

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

**DIVERSIDADE DE POPULAÇÕES DE *Phyllosticta* spp. DE
GOIABEIRAS E DE MANGUEIRAS EM DIFERENTES
AMBIENTES**

**Roberta Cristina Delphino Carboni
Engenheira Agrônoma**

2014

**D
I
S
S.**

/

**C
A
R
B
O
N
I**

**R.
C.
D.**

2

0

1

4

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

**DIVERSIDADE DE POPULAÇÕES DE *Phyllosticta* spp. DE
GOIABEIRAS E DE MANGUEIRAS EM DIFERENTES
AMBIENTES**

Roberta Cristina Delphino Carboni

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Goes

Co-orientadora: Profa. Dra. Lucia Maria Carareto Alves

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).

2014

Carboni, Roberta Cristina Delphino
C264d Diversidade de populações de *Phyllosticta* spp. de goiabeiras e de
mangueiras em diferentes ambientes / Roberta Cristina Delphino
Carboni. -- Jaboticabal, 2014
vi, 59 f.: il.; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014

Orientador: Antonio de Goes

Banca examinadora: Edson Luiz Furtado, Alessandro de Mello
Varani

Bibliografia

1. *Mangifera indica* L. 2. Calagem. 3. Nutrição de Plantas. 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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

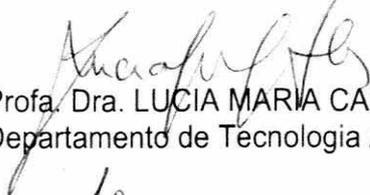
TÍTULO: DIVERSIDADE DE POPULAÇÕES DE *Phyllosticta* spp. DE GOIABEIRAS E DE MANGUEIRAS EM DIFERENTES AMBIENTES

AUTORA: ROBERTA CRISTINA DELPHINO CARBONI

ORIENTADOR: Prof. Dr. ANTONIO DE GOES

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. LUCIA MARIA CARARETO ALVES

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


Profa. Dra. LUCIA MARIA CARARETO ALVES

Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. ALESSANDRO DE MELLO VARANI

Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. EDSON LUIZ FURTADO

Departamento de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrícolas de Botucatu

Data da realização: 27 de fevereiro de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ROBERTA CRISTINA DELPHINO CARBONI - nascida em 03 de novembro de 1987, em Jaboticabal-SP, é Engenheira Agrônoma formada pela Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' (UNESP), Jaboticabal-SP, em fevereiro de 2012. Durante a graduação, estagiou, no período de março de 2007 a maio de 2011, junto ao Departamento de Fitossanidade, no Laboratório de Fitopatologia, na área de fitopatologia, e no período de março de 2008 a dezembro de 2010, no Departamento de Tecnologia, no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas, na área de genética de populações de fitopatógenos, como bolsista do CNPq e, posteriormente, FAPESP, sob orientação do Prof. Dr. Antonio de Goes e co-orientação da MSc. Andressa de Souza. O Estágio de Conclusão de Curso foi realizado junto à Oxiquímica Agrociência Ltda., localizada em Jaboticabal-SP, no período de junho de 2011 a dezembro de 2011, no setor de Pesquisa e Desenvolvimento de novas formulações de nutrientes foliares e agrotóxicos, com bolsa de complementação educacional. Concluiu a graduação com o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "Caracterização molecular e patogênica de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* associados a sintomas de antracnose em mangueiras (*Mangifera indica* L.)". Em 2012, ingressou no curso de Pós-Graduação, Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, pela UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como bolsista CAPES, sob orientação do Prof. Dr. Antonio de Goes e co-orientação da Profa. Dra. Lucia Maria Carareto Alves.

“Andei...

Por caminhos difíceis, eu sei.

Mas olhando o chão sob meus pés, vejo a vida correr.

E assim a cada passo que der

Tentarei fazer o melhor que puder.

Aprendi...

Não tanto quanto quis, mas vi que conhecendo

O universo ao meu redor eu aprendo a me conhecer melhor;

Assim escutarei o tempo que me ensinará

A tomar a decisão certa a cada momento.

E partirei...

Em busca de muitos ideais,

Mas sei que hoje se encontram meu passado, presente e futuro.

Hoje sinto em mim a emoção da despedida.

Hoje é o ponto de chegada.

Mas, ao mesmo tempo, tempo de partida”.

