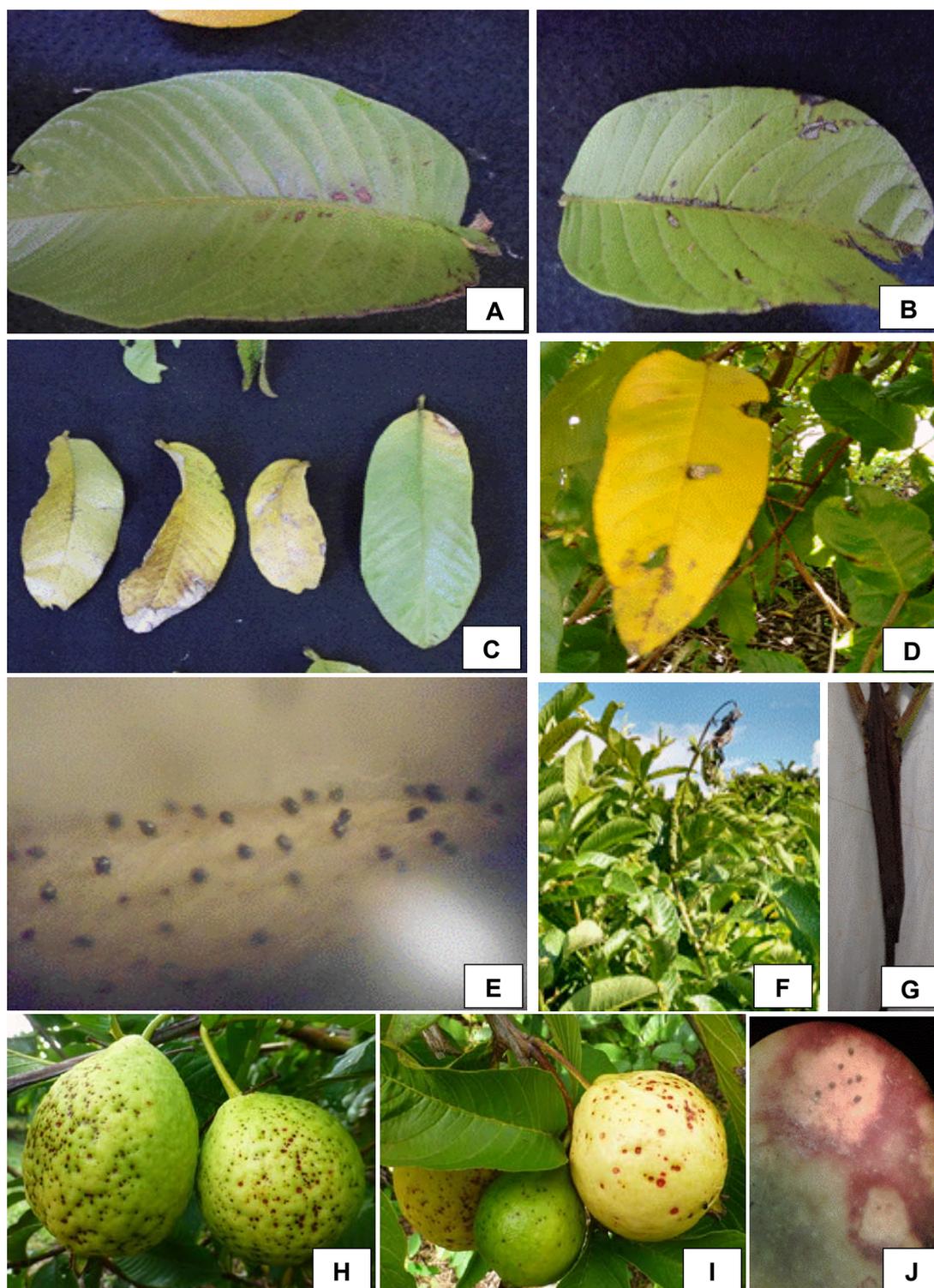


Figura 1. Sintomas de *Pestalotia* observados em plantas de pomares de goiabeira. A. Mancha em folhas jovens; B. Desenvolvimento das manchas em folhas jovens; C. Manchas em folhas mais velhas; D. Desenvolvimento das manchas em folhas mais velhas; E. Sinais do patógeno em folhas; F. Sintomas em ramos, com tecido necrosado; G. Sintomas em ramos, com tecido enegrecido; H. Lesão em frutos jovens; I. Sintomas em frutos maduros, “pinta vermelha”; J. Estrutura reprodutiva. do patógeno no fruto.

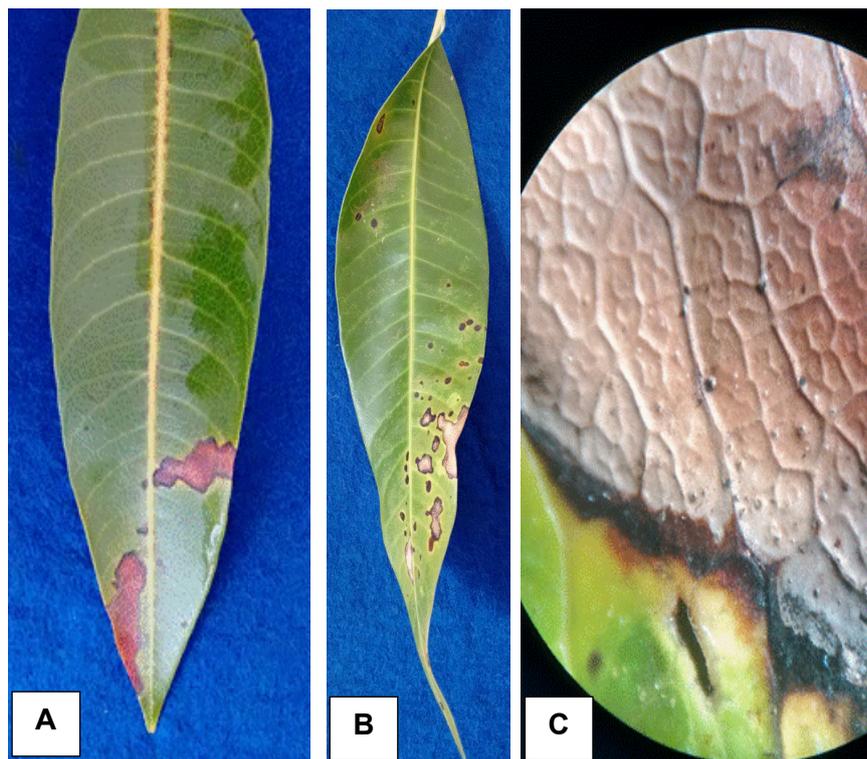


Figura 2. Sintomas do Complexo *Pestalotioid* observados em folhas de mangueiras 'Tommy Atkins' **A.** Manchas foliares em mangueira de cor marrom-escura e bordas escuras; **B.** Manchas de cor cinza e borda marrom-escura; **C.** Estrutura reprodutiva do patógeno na folha.

3.2 Isolamento

O material coletado foi levado para a Clínica Fitopatológica do Departamento de Fitossanidade da FCAV/UNESP, onde foram realizadas as observações das lesões em microscópio estereoscópio (CARL ZEISS, Alemanha) e microscópio óptico (CARL ZEISS, Alemanha). Inicialmente, foram observadas estruturas reprodutivas do fungo semelhantes às constatadas nas descrições feitas por Barnett e Hunter (1998) como sendo características de *Pestalotiopsis*.

Para isolamento de fungos semelhantes a *Pestalotiopsis*, a metodologia foi modificada, visando a eliminar outros fungos contaminantes, com crescimento mais rápido como *Colletotrichum*. Fragmentos de lesões nos frutos (cerca de 5 mm²) foram desinfestados por imersão em álcool etílico a 70% (v/v), por 30 segundos, e,

após, em solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % (v/v), por 2 minutos. O excesso da solução com hipoclorito foi drenado, e os fragmentos foram justapostos sobre meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) contidos em placas de Petri.

Para o isolamento do fungo em lesões foliares, foram retirados fragmentos do tecido de cerca de 7-10 mm², os quais, após desinfestação prévia semelhante à descrita anteriormente, por um minuto em hipoclorito de sódio, foram depositados sobre meio de cultura contido nas placas de Petri. Para isolamento a partir de ramos contendo lesões necróticas, foi utilizado metodologia semelhante, porém com fragmentos maiores, de cerca de 10 mm de diâmetro, e permanência em solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % (v/v), por três minutos.

As placas contendo os fragmentos foram mantidas em estufa a 26°C ± 2°C, com fotoperíodo de 12 h, por aproximadamente 15 dias. Após o desenvolvimento de colônias características de *Pestalotiopsis*, estas foram purificadas, e, após a esporulação, os conídios foram visualizados em microscópio a fim de confirmar a presença do fungo em questão. Os isolados foram armazenados em tubos contendo meio de cultura BDA recobertos com óleo mineral esterilizado.

3.3 Caracterização molecular dos isolados

3.3.1 Extração de DNA

Para a identificação molecular dos isolados, primeiramente, procedeu-se à extração de DNA. Os isolados foram cultivados em meio de cultura líquido batata-dextrose (BD) em estufa bacteriológica a 28°C ± 1°C, por oito dias. Após incubação, o micélio foi peneirado, lavado com água esterilizada e seco em estufa por 12 horas. O micélio seco foi macerado em almofariz com auxílio de nitrogênio líquido até à formação de um pó, do qual 0,1 g foi transferido para tubos eppendorf de 2,0 mL. A extração de DNA seguiu o modelo preconizado por Kuramae-Izioka (1997) com modificações.

A lise celular foi realizada acrescentando-se aos tubos 800 µL do tampão de extração de DNA (160 mM de Tris-HCl pH 8.0, 60 mM de EDTA pH 8.0, 20 mM de NaCl e SDS a 0,5%), os quais foram agitados e mantidos a 65°C, por 50 minutos. Posteriormente, foram acrescentados aos tubos 300 µL de acetato de potássio 5M que após homogeneização, foram mantidos no gelo por 30 minutos. A seguir,

procedeu-se à primeira centrifugação a 12.000 x g, a 10°C, por 10 minutos. O sobrenadante translúcido foi transferido para tubos novos, aos quais foram acrescentados 650 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v/v). A solução foi agitada vagorosamente em vórtex e centrifugada sob as mesmas condições descritas anteriormente. Após a transferência do sobrenadante para tubos novos, acrescentaram-se 1.000 µL de álcool etílico absoluto gelado ao sobrenadante tratado, cuja solução homogeneizada foi mantida a -20°C, por 12 horas. A seguir, procedeu-se à centrifugação dos tubos a 12.000 x g, a 10°C, por 20 minutos, visando a obtenção do *pellet* de DNA, o qual foi lavado com 1.000 µL de álcool etílico a 70% (v/v), sob nova centrifugação. Após a lavagem, o *pellet* de DNA foi seco em estufa a 50°C, por 30 minutos, e suspenso em 60 µL de solução TE 10:1 (10 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM de EDTA pH 8,0).

A quantidade e a qualidade do DNA foram mensuradas em espectrofotômetro Nanodrop 1.000 (Thermo Scientific).

3.3.2 Sequenciamento

A amplificação da região ITS rDNA foi realizada utilizando-se dos primers ITS1/ITS4 (WHITE et al., 1990), para a obtenção de um fragmento de 650 pb. Já a amplificação de um fragmento de 450 pb do gene TEF1 foi realizada utilizando-se dos primers EF1-728F/EF2 (CARBONE; KOHN, 1999; O'DONNELL et al., 1998).

A reação para a amplificação dos fragmentos foi composta por tampão 1x (20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl), 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP's, 0,5 U de Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen), 4 pmol de cada primer, 60 ng de DNA genômico e água pura para 20 µL. A amplificação ocorreu em um termociclador programado para realizar um ciclo a 95°C, por 3 min, 35 ciclos a 94°C, por 30 s, temperatura específica do conjunto de primers (60°C para ITS e 52°C para TEF1), por 30 s e 72°C por 40 s e, para concluir, um ciclo de 10 min a 72°C. Os produtos de PCR amplificados foram então submetidos à PCR de sequenciamento utilizando-se do kit BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems) segundo instruções do fabricante. O sequenciamento foi realizado em um sequenciador ABI3130 (Applied Biosystems).

3.3.3 Análises filogenéticas

A qualidade de bases dos eletroferogramas e as sequências-consenso foram obtidas pelo pacote de programas Phred/Phrap/Consed (EWING; GREEN, 1998; GREEN, 1996; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998). O corte das extremidades das sequências-consenso foi realizado admitindo-se bases com qualidade Phred igual ou superior a 20.

As sequências de DNA qualificadas foram comparadas a outras sequências depositadas no banco de dados GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank), através da ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1990). Para as análises filogenéticas, as sequências das regiões ITS e TEF1 do estudo foram alinhadas com sequências disponíveis no banco de dados GenBank, consideradas espécies-tipo (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014). Foram realizadas duas análises, uma da sequência da região ITS e outra das sequências das regiões ITS e TEF1 concatenadas. As sequências de cada região foram alinhadas separadamente com o auxílio do software PnpProbs, com consistência de 3 e 300 passos (YONGTAO; TAK-WAH; HING-FUNG, 2016), sendo esta metodologia que melhor se adequou aos dados do presente trabalho, em comparação com o alinhamento realizado por MUSCLE (EDGAR, 2004) e MAFFT (KATO; STANDLEY, 2013), de acordo com o critério de informação de Akaike (AIC) (POSADA; BUCKLEY, 2004). O critério de AIC também foi utilizado para a escolha do modelo evolutivo a ser aplicado nas análises. Assim, a árvore filogenética foi gerada pelo software MrBayes 3.2.3 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003) utilizando-se do tipo de substituição 6 e da distribuição invgamma. A análise bayesiana foi realizada utilizando-se do algoritmo Markov Chain Monte Carlo (MCMC). Foram realizadas duas corridas independentes com 24.000.000 de gerações, sendo as árvores amostradas a cada 100 gerações. Ao final das análises, obtendo-se desvio-padrão igual a 0,01, 25% das árvores iniciais geradas foram descartadas. O filograma obtido foi editado graficamente pelo software TreeGraph 2.3.0 (STÖVER; MÜLLER, 2010).

3.4 Testes de patogenicidade

Os testes de patogenicidade foram realizados *in vitro* em folhas saudáveis, destacadas de plantas cultivadas em casa de vegetação. Para tal, foram coletadas

folhas jovens, fisiologicamente maduras e íntegras. As folhas, após seleção prévia quanto à uniformidade, foram lavadas, secas e acondicionadas em bandejas, de isopor revestidas com papel de filtro contendo chumaços de algodão umedecidos em água destilada estéril (ADE). Nos pecíolos das folhas e nas laterais das bandejas, foram justapostos chumaços de algodão embebido em água estéril.

Após a justaposição das folhas sobre as bandejas, as folhas tiveram a superfície adaxial unilateral delimitada em três círculos, de 10 mm de diâmetro, equidistantes entre si, os quais foram desenhados para comportar a inoculação de 100 µL de suspensão de esporos, na concentração de 10^6 mL⁻¹. A superfície lateral excedente foi mantida como testemunha.

A suspensão conidial foi obtida mediante a deposição de 10 mL de água estéril sobre as colônias dos fungos mantidas em placas de Petri a $25^{\circ}\text{C} \pm 1$, com fotoperíodo 12/12 h, por 30 dias, seguido de filtragem em camada dupla de gaze. A concentração do inóculo foi calibrada em câmara de Neubauer.

A inoculação dos isolados foi realizada utilizando-se de dois métodos: com ferimento e sem ferimento das folhas. Para tanto, os experimentos foram separados em dois grupos de cinco folhas. No experimento com ferimento, foram realizadas suaves ranhuras com agulha hipodérmica dentro da área delimitada pelos círculos. No experimento sem ferimentos, as folhas foram mantidas intactas. As testemunhas corresponderam a cinco folhas para cada método de inoculação, com ferimento e sem ferimento, sobre as quais foi aplicada apenas água destilada estéril.

A metodologia empregada foi previamente validada mediante testes prévios com inoculação de três isolados oriundos de goiabeira, sendo inoculados em folhas de goiabeira 'Paluma', a fim de avaliar a melhor temperatura para o teste. Assim, após a montagem dos experimentos, os mesmos foram mantidos simultaneamente em dois ambientes distintos, sendo um mantido em sala climatizada a $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ °C, e o outro mantido em temperatura ambiente, que oscilou de 26 a 30°C.

Com base nos resultados do primeiro experimento, realizou-se o teste de patogenicidade com os demais isolados de goiabeiras obtidos no estudo, cuja inoculação foi realizada de acordo com o prescrito no primeiro experimento.

Os isolados obtidos a partir de folhas de mangueiras também foram submetidos a testes de patogenicidade, cujas inoculações se deram tanto em folhas

destacadas de goiabeira 'Paluma' quanto em folhas de mangueira 'Tommy Atkins', ambas coletadas em plantas igualmente mantidas em casa de vegetação, e a inoculação foi realizada conforme a metodologia já descrita.

3.5 Metodologia de avaliação

A avaliação consistiu na determinação da incidência de folhas com sintomas e da severidade dos sintomas aos 5; 10; 15 e 20 dias após a inoculação (DAI). A severidade dos sintomas associados ao complexo *Pestalotipsis* foi determinada mediante o emprego de escala de notas para os sintomas, sendo: 0 - ausência de sintomas; 1- lesões de até 0,5 cm de diâmetro; 2 - lesões de 0,6 até 1,5 cm de diâmetro; 3 - lesões maiores que 1,6 cm de diâmetro; 4 – lesões de até 1,5 cm de diâmetro, com conídios; 5 - lesões maiores que 1,6 cm de diâmetro e presença de conídios, e 6 - lesões necróticas e/ou encarquilhadas e presença de conídios.

Após a avaliação da incidência e da severidade dos sintomas, os tecidos lesionados foram submetidos ao reisolamento, conforme metodologia descrita no item isolamento.

3.6 Delineamento experimental

Para o primeiro experimento, foi empregado o delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2x4x2, sendo dois métodos de inoculação (com e sem ferimento), três isolados e a testemunha, duas temperaturas (controlada a 25°C ±1°C e temperatura ambiente de 26°C a 30°C), com cinco repetições. No segundo experimento, com todos os isolados de goiabeiras, foi também adotado DIC, esquema fatorial 2x3x2, sendo mantidos os dois métodos de inoculação, com e sem ferimento, com cinco repetições, e apenas uma temperatura, a ambiente de 26°C a 30°C.

No terceiro experimento, com os isolados de mangueiras, também foi adotado DIC, com arranjo fatorial 2x3x2, sendo dois hospedeiros (folhas de goiabeiras e de mangueiras), dois isolados e a testemunha, dois métodos de inoculação (com e sem ferimento), com cinco repetições.

Em todos os experimentos, cada folha inoculada, com três pontos de inoculação, foi considerada uma unidade amostral. Os dados de severidade obtidos

foram transformados em $\sqrt{x+0,5}$ e submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 1 a 5% de significância, pelo programa AgroEstat (BARBOSA; MALDONADO JÚNIOR, 2015). A incidência da doença foi expressa em porcentagem.

4 RESULTADOS

4.1 Isolamento

Os isolados fúngicos purificados, obtidos de tecidos de goiabeiras e mangueiras com os tipos de lesões descritos no item descrição do material biológico, apresentaram colônias com coloração branca a acinzentada, com presença de anéis concêntricos acinzentados a negros, resultantes da formação dos conidiomas. Ao microscópio fotônico, os conídios mostraram-se alongados, com cinco células. As células medianas eram pigmentadas, e as células da extremidade do conídio apresentavam apêndices apicais e basais hialinos, semelhantes àquelas descritas para o gênero *Pestalotiopsis* (BARNETT; HUNTER, 1998). Os conídios distinguiram-se em três grupos de coloração de células medianas, sendo versicolor marrom claro, versicolor marrom-escuro e concolor.

No total, foram vinte e cinco isolados de goiabeiras e dois isolados de mangueiras com características do gênero *Pestalotiopsis*. Os isolados de goiabeiras foram obtidos em sua maioria de folhas, seguidos por ramos e frutos (Tabela 2).

Tabela 2. Isolado, hospedeiro, variedade, tecido vegetal, número de isolados e municípios-SP, dos quais os isolados de goiabeiras e mangueiras foram obtidos.

Isolado *	Hospedeiro	Variedade	Tecido	Nº de isolados	Município
G.L.VAA1 G.L.VAA2 G.L.VAA3 G.L.VAA4 G.L.VAA5 G.L.VAA6 G.L.VAA7 G.L.VAA8 G.L.VAA9		Pedro Sato	Folha	09	Vista Alegre do Alto
G.F.VAA10 G.F.VAA11 G.F.VAA12			Fruto	03	
G.L.FP13 G.L.FP14 G.F.FP15	<i>Psidium guajava</i>		Folha Fruto	02 01	Fernando Prestes
G.F.IB16 G.L.IB17 G.L.IB25		Paluma	Fruto Folha	01 02	
G.S.IB18 G.S.IB19 G.S.IB20 G.S.IB21 G.S.IB22 G.S.IB23 G.S.IB24			Ramo	07	Ibitirama**
M.L.MA26 M.L.MA27	<i>Mangifera indica</i>	Tommy Atkins	Folha	02	

4.2 Sequenciamento gênico

Os resultados da análise molecular, através do alinhamento das sequências ITS e TEF1 do presente estudo com as sequências do banco de dados GenBank, revelaram que a identificação dos gêneros desses fungos mostra-se confusa e ainda em fase de padronização. Pela análise da região ribossomal ITS, os isolados provenientes de goiabeiras, tanto de lesões nos frutos, quanto de folhas e ramos, foram identificados como pertencentes ao gênero *Neopestalotiopsis*, enquanto os isolados M.L.MA26 e M.L.MA27, provenientes de mangueiras, foram identificados como pertencentes aos gêneros *Pseudopestalotiopsis* e *Pestalotiopsis*, respectivamente (Tabela 2; Figuras 3 e 4). Pelo filograma da região ITS, os isolados de goiabeiras e de diferentes espécies de *Neopestalotiopsis* spp. do banco de dados formaram um único grupo, cujo clado está suportado com alta consistência (1,0) da análise bayesiana. Isto é indicativo de que, provavelmente, as espécies de *Neopestalotiopsis* analisadas e aquelas isoladas se tratam de espécies conspecíficas (membro da mesma espécie), com exceção das espécies *N. natalensis* e *N. steyaertii* que aparecem separadas do grupo principal (Figura 3).

A fim de tornar mais clara a identificação dos isolados, realizou-se a análise bayesiana das sequências ITS e TEF1 concatenadas (Figuras 5 e 6). Os resultados acerca da identificação dos isolados em gêneros foram coincidentes àqueles obtidos pela análise somente da região ITS. Novamente observou-se um grupo consistente formado pela maioria das espécies de *Neopestalotiopsis* analisadas e pelos isolados de goiabeiras do estudo. No entanto, nesse filograma, foi possível observar diversidade genética entre os isolados pelo acréscimo de sequências TEF1 às análises. Assim, como no filograma apenas da região ITS, na árvore de sequências concatenadas, o isolado M.L.MA26 foi agrupado à espécie *Pseudopestalotiopsis theae*, e o isolado M.L.MA27 agrupou-se juntamente com a espécie *Pestalotiopsis trachicarpicola*. Além disso, observou-se que isolados de *Neopestalotiopsis* oriundos de folhas, frutos e ramos de goiabeiras, de diferentes municípios, apresentaram alta similaridade genética entre si, formando um mesmo subgrupo (G.L.VAA5, G.F.FP15, G.S.IB18, G.S.IB20, G.S.IB21, G.S.IB22 e G.S.IB23), o que sugere falta de especificidade do tecido para tal patógeno.

A análise filogenética de sequências concatenadas mostrou que os isolados deste estudo diferem geneticamente daqueles cujas sequências se encontram depositadas no banco de dados. Não é possível aferir com precisão se espécies novas foram isoladas. Estudos envolvendo análise polifásica, utilizando ferramentas acuradas de bioinformática, e estudos morfológicos serão necessários, inclusive, para confirmar a identificação das espécies dos patógenos já relatados.



Figura 3. Filograma 1 obtido pela análise bayesiana das sequências da região ITS com ênfase nos grupos *Neopestalotiopsis* spp. e *Pseudoestalotiopsis* spp.. Os números na interseção dos ramos correspondem aos valores de confiabilidade.