(Autor desconhecido)

Dedico

*Aos meus pais, Aduino e Marina, por todos os momentos de alento, por todo amor,
orgulho e força.*

Ofereço

*Ao meu namorado Lucas, com carinho e eterna gratidão, pelo apoio, companheirismo
e amor incondicionais.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, acima de tudo, por me dar força, paciência e sabedoria nos momentos mais difíceis.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos durante o curso de Mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de auxílio financeiro que possibilitaram o desenvolvimento do projeto de pesquisa que originou essa dissertação.

À Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) - Polo Regional Centro Norte – Pindorama e, em especial, à Dra. Juliana Altafin Galli, por conceder gentilmente as áreas de banco de germoplasma para realização das coletas.

Ao Laboratório de Fitopatologia, ao Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) e ao Laboratório de Epidemiologia Molecular, que disponibilizaram toda estrutura necessária para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Antonio de Goes, pelo qual tenho profundo respeito e admiração. Obrigada pela orientação, amizade, pelos ensinamentos e contribuição em meu aprendizado, que contribuíram para a realização desse projeto.

À querida Andressa, por toda sua dedicação, paciência e valiosos ensinamentos que contribuíram para a minha formação. Muito obrigada por me apoiar e me auxiliar nos momentos mais difíceis.

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Lucia Maria Carareto Alves, Prof. Dr. Edson Luiz Furtado e Prof. Dr. Alessandro de Mello Varani, pelas correções e sugestões que contribuíram, e muito, para enriquecimento do meu trabalho.

Às colegas do Laboratório de Epidemiologia Molecular (Luciana, Mariah e Cíntia), pela amizade e força nos momentos difíceis.

Aos meus queridos pais, pelo amor, compreensão e apoio em todos os momentos da minha vida.

Ao meu namorado Lucas pelo companheirismo, cumplicidade, apoio, carinho e amor e por todo apoio nas horas mais difíceis.

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

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Características do gênero <i>Phyllosticta</i> e etiologia do fungo	3
2.2. Plantas hospedeiras de <i>Phyllosticta</i>	5
2.3. Identificação das espécies de <i>Phyllosticta</i> spp.	7
2.4. Sequenciamento e análise de diversidade genética	8
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1. Obtenção dos isolados de <i>Phyllosticta</i> spp.....	12
3.2. Caracterização fenotípica das colônias de <i>Phyllosticta</i> spp.	14
3.3. Extração de DNA	14
3.4. Sequenciamento do DNA e análise dos dados	15
3.4.1. Amplificação do DNA.....	15
3.4.2. Análise das sequências	17
3.5. Análises das relações filogenéticas	17
3.6. Desenvolvimento dos marcadores fAFLP	22
3.6.1. Restrição do DNA	22
3.6.2. Ligação dos adaptadores	23
3.6.3. Pré-amplificação	24
3.6.4. Amplificação seletiva.....	25
3.6.5. Análise dos dados de fAFLP	27
4. RESULTADOS	28
4.1. Obtenção dos isolados de <i>Phyllosticta</i> spp.....	28
4.2. Sequenciamento e análise das relações filogenéticas	28
4.3. Desenvolvimento dos marcadores fAFLP	36
5. DISCUSSÃO.....	41
6. CONCLUSÃO	45
7. REFERÊNCIAS	46

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Origem das amostras de folhas assintomáticas de goiabeiras e de mangueiras e de frutos sintomáticos de goiabeiras	13
Tabela 2. Códigos de acesso de isolados de <i>Guignardia</i> e <i>Phyllosticta</i> presentes no banco de dados GenBank. As sequências de DNA destes isolados foram alinhadas às sequências de DNA dos isolados deste estudo.....	18
Tabela 3. Programa do termociclador para amplificação seletiva.....	26
Tabela 4. Origem dos isolados de <i>Phyllosticta</i> e os códigos usados para sua nomenclatura: (hospedeiro) + (área de coleta) + (procedência) + (tecido vegetal) . (aspecto da colônia) + (número do isolado) = (número de isolados obtidos)	30
Tabela 5. Média da distância genética dentro dos grupos e dentro dos subgrupos, e distância genética (d_A) entre grupos e subgrupos.	41