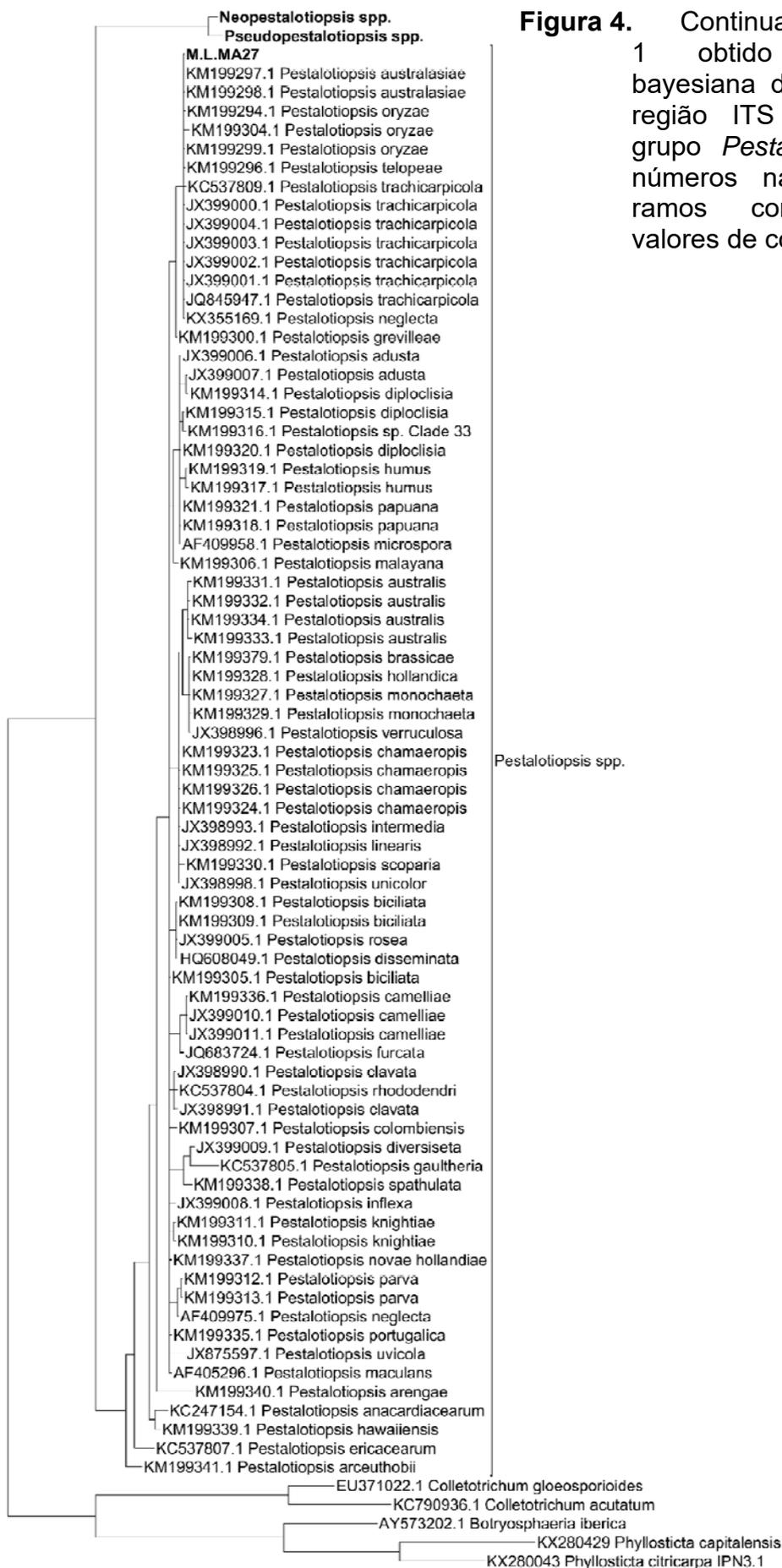


Figura 4. Continuação do filograma 1 obtido pela análise bayesiana das sequências da região ITS com ênfase no grupo *Pestalotiopsis* spp. Os números na interseção dos ramos correspondem aos valores de confiabilidade.

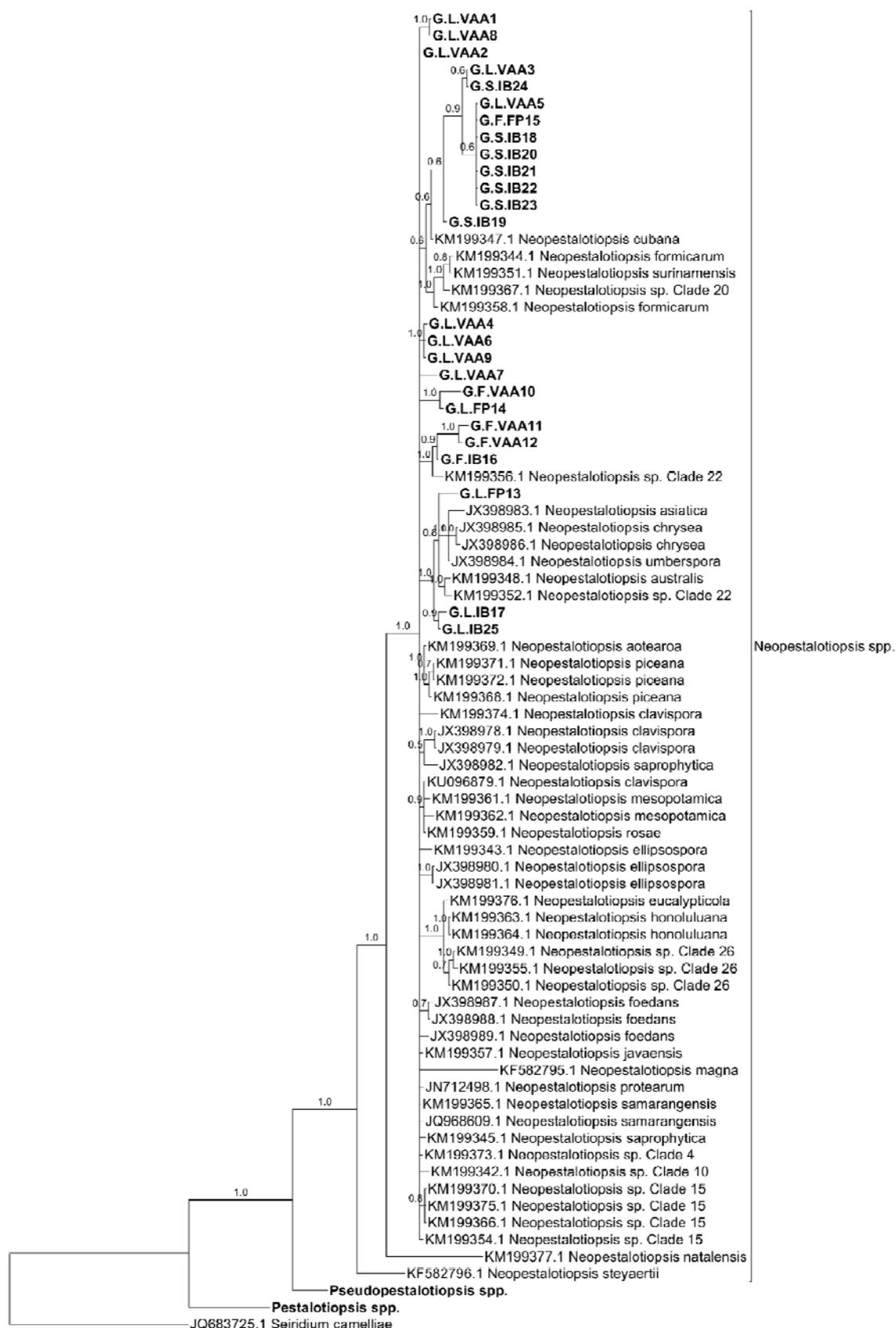


Figura 5. Filograma 2 obtido pela análise bayesiana das sequências concatenadas das regiões ITS e TEF1, com ênfase no grupo *Neopestalotiopsis* spp., onde se agruparam os isolados provenientes de goiabeiras. Os números de acesso ao GenBank no filograma correspondem à região ITS. Sequências TEF1 dos mesmos isolados foram concatenadas às análises. Os números na interseção dos ramos correspondem aos valores de confiabilidade.

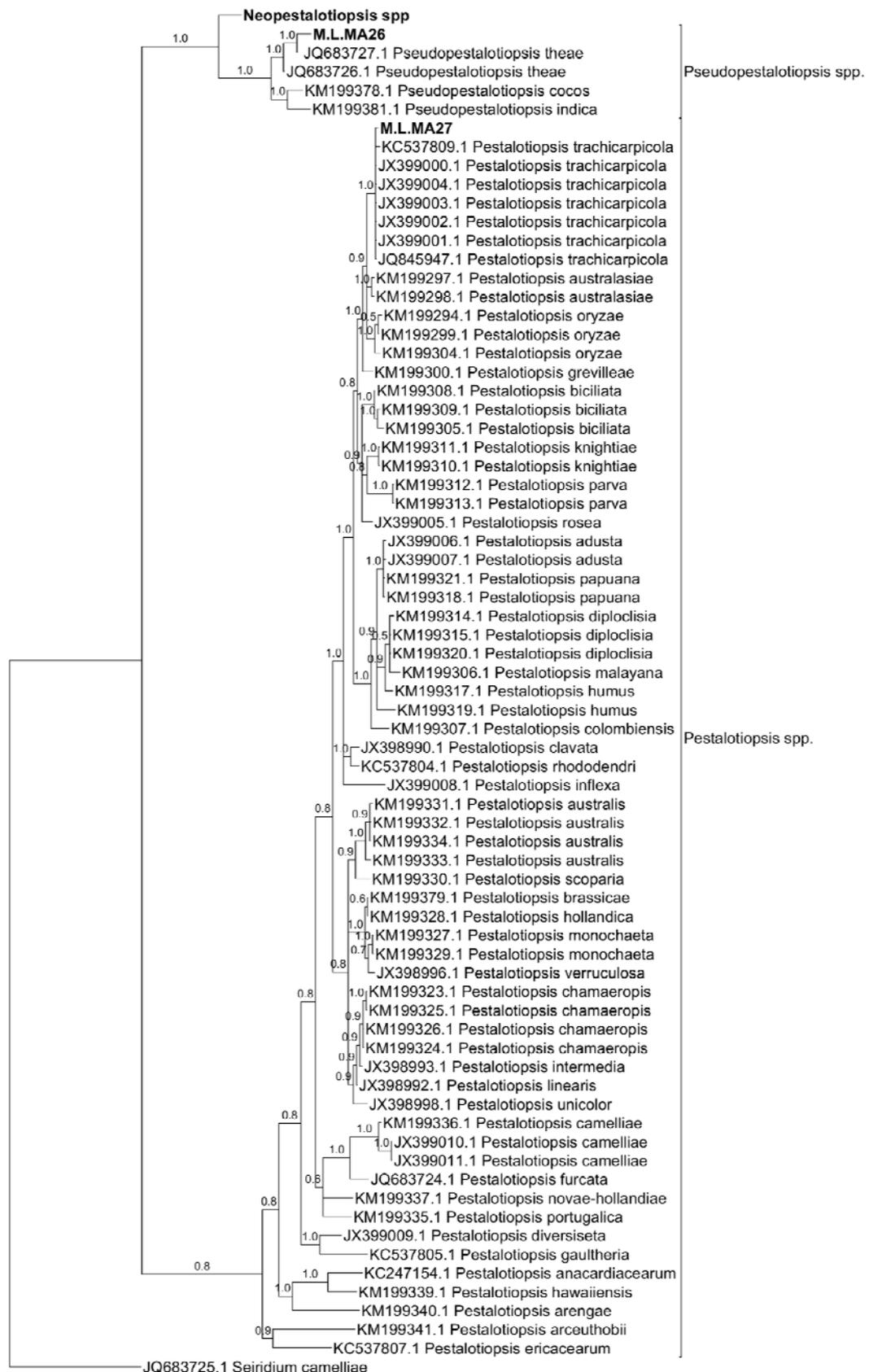


Figura 6. Continuação do filograma 2 obtido pela análise bayesiana das sequências concatenadas das regiões ITS e TEF1, com ênfase nos grupos *Pseudopestalotiopsis* spp. e *Pestalotiopsis* spp., nos quais se agruparam os isolados provenientes de manguueiras. Os números de acesso ao GenBank no filograma correspondem à região ITS. Sequências TEF1 dos mesmos isolados foram concatenadas às análises. Os números na interseção dos ramos correspondem aos valores de confiabilidade.

4.3 Teste de patogenicidade dos isolados obtidos de goiabeiras

No primeiro experimento, realizado de forma preliminar, os três isolados de goiabeiras inoculados ocasionaram sintomas nas folhas de goiabeira 'Paluma' em ambos os métodos de inoculação empregados, com e sem ferimentos, em ambas as condições ambientais testadas. A incidência dos sintomas foi mais elevada a partir do décimo dia após a inoculação e nos ensaios com ferimento prévio (Figura 7).

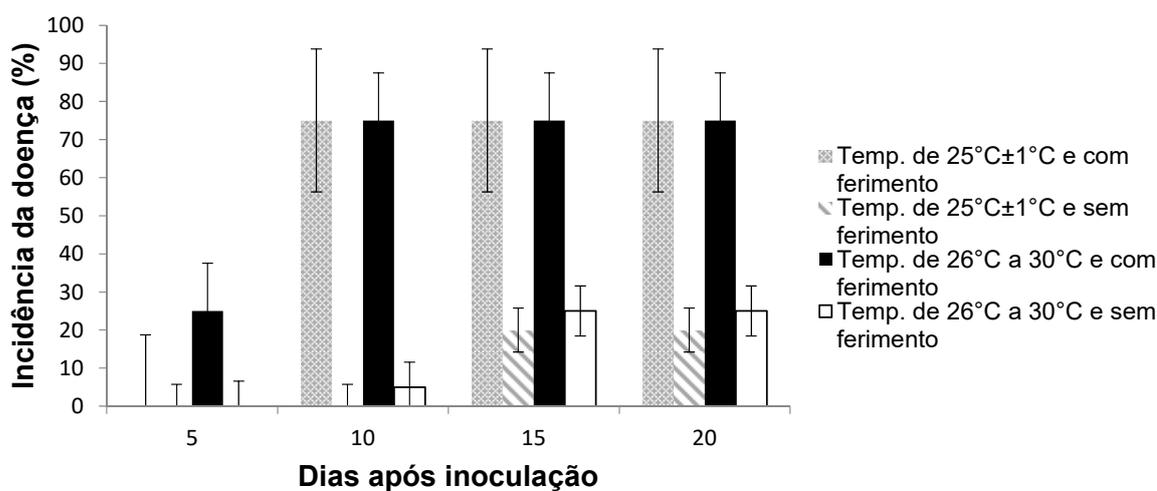


Figura 7. Incidência de folhas com sintomas aos 5;10;15 e 20 dias após inoculação de *Neopestalotiopsis* spp. sob condições de temperatura a 25°C ± 1°C e em ambiente de laboratório de 26 a 30°C, e métodos de inoculação com e sem ferimento prévio; dados referentes ao primeiro experimento.

Os dados relativos aos níveis de severidade dos sintomas resultantes da inoculação inicial de três isolados, em folhas de goiabeira 'Paluma', encontram-se apresentados nas Tabelas 3 a 6. De acordo com os dados, foi observado alta diferença estatística ($P \leq 0,01$) quanto à temperatura (T), isolados (I) e métodos de inoculação (MI), aos 5; 10; 15 e 20 DAI. Os maiores níveis de severidade foram observados, com significância $P \leq 0,01$, quando as folhas foram mantidas em temperatura ambiente e quando os tecidos foliares foram previamente feridos. O isolado G.S.IB19 comportou-se como o mais patogênico, com maior nível de severidade dos sintomas produzidos em relação aos demais isolados. Também foi constatada diferença estatisticamente significativa quanto às interações TxI, TxMI, IxMI e TxIxMI aos 5 DAI; IxMI aos 10 DAI, e TxI, TxMI e IxMI aos 15 DAI.

Tabela 3. Análise de variância das médias dos valores de severidade de sintomas causados por isolados *Neopestalotiopsis* spp. oriundos de goiabeiras, inoculados em folhas de goiabeira 'Paluma'. Dados referentes ao primeiro experimento.

Valores médios de severidade de sintomas nos dias após inoculação (DAI) ⁽¹⁾				
Temperatura (T)	5 (DAI)	10 (DAI)	15 (DAI)	20 (DAI)
Ambiente	0,125 a	0,875 a	1,250 a	1,400 a
25°C	0,000 b	0,500 b	0,600 b	0,600 b
Teste F	251001,00**	8,36**	14,69**	12,60**
Isolados (I)				
G.S.IB19	0,251 a	1,200 a	1,850 a	1,850 a
G.F.VAA10	0,000 b	0,850 b	1,150 b	1,250 b
G.L.FP14	0,000 b	0,700 b	0,700 b	0,900 b
Testemunha	0,000 b	0,000 c	0,00 c	0,000 c
Teste F	251.001,00**	22,95**	30,31**	18,76**
Método de inoculação (MI)				
Com ferimento	0,125 a	1,300 a	1,775 a	1,875 a
Sem ferimento	0,000 b	0,075 b	0,075 b	0,125 b
Teste F	251.001,00**	149,34**	172,05**	109,14**
Interação (T X I)	251.001,00**	1,56 ^{ns}	3,12**	2,22 ^{ns}
Interação (T X MI)	251.001,00**	2,47 ^{ns}	7,19**	5,20 ^{ns}
Interação (I X MI)	251.001,00**	21,56**	28,77**	17,74 ^{ns}
Interação (T X I X MI)	251.001,00**	0,49 ^{ns}	0,94 ^{ns}	0,66 ^{ns}
CV (%)	1,785	19,599	21,164	26,604

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, a 1% de probabilidade. **Significativo a 1% de probabilidade, ^{ns}Não Significativo. ⁽¹⁾ Dados transformados em $\sqrt{x} + 0,5$.

Tabela 4. Desdobramento das interações entre temperatura (T) e os isolados de *Neopestalotiopsis* spp. oriundos de goiabeira (I), testados no primeiro experimento, quanto aos valores de severidade de sintomas, aos 5 e 15 dias após a inoculação (DAI).

Temperatura (T)	Isolados (I)				Teste F
	G.S.IB19	G.F.VAA10	G.L.FP14	Testemunha	
5 (DAI)					
Ambiente	0,501 aB	0,000 aB	0,000 aB	0,000 aB	502002,00**
25°C	0,000 bA	0,000 aA	0,000 aA	0,000 aA	-
Teste F	100.4004,00**	-	-	-	
15 (DAI)					
Ambiente	2,300 aA	1,800 aA	0,900 aB	0,000 aC	23,39**
25°C	1,400 bA	0,500 bB	0,500 aB	0,000 aC	10,03**
Teste F	4,80**	17,60**	1,64 ^{ns}	0,00 ^{ns}	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula nas linhas não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 1% de probabilidade. **Significativo a 1% de probabilidade, ^{ns}Não Significativo. Dados transformados em $\sqrt{x} + 0,5$.

Tabela 5. Desdobramento das interações entre temperatura e métodos de inoculação, com e sem fermento, aos 5; 15 e 20 dias após a inoculação (DAI), referente aos isolados *Neopestalotiopsis* spp. oriundos de goiabeira testados no primeiro experimento.

Temperatura (T)	Método de inoculação (MI)		Teste F
	Sem fermento	Com fermento	
5 (DAI)			
Ambiente	0,000 aB	0,250 aA	502002,00**
25°C	0,000 aA	0,000 bA	-
Teste F	-	502002,00**	
15 (DAI)			
Ambiente	0,150 aB	2,350 aA	124,78**
25°C	0,000 aB	1,200 bA	54,45**
Teste F	0,66 ^{ns}	21,21**	
20 (DAI)			
Ambiente	0,250 aB	2,550 aA	81,00**
25°C	0,000 aB	1,200 bA	33,34**
Teste F	0,80 ^{ns}	17,00**	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula nas linhas não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 1% de probabilidade. **Significativo a 1% de probabilidade, ^{ns}Não Significativo. Dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$.

Tabela 6. Desdobramento das interações entre isolados *Neopestalotiopsis* sp. oriundos de goiabeira e método de inoculação, com e sem fermento, aos 10; 15 e 20 dias após a inoculação (DAI), referente ao primeiro experimento.

Isolados (I)	Método de inoculação (MI)		Teste F
	Sem fermento	Com fermento	
5 (DAI)			
G.S.IB19	0,000 aB	0,501 aA	-
G.F.VAA10	0,000 aA	0,000 bA	1004004,00**
G.L.FP14	0,000 aA	0,000 bA	-
TESTEMUNHA	0,000 aA	0,000 bA	-
Teste F	-	502002,00**	
10 (DAI)			
G.S.IB19	0,000 aB	2,400 aA	125,18**
G.F.VAA10	0,300 aB	1,400 bA	34,96**
G.L.FP14	0,000 aB	1,400 bA	53,88**
TESTEMUNHA	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
Teste F	0,87 ^{ns}	43,64**	
15 (DAI)			
G.S.IB19	0,000 aB	3,700 aA	172,54**
G.F.VAA10	0,300 aB	2,000 bA	44,83**
G.L.FP14	0,000 aB	1,400 bA	40,99**
TESTEMUNHA	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
Teste F	0,66 ^{ns}	58,42**	
20 (DAI)			
G.S.IB19	0,000 aB	3,700 aA	105,64**
G.F.VAA10	0,500 aB	2,000 bA	23,73**
G.L.FP14	0,000 aB	1,800 bA	33,00**
TESTEMUNHA	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
Teste F	0,80 ^{ns}	35,69**	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula nas linhas não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 1% de probabilidade. **Significativo a 1% de probabilidade, ^{ns}Não Significativo. Dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$.

O segundo experimento foi realizado com base nos resultados do primeiro experimento. Foram avaliados os 22 isolados de goiabeiras restantes, optando-se por continuar realizando as duas metodologias de inoculação, com e sem ferimento, pois visou-se a observar a capacidade de infecção do fungo sem a presença de ferimentos, mesmo que os sintomas aparecessem tardiamente. Quanto à temperatura, optou-se por manter o experimento em temperatura ambiente, que simula de maneira mais natural aquela de condições de campo, que melhor propicia o aparecimento e a evolução das lesões. Os dados relativos aos níveis de severidade dos sintomas resultantes da inoculação de folhas de goiabeiras 'Paluma' encontram-se apresentados nas Tabelas 7 e 8. A análise de variância das médias de severidade das lesões ocasionadas pelos isolados mostrou diferenças estatísticas significativas quanto à metodologia de inoculação, com e sem ferimento, aos 5; 10; 15 e 20 DAI. Observou-se que as folhas inoculadas com ferimento prévio resultaram no aparecimento de sintomas mais precocemente, quando comparadas à inoculação realizada em folhas sem ferimento. Além disso, na inoculação realizada em folhas com ferimento prévio, as lesões evoluíram até, aproximadamente, vinte vezes mais, aos 20 DAI, em relação às lesões ocasionadas em folhas sem ferimento (Tabela 7 e Figura 8). No entanto, o fungo mostrou-se capaz de ocasionar sintomas em folhas inoculadas sem ferimento, os quais se tornaram visíveis, em média, a partir dos 15 DAI.

Tabela 7. Análise de variância das médias de severidade de sintomas dos isolados *Neopestalotiopsis* spp. oriundos de goiabeira, avaliadas aos 5; 10; 15 e 20 dias após inoculação (DAI).