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representação esquemática do ciclo de vida de <i>Phyllosticta</i> em videira como estados anamórfico e teleomórfico (WIKKEE et al., 2011).....	5
Figura 2. Ação das enzimas de restrição <i>EcoRI</i> e <i>MseI</i>	23
Figura 3. Ligação dos adaptadores, uma sequência conhecida de 20 nucleotídeos que será utilizada posteriormente como primer.	24
Figura 4. Pré-amplificação usando 'A' como nucleotídeo seletivo no iniciador <i>EcoRI</i> e 'C' no <i>MseI</i>	25
Figura 5. Amplificação seletiva, na qual pode ser acrescentado nucleotídeos às extremidades 3' dos primers de acordo com o polimorfismo esperado. Os primers <i>EcoRI</i> são marcados com fluorescência (Δ).	25
Figura 6. Padrão de tamanho molecular GeneScan ROX 500 – 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 245, 300, 340, 350, 400, 450, 490 e 500 pb.	27
Figura 7A. Característica fenotípica das colônias de <i>Phyllosticta capitalensis</i>	31
Figura 7B. Característica fenotípica das colônias de <i>Phyllosticta brazilianiae</i>	32
Figura 7C. Característica fenotípica das colônias de <i>Phyllosticta</i> spp.	33
Figura 8. Árvore filogenética gerada pelo método da Máxima Parcimônia a partir do alinhamento concatenado das sequências ITS, ATC e GPDH.....	34
Figura 9. Árvore filogenética gerada pelo método da Máxima Parcimônia a partir do alinhamento concatenado das sequências ITS, ATC e GPDH.....	35

- Figura 10. Leitura dos picos polimórficos dos isolados MBPL22.9 e MBPL23.1, utilizando-se os primers JOE**EcoRI*-G/*MseI*-CA, NED**EcoRI*-C/*MseI*-CA e JOE**EcoRI*-G/*MseI*-CT, por meio do software Genotyper 3.7 36
- Figura 11. Dendrograma formado pelo agrupamento UPGMA obtido pela análise fAFLP. Os 102 isolados do estudo foram subdivididos em quatro grupos, sendo o G1 formado por isolados da espécie *Phyllosticta capitalensis*, o G2 constituído pelo isolado MBPL25.8, classificado como *Phyllosticta* sp., o G3 constituído por indivíduos da espécie *P. brazilianiae* e o G4, formado pelos isolados *Phyllosticta* sp. 37
- Figura 12. Dendrograma formado por isolados de *Phyllosticta* spp. obtido a partir das análises fAFLP. Destaque para o grupo G1 constituído por isolados *Phyllosticta capitalensis*. 39
- Figura 13. Dendrograma formado por isolados de *Phyllosticta* spp. obtido a partir das análises fAFLP. Destaque para os grupos G2, G3 e G4 constituídos por isolados *Phyllosticta* sp., *Phyllosticta brazilianiae* e *Phyllosticta* sp., respectivamente. 40