Valores médios de severidade de sintomas nos dias após inoculação DAI ⁽¹⁾				
Isolados (I)	5 (DAI)	10 (DAI)	15 (DAI)	20 (DAI)
G.L.VAA4	0,100 c	0,100 c	0,700 b	1,400 a
G.L.IB25	0,000 c	0,000 c	0,900 b	1,800 a
G.L.VAA1	0,000 c	0,000 c	0,900 b	1,400 a
G.L.VAA8	0,000 c	0,000 c	1,400 a	3,000 a
G.L.VAA7	0,000 c	0,000 c	0,600 b	1,500 a
G.S.IB24	0,000 c	0,000 c	0,500 b	1,700 a
G.S.IB22	0,000 c	0,000 c	0,100 b	0,700 b
G.S.IB23	0,000 c	0,000 c	0,900 b	2,300 a
G.S.IB20	0,000 c	0,000 c	0,000 b	0,200 b
G.L.VAA3	0,000 c	0,000 c	0,700 b	2,100 a
G.F.VAA11	0,000 c	0,000 c	0,400 b	1,400 a
G.F.IB16	0,500 b	0,500 b	1,600 a	2,700 a
G.L.VAA9	0,900 a	0,900 a	2,100 a	2,200 a
G.S.IB21	0,000 c	0,000 c	0,700 b	1,600 a
G.L.VAA5	0,000 c	0,000 c	0,300 b	1,600 a
G.S.IB18	0,800 a	0,800 a	2,100 a	3,300 a
G.L.IB17	0,000 c	0,000 c	3,000 a	3,700 a
G.L.VAA6	0,000 c	0,000 c	1,200 a	2,100 a
G.L.VAA2	0,000 c	0,000 c	0,600 b	2,000 a
G.F.VAA12	0,000 c	0,000 c	0,000 b	0,000 b
G.L.FP13	0,000 c	0,000 c	1,500 b	2,000 a
G.F.FP15	0,000 c	0,000 c	0,000 b	0,000 b
Testemunha	0,000c	0,000 c	0,000 b	0,000 b
Teste F	8,82**	8,82**	4,55**	3,74**
Método de inoculação (MI)				
Com fermento	0,200 a	0,200 a	1,636 a	2,845 a
Sem fermento	0,009 b	0,009 b	0,200 b	0,133 b
Teste F	25,10**	25,10**	104,65**	106,96**
Interação (I X MI)	9,11**	9,11**	3,76**	1,93
CV (%)	16,029	16,029	35,995	39,233

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si, a 1% de probabilidade.

**Significativo a 1% de probabilidade, ^{ns}Não Significativo. ⁽¹⁾ Dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$.

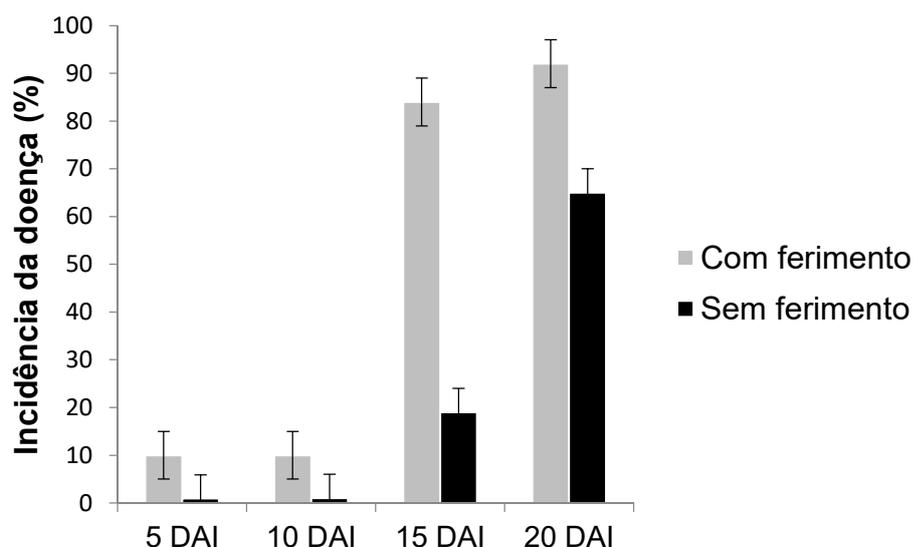


Figura 8. Incidência de folhas de goiabeiras com sintomas aos 5; 10; 15 e 20 dias após a inoculação, sob condições de simulação de temperatura ambiente com 26°C a 30°C e métodos de inoculação (com e sem ferimento). Referente ao segundo experimento com isolados de *Neopestalotiopsis* spp. oriundos de tecidos foliares, ramos e frutos de goiabeira, de municípios do Estado de São Paulo.

Tabela 8. Desdobramento da interação entre os isolados de *Neopestalotiopsis* spp. oriundos de goiabeiras e os métodos de inoculação, com e sem ferimento, aos 5; 10; 15 e 20 dias após a inoculação (DAI). Dados referentes à análise de variância correspondente ao segundo experimento.

Isolados (I)	Método de inoculação (MI)		Teste F
	Sem ferimento	Com ferimento	
5 (DAI)			
G.L.VAA4	0,200 aA	0,000 cA	1,84 ^{ns}
G.L.IB25	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
G.L.VAA1	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
G.L.VAA8	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
G.L.VAA7	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
G.S.IB24	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
G.S.IB22	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
G.S.IB23	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
G.S.IB20	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
G.L.VAA3	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
G.F.VAA11	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
G.F.IB16	0,000 aB	1,000 ba	35,28 ^{**}
G.L.VAA9	0,000 aA	1,800 aa	98,50 ^{**}
G.S.IB21	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
G.L.VAA5	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
G.S.IB18	0,000 aB	1,600 aa	80,83 ^{**}
G.L.IB17	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
G.L.VAA6	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}

Isolados (I)	Método de inoculação (MI)		Teste F
	Sem fermento	Com fermento	
5 (DAI)			
G.L.VAA2	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
G.F.VAA12	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
G.L.FP13	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
G.F.FP15	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
Testemunha	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
Teste F	0,17 ^{ns}	17,76 ^{**}	
10 (DAI)			
G.L.VAA4	0,200 aA	0,000 cA	1,84 ^{ns}
G.L.IB25	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
G.L.VAA1	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
G.L.VAA8	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
G.L.VAA7	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
G.S.IB24	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
G.S.IB22	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
G.S.IB23	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
G.S.IB20	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
G.L.VAA3	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
G.F.VAA11	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
G.F.IB16	0,000 aB	1,000 ba	35,28 ^{**}
G.L.VAA9	0,000 aB	1,800 aa	98,50 ^{**}
G.S.IB21	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
G.L.VAA5	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
G.S.IB18	0,000 aB	1,600 aa	80,83 ^{**}
G.L.IB17	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
G.L.VAA6	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
G.L.VAA2	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
G.F.VAA12	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
G.L.FP13	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
G.F.FP15	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
Testemunha	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
Teste F	0,17 ^{ns}	17,76 ^{**}	
Isolados (I)	Método de inoculação (MI)		Teste F
	Sem fermento	Com fermento	
15 (DAI)			
G.L.VAA4	0,200 aB	1,200 cA	4,06 [*]
G.L.IB25	0,000 aB	1,800 cA	8,68 ^{**}
G.L.VAA1	0,600 aA	1,200 cA	1,14 ^{ns}
G.L.VAA8	0,800 aB	2,000 bA	4,74 [*]
G.L.VAA7	0,000 aB	1,200 cA	5,09 [*]
G.S.IB24	0,200 aA	0,800 cA	1,66 ^{ns}
G.S.IB22	0,000 aA	0,200 dA	0,18 ^{ns}
G.S.IB23	0,000 aB	1,800 cA	10,18 ^{**}
G.S.IB20	0,000 aA	0,000 dA	0,00 ^{ns}
G.L.VAA3	0,200 aA	1,200 cA	2,16 ^{ns}
G.F.VAA11	0,000 aA	0,800 cA	1,95 ^{ns}
G.F.IB16	0,000 aB	3,200 bA	20,36 ^{**}
G.L.VAA9	0,200 aB	4,000 aA	27,64 ^{**}
G.S.IB21	0,200 aA	1,200 cA	2,16 ^{ns}
G.L.VAA5	0,200 aA	0,400 dA	0,18 ^{ns}
G.S.IB18	0,000 aB	4,200 aA	33,04 ^{**}
G.L.IB17	0,600 aB	5,400 aA	38,15 ^{**}
G.L.VAA6	1,200 aA	1,200 cA	0,00 ^{ns}
G.L.VAA2	0,000 aA	1,200 cA	3,21 ^{ns}

Isolados (I)	Método de inoculação (MI)		Teste F
	Sem ferimento	Com ferimento	
15 (DAI)			
G.F.VAA12	0,000 aA	0,000 dA	0,00 ^{ns}
G.L.FP13	0,000 aB	3,000 bA	18,93 ^{**}
G.F.FP15	0,000 aA	0,000 dA	0,00 ^{ns}
Testemunha	0,000 aA	0,000 dA	0,00 ^{ns}
Teste F	0,62ns	7,69 ^{**}	
20 (DAI)			
G.L.VAA4	0,400 aB	2,400 bA	5,34 [*]
G.L.IB25	0,800 aA	2,800 bA	3,58 ^{ns}
G.L.VAA1	0,800 aA	2,000 bA	2,33 ^{ns}
G.L.VAA8	1,400 aB	4,600 aA	10,08 ^{**}
G.L.VAA7	0,000 aB	3,000 bA	9,99 ^{**}
G.S.IB24	1,200 aA	2,200 bA	2,12 ^{ns}
G.S.IB22	0,200 aA	1,200 cA	1,38 ^{ns}
G.S.IB23	0,200 aB	4,400 aA	17,82 ^{**}
G.S.IB20	0,000 aA	0,400 cA	0,28 ^{ns}
G.L.VAA3	1,200 aA	3,000 bA	3,33 ^{ns}
G.F.VAA11	0,200 aB	2,600 bA	6,41 [*]
G.F.IB16	1,200 aB	4,200 aA	7,73 ^{**}
G.L.VAA9	0,200 aB	4,200 aA	15,82 ^{**}
G.S.IB21	1,200 aA	2,000 cA	0,74 ^{ns}
G.L.VAA5	1,400 aA	1,800 cA	0,15 ^{ns}
G.S.IB18	1,200 aB	5,400 aA	14,58 ^{**}
G.L.IB17	2,000 aB	5,400 aA	8,66 ^{**}
G.L.VAA6	1,200 aA	3,000 bA	2,63 ^{ns}
G.L.VAA2	0,000 aB	4,000 aA	17,27 ^{**}
G.F.VAA12	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
G.L.FP13	0,000 aB	4,000 aA	17,28 ^{**}
G.F.FP15	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
Testemunha	0,000 aA	0,000 cA	0,00 ^{ns}
Teste F	0,93ns	4,74 ^{**}	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula nas linhas não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 1% de probabilidade. ^{**}Significativo a 1% de probabilidade, ^{ns}Não Significativo. ⁽¹⁾Dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$.

Os isolados apresentaram diferença entre si em relação ao início da manifestação dos sintomas. Os maiores níveis de severidade foram observados empregando-se os isolados G.L.VAA9, G.S.IB18 e G.F.IB16. Com o decorrer do tempo pós-inoculação, os níveis de severidade foram elevados, principalmente com relação aos isolados que foram capazes de ocasionar sintomas aos cinco DAI. No entanto, mesmo aqueles isolados que apresentaram infecção tardia, ocasionaram lesões estatisticamente semelhantes àquelas causadas por isolados de infecção rápida aos 20 DAI. Foi constatado que os isolados G.F.VAA12 e G.F.FP15 não manifestaram sintomas; assim, supõe-se que possa ter havido algum problema com o inóculo ou que os isolados sejam endofíticos; no entanto, a patogenicidade desses isolados será verificada posteriormente.

Foi constatado diferença estatisticamente significativa quanto à interação entre isolado e método de inoculação, I x MI, aos 5; 10; 15 e 20 DAI, diferindo-se o método dentro o mesmo isolado (Tabela 8). Somente quando os isolados foram inoculados sem ferimento, não houve diferenças estatísticas entre as médias de severidade das lesões ocasionadas pelos mesmos. Esses resultados indicam a interferência que os ferimentos podem ocasionar na expressão da severidade de sintomas de *Neopestalotiopsis* spp. nos testes de patogenicidade. E a realização conjunta do teste de patogenicidade, em folhas sem ferimento, averiguou patogenicidade dos isolados, mostrando-se capazes de infectarem tecidos foliares sem necessidade de ferimento prévio, no entanto, os sintomas são expressos mais tardiamente. Como alguns isolados apresentaram infecção tardia, aos 15 DAI, evidencia-se a necessidade da extensão do tempo de avaliação de experimentos com testes de patogenicidade com isolados do complexo *Pestalotioid*.

De forma geral, observou-se que os sintomas verificados em folhas de goiabeira 'Paluma', inoculadas sob condições de laboratório, foram semelhantes àqueles observados em folhas de goiabeiras de diferentes variedades, sob condições naturais de campo. Isolados obtidos de ramos e frutos de goiabeiras induziram a expressão de sintomas em folhas com características idênticas àquelas produzidas por isolados obtidos deste órgão.

A partir dos tecidos que exibiram sintomas após inoculações, os fungos foram reisolados, com conseqüente sucesso na aplicação dos Postulados de Koch.

4.4 Teste de patogenicidade dos isolados obtidos de mangueiras

Os dois isolados de mangueiras foram capazes de ocasionar sintomas, tanto em folhas de mangueiras quanto em folhas de goiabeiras. Os dados relativos aos níveis de severidade dos sintomas resultantes da inoculação de folhas de goiabeiras 'Paluma' e de mangueiras 'Tommy Atkins' encontram-se apresentados nas Tabelas 9; 10 e 11.

Neste experimento, os sintomas foram observados apenas sob ferimento nas folhas (Tabela 9 e Figura 9), o que demonstra o baixo grau de patogenicidade dos isolados. Foi observado diferença altamente significativa ($P \leq 0,01$) quanto a isolados (I) e métodos de inoculação (MI), aos 10; 15 e 20 DAI, e tipo de hospedeiro aos 15 e

20 DAI. Foi constatado diferença estatisticamente significativa quanto à interação HxMI aos 15 e 20 DAI, e IxMI a partir de 10 DAI. Os maiores níveis de severidade foram observados em folhas de mangueiras, hospedeiro de origem dos isolados.

Tabela 9. Análise de variância e teste de comparação das médias de severidade dos sintomas foliares em goiabeiras e mangueiras com e sem ferimento, dos isolados *Pseudopestalotiopsis theae* e *Pestalotiopsis trachicarpicola* oriundos de mangueiras.

Hospedeiro (H)	Valores médios de severidade nos dias após inoculação (DAI) ⁽¹⁾			
	5 (DAI)	10 (DAI)	15 (DAI)	20 (DAI)
Goiabeira	0,000 a	0,300 a	0,467 b	0,533 a
Mangueira	0,000 a	0,333 a	0,700 a	0,733 a
Teste F	-	0,17 ^{ns}	7,29 ^{**}	4,10 ^{**}
Isolados (I)				
M.L.MA27	0,000 a	0,500 a	0,750 a	0,800 b
M.L.MA26	0,000 a	0,450 a	1,000 b	1,100 a
Testemunha	0,000 a	0,000 b	0,000 c	0,000 c
Teste F	-	31,44 ^{**}	76,53 ^{**}	67,12 ^{**}
Método de inoculação (MI)				
Com ferimento	0,000 a	0,633 a	1,167 a	1,267 a
Sem ferimento	0,000 a	0,000 b	0,000 b	0,000 b
Teste F	-	123,93 ^{**}	296,83 ^{**}	257,71 ^{**}
Interação (H X I)	-	0,17 ^{ns}	1,90 ^{ns}	1,21 ^{ns}
Interação (H X MI)	-	0,17 ^{ns}	7,29 ^{**}	4,10 [*]
Interação (I X MI)	-	31,44 ^{**}	76,53 ^{**}	67,12 ^{**}
Interação (H X I X MI)	-	0,17 ^{ns}	1,90 ^{ns}	1,21 ^{ns}
CV (%)	-	12,920	12,03	13,47

Média seguida pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 1% de probabilidade. ^{**}Significativo a 1% de probabilidade, ^{ns}Não Significativo. ⁽¹⁾ Dados transformados em $\sqrt{x+0,5}$

Tabela 10. Desdobramento das interações entre os tipos de hospedeiro e método de inoculação com e sem ferimento, aos 5; 10; 15 e 20 dias após a inoculação (DAI), referente aos isolados de *Pseudopestalotiopsis theae* e *Pestalotiopsis trachicarpicola* oriundos de mangueiras.

Hospedeiro (H)	Método de inoculação (MI)				Teste F
	Sem ferimento		Com ferimento		
15 (DAI)					
Goiabeira	0,000	a B	0,933	b A	105,56 ^{**}
Mangueira	0,000	a B	1,400	a A	198,56 ^{**}
Teste F	0,00 ^{ns}		14,57 ^{**}		
20 (DAI)					
Goiabeira	0,000	a B	1,067	b A	98,42 ^{**}
Mangueira	0,000	a B	1,467	a A	163,39 ^{**}
Teste F	0,00 ^{ns}		8,19 ^{**}		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula nas linhas não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 1% de probabilidade. ^{**}Significativo a 1% de probabilidade, ^{ns}Não Significativo.

Tabela 11. Desdobramento das interações entre os isolados de *Pseudopestalotiopsis theae* e *Pestalotiopsis trachicarpicola* oriundos de folhas de mangueiras e o método de inoculação, com e sem ferimento, aos 5; 10; 15 e 20 dias após a inoculação (DAI).

Isolados (I)	Método de inoculação (MI)						Teste F
	Sem ferimento			Com ferimento			
10 (DAI)							
M.L.MA27	0,000	a	B	1,000	a	A	106,45**
M.L.MA26	0,000	a	B	0,900	a	A	80,36**
Testemunha	0,000	a	A	0,000	b	A	0,00 ^{ns}
Teste F	0,00 ^{ns}			85,76**			
15 (DAI)							
M.L.MA27	0,000	a	B	1,500	b	A	179,50**
M.L.MA26	0,000	a	B	2,000	a	A	270,39**
Testemunha	0,000	a	A	0,000	c	A	0,00 ^{ns}
Teste F	0,00 ^{ns}			153,06**			
20 (DAI)							
M.L.MA27	0,000	a	B	1,600	b	A	150,38**
M.L.MA26	0,000	a	B	2,200	a	A	241,57**
Testemunha	0,000	a	A	0,000	c	A	0,00 ^{ns}
Teste F	0,00 ^{ns}			134,23**			

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 1% de probabilidade. **Significativo a 1% de probabilidade, ^{ns}Não Significativo.

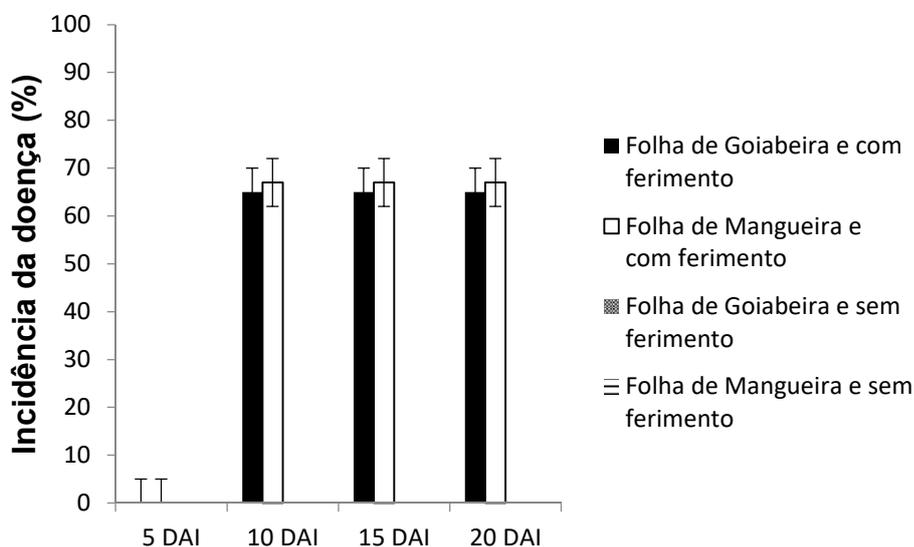


Figura 9. Incidência de folhas com sintomas aos 5; 10; 15 e 20 dias após inoculação de isolados de *Pseudopestalotiopsis theae* e *Pestalotiopsis trachicarpicola* oriundos de folhas de Manguueira 'Tommy Atkins', mantidos sob condições que simulam a temperatura ambiente (26 a 30°C), e métodos de inoculação com e sem ferimento.

5 DISCUSSÃO

Os isolados oriundos de folhas, ramos e frutos de goiabeiras e de folhas de mangueiras, inoculados em folhas de goiabeiras 'Paluma', foram capazes de ocasionar lesões, e os sintomas foram semelhantes àqueles dos quais os isolados foram obtidos, cumprindo o postulado de Koch. Da mesma forma, os isolados provenientes de folhas de mangueiras também se mostraram patogênicos quando inoculados em folhas de mangueiras 'Tommy Atkins'.

Indivíduos do gênero *Pestalotiopsis*, até recentemente, eram taxonomicamente classificados com base nas características morfológicas e chaves taxonômicas (BARNETT; HUNTER, 1998). Mediante esses parâmetros, inicialmente, todos os isolados no presente estudo haviam sido classificados como pertencentes ao gênero *Pestalotiopsis*. Porém, dentre 27 isolados estudados, apenas um deles foi classificado como *Pestalotiopsis*, após estudos moleculares, considerados fundamentais para classificação taxonômica de espécies fúngicas (CROUS; HAWKSWORTH; WINGFIELD, 2015).

Pestalotiopsis e *Pestalotia* são gêneros de fungos cuja classificação na literatura se mostra confusa ou dúbia, às vezes mostram-se como gêneros conspecíficos (ELLIOTT, 2015), e o sequenciamento de apenas uma região gênica para a identificação de espécies desse fungo mostra-se inconsistente. Além disso, espécies deste gênero têm sido nomeadas sem nenhum parâmetro genético, sendo a classificação baseada apenas no hospedeiro de origem (HYDE et al., 2014; CROUS; HAWKSWORTH; WINGFIELD, 2015), como são os casos de *Pestalotiopsis psidii* e *Pestalotiopsis mangiferae*, que foram associadas na literatura a lesões em goiabeiras e mangueiras, respectivamente (KEITH; VELASQUEZ; ZEE, 2006; ISMAIL; CIRVILERI; POLIZZI, 2013).

De acordo com os resultados das análises filogenéticas da região ITS deste estudo, essas espécies parecem ser conspecíficas com as espécies do gênero *Neopestalotiopsis*.

Todos os isolados oriundos de goiabeiras foram classificados como pertencentes ao gênero *Neopestalotiopsis* spp., enquanto os isolados oriundos de mangueiras foram classificados como *Pseudopestalotiopsis theae* (M.L.MA26) e como *Pestalotiopsis trachicarpicola* (M.L.MA27). O fato de os isolados oriundos de

folhas de mangueira 'Tommy Atkins' pertencerem a gêneros e espécies diferentes entre si e em relação aos demais isolados oriundos de goiabeiras, pode corresponder à capacidade biológica de infectar tecidos foliares, em que isolados de *Pseudopestalotiopsis theae* e *Pestalotiopsis trachicarpicola* requerem ferimentos prévios para infectar o tecido, enquanto os isolados de *Neopestalotiopsis* spp. se mostram mais patogênicos, sendo capazes de ocasionar sintomas em folhas inoculadas mesmo na ausência de ferimentos. Essa classificação em gênero e espécie, conferida no presente estudo, poderá ser modificada quando de nova revisão taxonômica do complexo *Pestalotioid*.

Neste estudo, foi demonstrado na análise filogenética que várias espécies de *Neopestalotiopsis* podem ser conspecíficas. E por meio de testes de patogenicidade, isolados oriundos de folhas de mangueiras 'Tommy Atkins' mostraram-se patogênicos em folhas de goiabeira 'Paluma', mostrando ausência de especificidade de hospedeiro, não podendo correlacionar a identificação da espécie da qual o hospedeiro proveio. Dessa forma, a classificação deste gênero necessita de uma revisão acurada (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2011; ZHANG et al., 2013).

Uma recente revisão do gênero *Pestalotiopsis*, realizada por Maharachchikumbura et al. (2014), já combina dados morfológicos e moleculares. As análises filogenéticas foram sustentadas pelo sequenciamento das regiões ITS e genes parciais de β -tubulina (TUB) e fator de alongamento 1- α (TEF1). Nesta análise, várias espécies, classificadas anteriormente como *Pestalotiopsis*, foram realocadas para novos gêneros, *Neopestalotiopsis* e *Pseudopestalotiopsis*, constituindo no Complexo *Pestalotioid*. O presente trabalho corrobora esta classificação, tanto na análise de ITS quanto na análise de sequências ITS e TEF1 concatenadas. Os resultados são indicativos de que a confusão na classificação das espécies também pode estar relacionada à baixa qualidade na obtenção de sequências de DNA e nas análises filogenéticas disponibilizadas na literatura. O sequenciamento de vários genes, a acurácia nas análises e a utilização de métodos filogenéticos apropriados estão diretamente relacionados com a classificação correta dessas espécies fúngicas (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014).