DIVERSIDADE DE POPULAÇÕES DE *Phyllosticta* spp. DE GOIABEIRAS E DE MANGUEIRAS EM DIFERENTES AMBIENTES

RESUMO – *Phyllosticta* corresponde a um importante gênero de fungos associados ao reino vegetal. Devido à importância econômica dos prejuízos ocasionados por algumas espécies de *Phyllosticta* e ao comportamento cosmopolita das espécies endofíticas, várias pesquisas têm sido realizadas no intuito de identificar e reclassificar as espécies desse gênero. Mediante a aplicação do sequenciamento de diferentes regiões gênicas, novas espécies de *Phyllosticta* foram relatadas recentemente, e concomitante aos novos relatos, surgiram dúvidas acerca da identificação das espécies já relatadas e comumente citadas na literatura. Neste contexto, estudos indicaram que mangueiras são hospedeiras de diferentes espécies endofíticas de *Phyllosticta* spp. e, que *P. capitalensis* pode ocasionar lesões em frutos de goiabeiras, cujos sintomas eram até então atribuídos à outra espécie do gênero. Assim, tendo em vista a reclassificação e identificação de novas espécies, fez-se necessário a realização de estudos do complexo de espécies de *Phyllosticta* ainda não conhecidas, dando continuidade aos trabalhos já realizados no Brasil em mangueiras e goiabeiras, culturas nas quais a identificação do fungo ainda não está bem esclarecida. Para tanto, este trabalho objetivou obter uma coleção atual de isolados de *Phyllosticta* de folhas assintomáticas de goiabeiras e de mangueiras, e de frutos sintomáticos de goiabeiras. Amostras de folhas de ambas as espécies de plantas foram coletadas em bancos de germoplasma e em áreas de produção comercial. Foram selecionados 102 isolados, segundo suas características fenotípicas em meio de cultura, para serem submetidos ao sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2, e dos genes codificadores da actina (ACT) e do gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPDH). Ainda, a fim de corroborar os resultados obtidos pelo sequenciamento e objetivando analisar o perfil genético dos indivíduos, foram empregados marcadores fAFLP (*fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism*). Os isolados foram separados em espécie mediante o emprego de ambas as técnicas, sendo identificadas as espécies *P. capitalensis* ocorrendo em mangueiras e goiabeiras e, *P. brazilianiae* somente em mangueiras, que se mostraram hospedeiras de outras duas espécies de *Phyllosticta* sp., sendo uma delas ainda não relatada na literatura. Noventa e cinco por cento dos isolados *P. brazilianiae* são oriundos de banco de germoplasma, denotando que tal espécie não é comumente encontrada em áreas que recebem tratamento fitossanitário. Em goiabeiras não foram encontradas outras espécies de *Phyllosticta*, indicando que *G. psidii* até então considerada patogênica para goiabeiras e *P. capitalensis* podem ser conspecíficas. Também, mediante a análise fAFLP observou-se um subgrupo formado apenas por isolados obtidos de frutos sintomáticos de goiabeiras provenientes de pomares comerciais, denotando a possibilidade de uma especiação de *P. capitalensis* entre indivíduos endofíticos e patogênicos.

Palavras-chave: *Phyllosticta* spp., *Mangifera indica*, *Psidium guajava*, sequenciamento, diversidade genética, marcadores fAFLP

DIVERSITY OF *Phyllosticta* spp. POPULATIONS FROM GUAVA AND MANGO IN DIFFERENT ENVIRONMENTS

ABSTRACT – *Phyllosticta* corresponds to an important genus of fungi associated with the plant kingdom. Due to the economic importance of damages caused by some species of *Phyllosticta* and the cosmopolitan behavior of endophytic species, several studies have been conducted in order to identify and reclassify species of this genus. Through the application of sequencing of different gene regions, new species of *Phyllosticta* were recently reported, and concomitant to the new reports, doubts were raised about the identification of previously reported and commonly cited species in literature. In this context, studies indicated that mango is hosted by different endophytic species of *Phyllosticta* spp. and that *P. capitalensis* can cause lesions on guava fruits, whose symptoms were previously attributed to other species of the genus. Thus, because of the reclassification and identification of new species, it was necessary to perform studies of the complex of *Phyllosticta* species not yet known, by continuing the work already carried out in Brazil with guava and mango crops in which the identification of the fungus is still unclear. Therefore, this study aimed to obtain a current collection of *Phyllosticta* isolates from asymptomatic leaves of guava and mango, and symptomatic fruits of guava. Leaves samples of both plant species were collected in germplasm banks and in areas of commercial production of the fruits. It were selected 102 isolates, according to their phenotypic characteristics in culture medium, to be submitted to the sequencing of ITS1-5.8S-ITS2, actin (ACT) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GPDH) genes. Also, in order to corroborate the results obtained by sequencing and aiming to analyze the genetic profile of the isolates, fAFLP markers (*fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism*) analysis were applied. Both techniques allowed the separation of isolates according to their species, which were identified as *P. capitalensis* occurring in mango and guava and *P. brazilianiae* only in mango. It was identified other two species of *Phyllosticta* sp. occurring in mango, one of which was not yet reported in the literature. Ninety-five percent of *P. brazilianiae* isolates were from germplasm bank, indicating that this species is not commonly found in areas that receive phytosanitary treatments. Other species in addition to *P. capitalensis* were not found occurring in guava, which indicates that *G. psidii*, until then considered pathogenic for guava, and *P. capitalensis* may be conspecifics. Also, in fAFLP dendrogram it was observed a subgroup formed only by isolates obtained from symptomatic guava fruit of commercial orchards, denoting the possibility of *P. capitalensis* speciation between endophytic and pathogenic individuals.