Assim, devido à grande confusão das espécies depositadas no banco de dados, não foi possível aferir a espécie dos isolados classificados como

Neopestalotiopsis. No entanto, este estudo é pioneiro na identificação deste gênero em goiabeiras no mundo. Tal gênero foi relatado ocorrendo apenas em *Vismia guianensis*, *Lycopersicon esculentum*, *Fragaria x ananassa Duch*, *Cocos nucifera* e *Mangifera indica* (SILVÉRIO et al., 2016; AYOUBI; PARI, 2016; CHAMORRO et al., 2016; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014). Este trabalho também é pioneiro em descrever a presença de gênero e espécie em mangueira, a *Pseudopestalotiopsis theae*; essa espécie, antes classificada como *Pestalotiopsis theae*, foi descrita ocorrendo em *Camellia sinensis* (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2013a; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014). O gênero *Pestalotiopsis* já foi descrito ocorrendo em mangueiras (ISMAIL et al., 2013); no entanto, a espécie *Pestalotiopsis trachicarpicola*, encontrada em mangueiras no presente estudo, foi relatada ocorrendo em *Schima sp.*, *Podocarous macrophyllus* e *Chrysophyllum sp.* (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014).

Os sintomas dos quais os isolados do estudo foram obtidos, são de fato semelhantes àqueles relatados na literatura em folhas, frutos (KEITH; ZEE, 2010) e em ramos de goiabeiras (CARDOSO et al., 2002), associados a *Pestalotiopsis spp.* e *Pestalotiopsis psidii*. Os autores relataram que os sintomas visíveis no tecido de frutos jovens progrediram à medida que os frutos ficaram maiores e amadureceram. No Brasil, há relatos de *Pestalotiopsis psidii* ocorrendo em frutos de goiabeiras em pós-colheita (FISCHER et al., 2011), sendo este o primeiro relato da ocorrência de fungos semelhantes a *Pestalotiopsis* em frutos de goiabeiras pré-colheita, no Brasil.

Muitas vezes, os sintomas de fungos semelhantes a *Pestalotiopsis*, também denominados de Complexo *Pestalotioid*, em frutos encontram-se na presença de *Colletotrichum* (SERRA; COELHO, 2007), que certamente contribui para a sua entrada, inclusive em folhas, uma vez que fungos deste gênero não necessitam de ferimento para se instalarem (SOUZA et al., 2013). No presente estudo, no teste de patogenicidade, foi constatado que *Pseudopestalotiopsis theae* (M.L.MA26), e como *Pestalotiopsis trachicarpicola* (M.L.MA27) não foram capazes de infectar as folhas inoculadas sem ferimentos, comprovando a necessidade de ferimento no tecido do hospedeiro para ocorrer a infecção.

Neste estudo, no teste de patogenicidade, constatou-se que em folhas previamente feridas, inoculadas com *Neopestalotiopsis*, as lesões desenvolveram-se

mais cedo e tornaram-se maiores com o passar do tempo, quando comparadas com as folhas inoculadas sem ferimentos, o que corrobora as observações de Keith e Zee (2010) ao inocularem isolados de *Pestalotiopsis* em folhas de goiabeira. Já os isolados de *Pestalotiopsis* e *Pseudopestalotiosis*, oriundos de mangueiras, ocasionaram lesões apenas quando foram inoculados em folhas com ferimento prévio, fato este também constatado por Rivera e Wright (2000) em estudos com isolados de *Pestalotiopsis*. Dessa forma, ferimentos nas folhagens, ramos e frutos, ocasionados por aplicações de agroquímicos e demais manejos agrícolas, como podas, podem promover o aparecimento de sintomas ocasionados por fungos semelhantes a *Pestalotiopsis* (HOPKINS; MCQUILKEN, 2000).

Todos os isolados submetidos ao teste de patogenicidade em goiabeiras ocasionaram sintomas característicos de *Pestalotiopsis* citados na literatura (KEITH; VELASQUEZ; ZEE, 2006; KEITH; ZEE, 2010). Da mesma forma, os sintomas observados em mangueiras a campo e nos testes de patogenicidade assemelham-se àqueles previamente descritos por Ismail et al. (2013) e Maharachchikumbura et al. (2013a) como sendo ocasionados por *Pestalotiopsis*. No Brasil, há relatos de *Pestalotiopsis* ocasionando lesões em frutos de mangueiras e goiabeiras, assim como em ramos de goiabeiras (CARDOSO et al., 2002; FISCHER et al., 2011; MENDES et al., 1998; KRUSCHEWSKY et al., 2014). Porém, não há relato deste fungo ocasionando lesões em folhas, sendo este estudo pioneiro nesta descrição.

A falta de especificidade dos isolados obtidos de mangueiras, que ocasionaram sintomas em folhas de goiabeiras, está amparada por resultados já relatados na literatura. A mesma espécie de *Pestalotiopsis* pode ser encontrada em diferentes hospedeiros (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2011; ZHANG et al., 2013; HYDE et al., 2014). Embaby (2007) verificou que isolados de *Pestalotiopsis* de morango foram capazes de ocasionar sintomas em frutos de diferentes espécies de plantas, por exemplo, pêssego, tomate e goiaba.

Da mesma forma que os gêneros de fungo em estudo não possuem especificidade quanto ao hospedeiro, estes também não são específicos quanto ao tecido vegetal, como demonstrado nos testes de patogenicidade. A baixa especificidade de tecidos vegetais e de hospedeiros pode resultar em fontes de

inóculo do patógeno em plantas, na proximidade de pomares comerciais, como salientado por Keith, Velasquez e Zee (2006).

O fator temperatura também é importante na infecção por espécies do complexo *Pestalotioid*. Como observado nos testes de patogenicidade, a temperatura mais elevada (26°C a 30°C) mostrou-se mais favorável para a ocorrência e o desenvolvimento das lesões, assim como observado por Keith e Zee (2010), que relataram a temperatura ideal para o desenvolvimento de *Pestalotiopsis* em goiaba de 26°C a 35°C. De acordo com Maharachchikumbura et al. (2011, 2012), esses patógenos são comuns em ecossistemas tropicais e temperados, e desenvolvem-se melhor em temperaturas elevadas.

Desta forma, a identificação dos agentes causais dos sintomas atípicos, encontrados em condições de campo, e associados ao complexo *Pestalotioid*, em goiabeiras e mangueiras, e o estudo da epidemiologia do fungo, em condições laboratoriais, são importantes contribuições ao estudo etiológico da “pinta-vermelha” da goiaba, assim como os demais sintomas descritos e associados a folhas, frutos e ramos de goiabeira, e também a folhas de mangueira. Estudos adicionais relativos à conclusão taxonômica das espécies, assim como à epidemiologia e manejo dessas doenças fazem-se necessários. Essas informações são fundamentais para adoção de medidas fitossanitárias para o controle de patógenos do complexo *Pestalotiopsis* (YANG, 2014).

6 CONCLUSÕES

Concluiu-se que o gênero *Neopestalotiopsis* está associado a lesões em frutos, folhas e ramos de goiabeiras, em três municípios do Estado de São Paulo, cuja patogenicidade foi comprovada por inoculação em folhas de goiabeira 'Paluma' em condições laboratoriais. Trata-se do primeiro relato desse gênero de fungo em associação com goiabeira, no mundo. Lesões em folhas de mangueiras 'Tommy Atkins', por sua vez, estão associadas às espécies *Pseudopestalotiopsis theae* e *Pestalotiopsis trachicarpicola*, cuja patogenicidade foi comprovada em folhas de mangueiras e goiabeiras. É o primeiro relato mundial da ocorrência do gênero e da espécie *Pseudopestalotiopsis theae* em mangueiras, assim como o primeiro relato da espécie *Pestalotiopsis trachicarpicola*.

7 REFERÊNCIAS

AGRIANUAL: anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: AgraFNP, 2016. 296p.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 922p.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, p. 403-410, 1990.

ARZANLOU, M.; NARMANI, A.; MOSHARI, S.; KHODAEI, S.; BABABI-AHARI. *Truncatella angustata* associated with grapevine trunk disease in Northern Iran. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, London, v. 46, n. 10, p. 1168-1181, 2013.

AYOUBI, N.; PARI, S.S. Morphological and molecular identification of *Neopestalotiopsis mesopotamica* causing tomato fruit rot. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v. 123, n. 6, p. 267-271, 2016.

BARBOSA, J. C.; MALDONADO JÚNIOR, W. **Experimentação agronômica e AgroEstat** – sistema para análises estatísticas de ensaios agronômicos. Jaboticabal: FUNEP, 2015. v.1, 396p.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4. ed. Saint Paul: American Phytopathology Society Press, 1998. 218p.

BATISTA, D. C.; BARBOSA, M. A. G. Doenças da mangueira. In: In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE VITIVINICULTURA, 1.; FEIRA NACIONAL DA AGRICULTURA IRRIGADA - FENAGRI, 2008, Petrolina. Minicursos. Petrolina: Prefeitura Municipal: **Anais...** Embrapa Semiárido, 2008.

BRAZILIAN FRUIT. Disponível em: <www.finedininglovers.com/stories/brazilian-fruit-list/>. Acesso em: 20 jan. 2017.

CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, Lawrence, KS, v. 91, p. 553-556, 1999.

CARDOSO, J. E.; MAIA, C. B.; PESSOA, M. N. G. Ocorrência de *Pestalotiopsis psidii* e *Lasiodiplodia theobromae* causando podridão no caule da goiabeira no Ceará. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, n. 3, p. 320, 2002.

CHAMORRO, M.; AGUADO, A.; DE LOS SANTOS, B. First report of root and crown rot caused by *Pestalotiopsis clavispora* (*Neopestalotiopsis clavispora*) on strawberry in Spain. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 100, n. 7, p. 1495, 2016.

COLLETTI, A. R. S.; FISCHER, I. H.; SILVIA, A. L. Incidence of postharvest diseases on 'Kumagai' and 'Pedro Sato' guavas at wholesale markets in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília-DF, v.39, n.6, p:478-482, 2014.

CROUS, P. W.; HAWKSWORTH, D. L.; WINGFIELD, M. J. Identifying and Naming Plant-Pathogenic Fungi: Past, Present, and Future. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 53, p. 247–267, 2015.

DUBE, H. C.; BILGRAMI, K. S. Pestalotia or Pestalotiopsis?, **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, Deen Hang, v. 29, p. 33–54, 1965.

EL-ARGAWY, E. Characterization and control of *Pestalotiopsis* spp. the causal fungus of guava scabby canker in el-beheira governorate, Egypt. **International Journal of Phytopathology**, Rawalpindi, v. 4, n. 3, p. 121-136, 2015.

EDGAR, R. C. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.32, p. 1.792-1.797, 2004.

ELLIOTT, M. L. *Pestalotiopsis* (*Pestalotia*) Diseases of Palm 2015. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/PP/PP14100.pdf>> Acesso em: 21 out. 2016.

EMBABY, E. M. *Pestalotia* fruit rot on strawberry plants in Egypt. **Egyptian Journal of Phytopathology**, Cairo, v. 35, n. 2, 2007.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred II. Error probabilities. **Genome Research**, New York, v. 8, p. 186-194, 1998.

FISCHER, I. H.; DE ARRUDA, M. C.; DE ALMEIDA, A. M.; MONTES, S. M. N. M.; JERÔNIMO, E. M.; SIMIONATO, E. M. R. S.; DE ALMEIDA BERTANI, R. M. Doenças e características físicas e químicas pós-colheita em manga. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 107-116, 2009.

FISCHER, I. H.; ALMEIDA, A. M.; ARRUDA, M. C.; BERTANI, R. M. A.; GARCIA, M. J. M.; AMORIM, L. Danos em pós-colheita de goiabas na região do centro-oeste paulista. **Bragantia**, Bragantia, v. 70, n. 3, p. 570-576, 2011.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, New York, v. 8, n. 3, p. 195-202, 1998.

GREEN, P. **PHRAD documentation**. 1996. Disponível em: <<http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>.> Acesso em: 4 jan. 2017.

GUBA, E. F. *Monochaetia* and *Pestalotia* vs. *Truncatella*, *Pestalotiopsis* and *Pestalotia*. **Annals of Microbiology**, Milano, v. 7, p. 74–76, 1956.

GUBA, E. F. **Monograph of *Pestalotia* and *Monochaetia***. Cambridge: Harvard University Press, 1961.