Key-words: *Phyllosticta* spp., *Mangifera indica*, *Psidium guajava*, sequencing, genetic diversity, fAFLP markers

1. INTRODUÇÃO

Phyllosticta corresponde à fase anamórfica de um importante gênero de fungos associados ao reino vegetal, apresentando ampla abrangência geográfica e comportamento ecológico diferencial (BAAYEN et al., 2002; GLIENKE et al., 2011; WIKKEE et al., 2011). Fungos desse gênero podem apresentar comportamento saprofítico, endofítico e/ou patogênico dependendo do hospedeiro e das condições ambientais as quais os mesmos encontram-se submetidos, destacando-se a *P. citricarpa*, como agente causal da Mancha Preta dos Citros, e a *P. capitalensis* como o endofítico cosmopolita mais isolado (WIKKEE et al., 2013).

Atualmente, espécies de *Phyllosticta* têm sido relatadas com frequência, como endófitos de vários grupos de plantas, como Ericaceae, Musaceae, Myrtaceae e Anacardiaceae (OKANE et al., 2003; WONG et al., 2012; WICKERT et al., 2012), e também como patógenos de várias plantas hospedeiras como citros, bananeiras, videiras, goiabeiras e amoreiras (WONG et al., 2012; WIKKEE et al., 2013; ZHANG et al., 2013; WICKERT et al., 2014).

O termo endofítico compreende os organismos que colonizam, de forma inter ou intracelular, os tecidos dos vegetais, sem causar dano aparente (HYDE e SOYTONG, 2008), enquanto os patogênicos são aqueles que ocasionam danos visíveis e em níveis significativos ao hospedeiro. No entanto, os fungos endofíticos têm ocupado posições de destaque recentemente, pois, apesar de os mesmos serem, na maioria das vezes, benéficos às plantas (ALY et al., 2010), estes podem mudar seu comportamento ecológico, tornando-se patogênicos sob determinadas condições ambientais e/ou fisiológicas em que se encontra o hospedeiro (KOGEL et al., 2006; WIKKEE et al., 2011; HUANG e WANG, 2011).

Nos últimos anos, o sequenciamento de regiões conservadas do DNA de *Phyllosticta* contribuiu de maneira significativa para com o conhecimento da filogenia de fungos pertencentes a esse gênero. Vários estudos têm demonstrado que análises de sequências gênicas, além da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*), podem contribuir significativamente à determinação taxonômica e identificação de *Phyllosticta* spp. (GLIENKE et al., 2011; WIKKEE et al., 2011). Mediante o aprimoramento dessas técnicas, novas espécies de *Phyllosticta* foram relatadas

recentemente (CROUS et al., 2012; WANG et al., 2012; SU e CAI, 2012; WONG et al., 2012; ZHANG et al., 2012), e concomitante aos novos relatos, surgiram dúvidas acerca da identificação das espécies já relatadas e comumente citadas na literatura.

Estudos anteriores indicaram que mangueiras são hospedeiras de diferentes espécies endofíticas de *Phyllosticta* que estão em processo de identificação (WICKERT et al., 2009; WIKKEE et al., 2013) e, que goiabeiras podem apresentar sintomas severos nos frutos ocasionados pela espécie *P. capitalensis*, considerada até então como fungo endofítico (WICKERT et al., 2009; WICKERT et al., 2014). Assim *P. capitalensis* passaria a ser conspecífica, ou seja, pertencer à mesma espécie de *G. psidii*, até então considerada como patogênica a goiabeiras (TOZELLO e RIBEIRO, 1998; ESCANFERLA et al., 2009). Além desses impasses, o sequenciamento de um isolado classificado como *Guignardia mangiferae* por Roy em 1968, indicou dissimilaridade com as sequências da espécie *P. capitalensis*, até então conhecida como a fase anamórfica de *G. mangiferae* (OKANE et al., 2003; GLIENKE et al., 2011). No entanto, como apenas um isolado foi sequenciado, não existem evidências claras de que *G. mangiferae* não seja o teleomorfo de *P. capitalensis* (WIKKEE et al., 2011).

Tendo em vista a reclassificação e identificação de novas espécies de *Phyllosticta* e o fato desse fungo afetar culturas de grande importância econômica para o Brasil, é essencial a realização de novos estudos acerca do complexo de espécies de *Phyllosticta* ainda não conhecidas, dando continuidade aos trabalhos já realizados no país em mangueiras e goiabeiras (WICKERT et al., 2009; WICKERT et al., 2014), culturas nas quais a identificação do fungo ainda não está bem esclarecida.

Para tanto, este trabalho objetivou (i) obter uma coleção atual de isolados de *Phyllosticta* de folhas assintomáticas de goiabeiras e de mangueiras, e de frutos sintomáticos de goiabeiras, (ii) caracterizar os isolados pelo sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2, e dos genes codificadores da actina (ACT) e do gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPDH) e (iii) analisar o perfil genético dos indivíduos utilizando marcadores fAFLP (*fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism*), ainda pouco empregados para o gênero *Phyllosticta*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características do gênero *Phyllosticta* e etiologia do fungo

Phyllosticta corresponde a um importante gênero de fungos associados ao reino vegetal, apresentando ampla abrangência geográfica e diferente comportamento ecológico (BAAYEN et al., 2002; WIKKE et al., 2011). O gênero *Phyllosticta* (Filo Ascomycota, Classe Dothideomycetes, Ordem Botryosphaeriales) foi descrito em 1818 por Persoon e compreende a forma anamórfica do fungo. Fungos do gênero *Phyllosticta* podem ser caracterizados pela presença de picnídios com formatos globosos, subglobosos ou achatados, que abrigam conídios comumente hialinos, asseptados, ovóides, elipsóides ou curto-cilíndricos, com tamanho de 10 a 25 μm , raramente piriformes, globosos ou subglobosos e, normalmente, cobertos por uma camada mucosa e com a presença de um apêndice apical único (VAN DER AA, 1973; WIKKE et al., 2013). No entanto, existem variações entre as espécies de *Phyllosticta*, como as *P. colocasiicola*, *P. minima*, e *P. sphaeropsoidea* que não possuem a camada mucosa e o apêndice (WIKKE et al., 2013). Além disso, apêndices mucóides já formados podem desaparecer com a idade do fungo, ou variar em tamanho e forma quando o mesmo isolado é cultivado em diferentes meios de cultura (WIKKE et al., 2013).

Por sua vez, a fase teleomórfica do gênero *Phyllosticta* é denominada *Guignardia* (Viala e Ravaz), descrita em 1892. Esta fase do fungo é caracterizada pela produção de peritécio, em cujo interior encontram-se os ascos que podem apresentar formatos clavados ou elipsóides, com um ápice ligeiramente quadrado, diminuindo gradualmente para um pequeno pedicelo e com uma câmara ocular bem desenvolvida. Os ascósporos são encontrados em número de oito no interior dos ascos, apresentando formato elipsóide a limoniforme, por vezes, ligeiramente alongados, asseptados, hialinos, e podem apresentar apêndices polares mucilaginosos ou bainha gelatinosa (WIKKE et al., 2013). Essas estruturas sexuais presentes na fase perfeita do fungo são desenvolvidas somente sobre folhas em decomposição no solo, não sendo encontradas em lesões de frutos e em folhas ainda aderidas às plantas (McONIE, 1964; WIKKE et al., 2011).

O uso dos dois nomes referentes às fases sexual e assexual é redundante, assim um único nome tem sido adotado. Embora, na classificação de fungos o nome referente à fase teleomórfica deva prevalecer, segundo o Código Internacional de Nomenclatura Botânica (McNEILL et al., 2006; KIRK et al., 2008), recentes modificações foram realizadas, sugerindo-se que seja dada prioridade ao primeiro nome descrito (HAWKSWORTH et al., 2011; McNEILL et al., 2012). Assim, tendo em vista que *Phyllosticta* foi o primeiro nome descrito e está geralmente relacionado ao agente causal de doenças, essa denominação foi escolhida para a citação deste gênero (WIKKE et al., 2011; GLIENKE et al., 2011).

Espécies do gênero *Phyllosticta* podem apresentar comportamento patogênico e endofítico, podendo ser isoladas de tecidos sintomáticos e assintomáticos de diversas espécies de plantas, respectivamente (WIKKE et al., 2013; WULANDARI e TO-ANUN, 2014). Após a infecção por *Phyllosticta*, estruturas reprodutivas se desenvolvem sobre as folhas e frutos, produzindo sintomas característicos. Durante a estação chuvosa, conídios e ascósporos já formados, são liberados e ejetados, podendo ser carregados pela água da chuva e pelo vento morno para outras folhas e frutos novos. Os tubos germinativos são desenvolvidos a partir dos esporos e se introduzem no tecido vegetal, onde o fungo passa a se desenvolver (WIKKE et al., 2011) (Figura 1).