HOPKINS, K. E.; MCQUILKEN, M. P. Characteristics of *Pestalotiopsis* associated with hardy ornamental plants in the UK. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 106, n. 1, p. 77-85, 2000.

HYDE, K. D.; NILSSON, R. H. ; ALIAS, S. A.; ARIYAWANSA, H. A.; BLAIR, J. E.; CAI, L. et al. One stop shop: backbone trees for important phytopathogenic genera: I. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 67, p. 21–125, 2014.

ISMAIL, A. M.; CIRVILERI, G.; POLIZZI, G. Characterisation and pathogenicity of *Pestalotiopsis uvicola* and *Pestalotiopsis clavisoraca* causing grey leaf spot of mango (*Mangifera indica* L.) in Italy. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 135, p. 619–625, 2013.

JACOBS, A.; TRUTER, M.; SCHOEMAN, M. H. Characterization of *Mycosphaerella* species associated with pink spot on guava in South Africa. **South African Journal of Science**, Johannesburg, v. 110, n. 9-10, p. 01-06, 2014.

JAYAWARDENE, R. S.; ZHANG, W.; LIU, M.; MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N.; ZHOU, Y.; HUANG, J. B.; NILTHONG, S.; WANG, Z. Y.; LI, X. H.; YAN, J. Y.; HYDE, K. D. Identification and characterization of *Pestalotiopsis*-like fungi related to grapevine diseases in China. **Fungal Biology**, Oxford, v.119, n. 5, p. 348–361, 2015.

JEEWON, R.; LIEW, E. C. Y.; HYDE, K. D. Phylogenetic evaluation of species nomenclature of *Pestalotiopsis* in relation to host association. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 17, p. 39–55, 2004.

JEEWON, R.; LIEW, E. C. Y.; SIMPSON, J. A.; HODGKISS, I. J.; HYDE, K. D. Phylogenetic significance of morphological characters in the taxonomy of *Pestalotiopsis* species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 27, p. 372-383, 2003.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. Mafft Multiple Sequence Alignment Software Version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 30, n. 4, p. 772-780, 2013.

KEITH, L. M.; VELASQUEZ, M. E.; ZEE, F. T. Identification and characterization of *Pestalotiopsis* spp. causing scab disease of guava, *Psidium guajava*, in Hawaii. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, p. 16-23, 2006.

KEITH, L. M.; ZEE, F. T. Guava diseases in Hawaii and the characterization of *Pestalotiopsis* spp. affecting guava. **Acta Horticulturae**, Leuven, p. 269-276, 2010.

KO, Y.; YAO, K. S.; CHEN, C. Y.; LIN, C. H. First report of gray leaf spot of mango (*mangifera indica*) caused by *Pestalotiopsis mangiferae* in Taiwan. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, n. 12, p. 1.684-1.684, 2007.

KÖPPEN, W.; GEIGER, R. **Handbuch der klimatologie**. Berlin: Gebrüder Borntraeger, 1930.

KRUSCHEWSKY, M. C.; LUZ, E. D. M. N.; BEZERRA, J. L. O gênero *Pestalotiopsis* (*Ascomycota*, 'Coelomycetes') no Brasil. **Agrotropica**, Itabuna, v. 26, n. 2, p. 89-98. 2014.

KURAMAE-IZIOKA, E. E. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloesporioides* and *Fusarium oxysporum*. **Revista Unimar**, Maringá, v. 19, p. 683-689, 1997.

LIU, A. R.; CHEN, S. C.; WU, S. Y.; XU, T.; GUO, L. D.; JEEWON, R.; WEI, J. G. Cultural studies coupled with DNA based sequence analyses and its implication on pigmentation as a phylogenetic marker in *Pestalotiopsis* taxonomy. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 57, n. 2, p. 528-535, 2010.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N.; CHUKEATIROTE, E.; GUO, L. D. *Pestalotiopsis* species associated with *Camellia sinensis* (tea). **Mycotaxon**, Ithaca, v. 123, p. 47–61, 2013a.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N.; GUO, L. D.; CHUKEATIROTE, E.; BAHKALI, A. H.; HYDE, K. D. *Pestalotiopsis*—morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 50, n. 1, p. 167-187, 2011.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N.; GUO, L. D., CAI, L.; CHUKEATIROTE, E.; WU, W. P.; SUN, X., CROUS, P. W.; BHAT, D. J., MCKENZIE, E. H. C.; BAHKALI, A. H.; HYDE, K. D. A multi-locus backbone tree for *Pestalotiopsis*, with a polyphasic characterization of 14 new species. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v.56, p. 95-129, 2012.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N.; HYDE, K. D.; GROENEWALD, J. Z.; XU, J.; CROUS, P. W. *Pestalotiopsis* revisited. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 79, p. 121–186, 2014.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N.; LARIGNON, P.; HYDE, K. D.; AL-SADI, A. M.; LIU, Z. Y. Characterization of *Neopestalotiopsis*, *Pestalotiopsis* and *Truncatella* species associated with grapevine trunk diseases in France. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 55, n. 3, p. 380-390, 2016.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N.; ZHANG, Y. M.; WANG, Y. *Pestalotiopsis anacardiacearum* sp. nov. (*Amphisphaeriaceae*) has an intricate relationship with *Penicillaria jocosatrix*, the mango tip borer. **Phytotaxa**, Auckland, v. 99, p. 49–57, 2013b.

MENDES, M.A.S.; SILVA, V.L.; DIANESE, J.C.; FERREIRA, M.A.S.V.; SANTOS, C.E.N.; GOMES NETO, E.; URBEN, A.F.; CASTRO, C. **Fungos em plantas no Brasil**. Brasília, DF: EMBRAPA, 1998.

MENEZES, M. Doenças do cajueiro In: HIROSHI, K. **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. 2 v, cap.18, p.193-199.

MISRA, A. K. Guava diseases — their Symptoms, causes and management. In: NAQVI, S. A. M. H. **Diseases of fruits and vegetables**. Netherlands: Springer 2004. v.2, p. 81-119.

MOREAU, C. Micomycetes africains. I. **Revue de Mycologie, Suppliment Colonial**, Paris, v. 14, p. 15-22, 1949.

NAG RAJ, T. R. **Coelomycetous anamorphs with appendage bearing conidia**. Waterloo: Mycologue publications, 1993.

NAG RAJ, T. R. Redisposals and redescrptions in the *Monchaetia Seiridium*, *Pestalotia-Pestalotiopsis* complexes. I. The correct name for the type species of *Pestalotiopsis*. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 22, p. 43–51, 1985.

NAG RAJ, T. R. Redisposals and redescrptions in the *Monochaetia-Seiridium*, *Pestalotia-Pestalotiopsis* complexes. II. *Pestalotiopsis besseyii* (Guba) comb. nov. and *Pestalosphaeria varia* sp. nov. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 22, p. 52–63, 1985.

NISHIJIMA, W. Mango diseases and their control. (2009). Disponível em: <http://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/hitahr_04-06-93_20-24.pdf>. Acesso em: 7 jan. 2016.

O'DONNELL, K.; KISTLER, H. C.; CIGELNIK, E.; PLOETZ, R. C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 95, p. 2.044 – 2.049, 1998.

PLOETZ, R. C. Diseases of Mango. In: PLOETZ, R. C. (Ed.). **Diseases of tropical fruit crops**, Oxford: CABI Publishing, 2003. p. 327-363.

POSADA, D.; BUCKLEY, T. R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike Information Criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. **Systematic Biology**, Oxford, v. 53, n. 5, p. 793-808, 2004.

PRUSKY, D.; KOBILER, I.; MIYARA, I.; ALKAN, N. Fruit diseases. In: LITZ, R. E, (Ed.). **The mango, botany, production and uses**. Wallingford: CAB International, 1997. p. 201-230.

RIVERA, M. C.; WRIGHT, E. R. (2000). First report of azalea petal blight caused by *Pestalotiopsis guepini* in Argentina. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n. 1, p. 100, 2000.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, Oxford, v. 19, n. 12, p. 1.572-1.574, 2003.

SERRA, I. M. R. S.; COELHO, R. S. B. Mancha de *Pestalotiopsis* em helicônia: caracterização da doença e potenciais fontes de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília-DF, v. 32, p. 44-49, 2007.

SILVÉRIO, M. L.; CALVACANTI, M. A. Q.; SILVA, G. A.; OLIVEIRA, R. J. V.; BEZERRA, J. L. A new epifoliar species of *Neopestalotiopsis* from Brazil. **Agrotropica**, Itabuna, v. 28, n. 2, p.151-158, 2016.

SOARES-COLLETTI, A. R.; FISCHER, I. H.; LOURENÇO, S. A. Incidence of postharvest diseases on 'Kumagai' and 'Pedro Sato' guavas at wholesale markets in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 39, n. 6, p. 478-482, 2014.

SOUZA, A.; CARBONI, R. C. D.; WICKERT, E.; LEMOS, E. G. M.; GOES, A. Lack of host specificity of *Colletotrichum* spp. isolates associated with anthracnose symptoms on mango in Brazil. **Plant Pathology**, Oxford, v. 62, p. 1.038-1.047, 2013.

STEYAERT, R. L. Contribution à l'étude monographique de *Pestalotia* de Not. et Monochaetia Sacc.(*Truncatella* gen. nov. et *Pestalotiopsis* gen. nov.). **Bulletin du Jardin botanique de l'Etat,/Bulletin van den Rijksplantentuin**, Bruxelles, p. 285-347, 1949.

STÖVER, B. C.; MÜLLER, K. F. TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **BMC Bioinformatics**, London, v. 11, p. 7, 2010.

SURYANARAYANAN, T. S.; MURALI, T. S.; THIRUNAVUKKARASU, N.; RAJULU, M. G.; VENKATESAN, G.; SUKUMAR, R. Endophytic fungal communities in woody perennials of three tropical forest types of the Western Ghats, southern India. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 20, n. 5, p. 913-928, 2011.

SUTTON, B. C. **The Coelomycetes e fungi imperfecti with acervuli and stromata**. Slough: CABI Publishing, 1980.

URBEZ-TORRES, J. R.; PEDUTO, F.; STRIEGLER, R. K.; URREA-ROMERO, K. E.; RUPE, J. C.; CARTWRIGHT, R. D.; GUBLER, W. D. Characterization of fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Arkansas and Missouri. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 52, n. 1, p. 169-189, 2012.

VENTURA, J. A.; COSTA, H. Doenças da goiabeira. In: FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E.; VAIANA, F. M. P. (Ed.). **Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial**. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p. 227-267.

WATANABE, K.; NAKAZONO, T.; ONO, Y. Morphology evolution and molecular phylogeny of *Pestalotiopsis* (*Coelomyces*) based on ITS2 secondary structure. **Mycoscience**, Tóquio, v. 53, n. 3, p. 227-237, 2012.

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.; WITHE, T. J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academy Press, 1990.

WICKERT, E.; SOUZA, A.; PEREIRA, R. M.; KISHI, L. T.; LEMOS, E. G. M.; GOES, A. Molecular and Pathogenic Study of *Guignardia* spp. Isolates Associated to Different Hosts. **Advances in Microbiology**, Irvine, v. 4, p. 116-125, 2014.

XU, J.; EBADA, S. S.; PROKSCH, P. *Pestalotiopsis* a highly creative genus: chemistry and bioactivity of secondary metabolites. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 44, n. 1, p. 15-31, 2010.

XU, J.; YANG, X.; LIN, Q. Chemistry and biology of *Pestalotiopsis*-derived natural products. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 66, n. 1, p. 37-68, 2014.

YANG, M. **The studies revised the genera *Pestalotiopsis* and *Bipolaris* based on morphological characters and molecular data**. Kunming: Kunming Institute of Botany, CAS All Rights Reserved, 2012. Disponível em: <http://english.kib.cas.cn/rh/rp/201412/t20141215_133146.html>. Acesso em: 21 out. 2016.

YONGTAO, Y.; TAK-WAH, L.; HING-FUNG, T. PnpProbs: a better multiple sequence alignment tool by better handling of guidetrees. **BMC Bioinformatics**, London, v. 17, p. 633-643, 2016.

ZHANG, Z.; YANG, D.; YANG, B.; GAO, Z.; LI, M.; JIANG, Y. H. β -Aminobutyric acid induces resistance of mango fruit to postharvest anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* and enhances activity of fruit defense mechanisms. **Scientia Horticulturae**, New York, v. 160, p. 78-84, 2013.