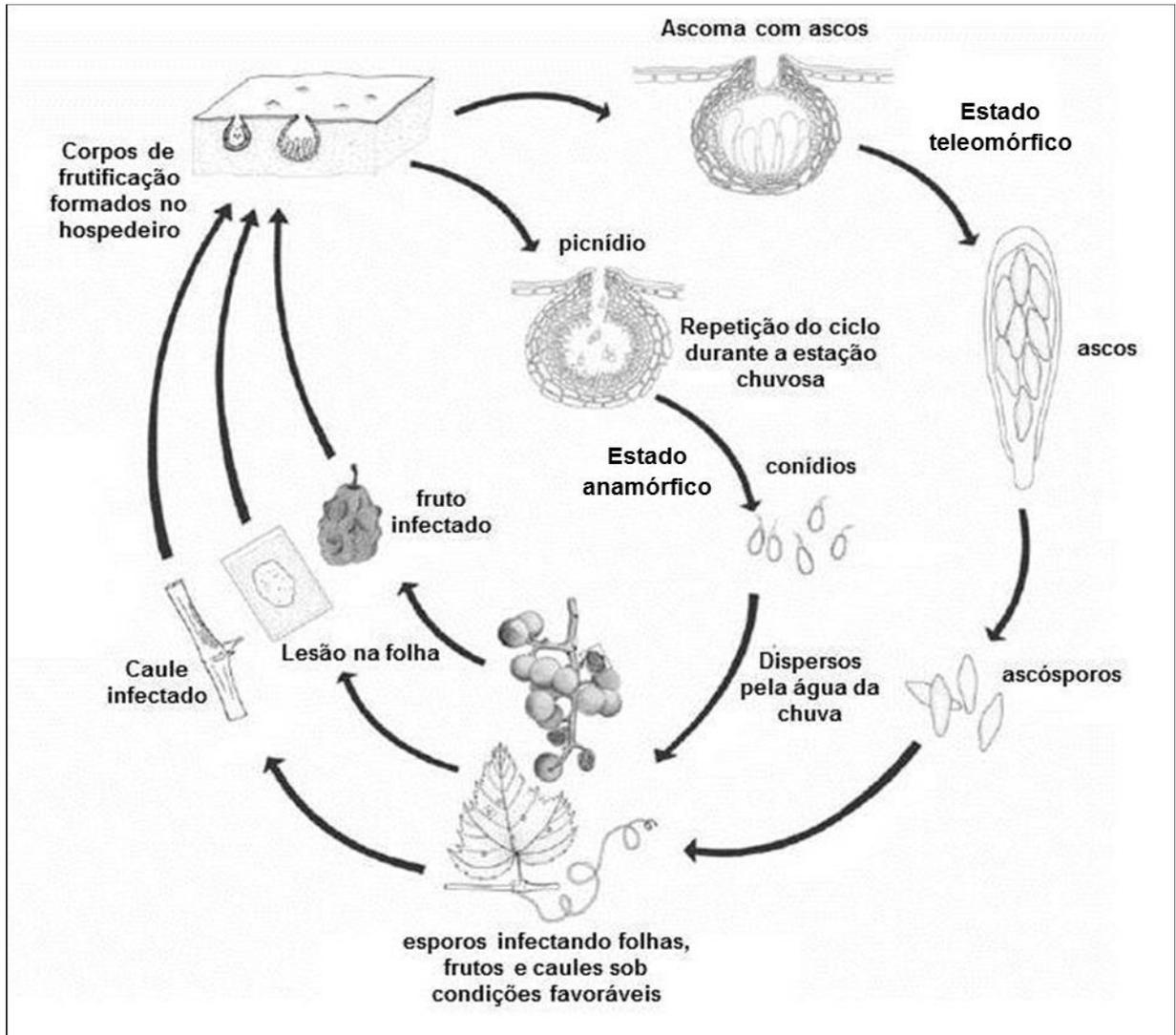


Figura 1. Representação esquemática do ciclo de vida de *Phyllosticta* em videira como estados anamórfico e teleomórfico (WIKKEE et al., 2011).

2.2. Plantas hospedeiras de *Phyllosticta*

Espécies do gênero *Phyllosticta* podem ser isoladas de tecidos assintomáticos de uma vasta gama de hospedeiros como Ericaceae (OKANE et al., 2001), Sterculiaceae (WULANDARI e TO-ANUN, 2014), Magnoliaceae (PROMPUTTHA et al., 2007), Malvaceae (WIKKEE et al., 2013), Rutaceae (GLIENKE et al., 2011; WICKERT et al., 2012), Apocynaceae (RODRIGUES et al., 2004), Fabaceae (RODRIGUES et al., 2004), Musaceae (WONG et al., 2012),

Anacardiaceae (RODRIGUES et al., 2004; WICKERT et al., 2009; WICKERT et al., 2014), Myrtaceae (WICKERT et al., 2009; WICKERT et al., 2014).

O Brasil, terceiro maior produtor mundial de frutas, atrás apenas da China e da Índia, tem aumentado gradativamente sua participação no comércio mundial de frutas frescas e derivados (INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS - IBRAF, 2014). No entanto, o clima tropical do país favorece o desenvolvimento de fungos, incluindo os do gênero *Phyllosticta*, que ocasionam enormes perdas de produção, como as observadas na cultura dos citros que é gravemente afetada pela *P. citricarpa*, causadora da Mancha Preta dos Citros (GOES, 1998; STAMMLER et al., 2013)

Além da *P. citricarpa*, outras espécies do gênero foram relatadas como agentes causais da Mancha Preta dos Citros em países asiáticos (WULANDARI et al., 2009; WANG et al., 2012; WIKKEE et al., 2013). Também há relatos da patogenicidade de *P. ampellicida* e *P. parthenocissi* a videiras, ocasionando sintomas de podridão negra (WICHT et al., 2012; ZHANG et al., 2013), e de *P. musarum* que compõe o complexo de espécies causadoras da sarda das bananeiras (PU et al., 2008; WONG et al., 2012).

Embora a espécie *G. psidii* seja descrita na literatura como a responsável pela expressão dos sintomas de podridão em frutos de goiabeiras (TOZELLO e RIBEIRO, 1998; ESCANFERLA et al., 2009), estudos recentes sugerem que esta espécie seja conspecífica com *P. capitalensis* (WICKERT et al., 2009; GLIENKE et al., 2011; WICKERT et al., 2014). Testes de patogenicidade em frutos de goiabeiras, comprovaram que isolados *P. capitalensis* oriundos de mangueiras, citros e goiabeiras, ocasionaram sintomas nos frutos (WICKERT et al., 2014), caracterizados por lesões pretas que variam de 1 a 3 cm, denotando a importância agrônômica que este fungo pode representar para esta cultura.

Outra planta que abriga diferentes espécies de *Phyllosticta* é a mangueira. Embora existam relatos de espécies de *Phyllosticta* causando sintomas em folhas de mangueiras, *P. mertonii* por Fairman (1913), *P. citricarpa* por Van Der Aa (1973) e *G. mangiferae* por Roy (1968), como em frutos, *G. mangiferae* por Roy (1968), não há relatos recentes comprovando tais observações. Atualmente, a presença de sintomas em folhas e frutos de mangueiras observadas a campo, cujo agente causal ainda não foi isolado, dá indícios da necessidade de estudos complementares.

Estudos recentes relatam apenas a presença de *Phyllosticta* colonizando plantas de mangueira de forma endofítica, como as espécies *P. capitalensis* (WICKERT et al., 2009), *P. brazilianiae* (GLIENKE et al., 2011) e *P. mangifera-indica* (WIKEE et al., 2013), dentre outras ainda não identificadas (WICKERT et al., 2009; WIKEE et al., 2013).

2.3. Identificação das espécies de *Phyllosticta* spp.

Com o advento dos avanços nas análises filogenéticas de isolados do gênero *Phyllosticta* novas espécies foram relatadas (CROUS et al., 2012; WANG et al., 2012; SU e CAI, 2012; WONG et al., 2012; ZHANG et al., 2012), e a confusão taxonômica tornou-se evidente (MOTOHASHI et al., 2008; HYDE et al., 2010 a; HYDE et al., 2010 b; GLIENKE et al., 2011). A escassez de sequências de diferentes loci gênicos, além da região ITS, depositadas em banco de dados também pode ter contribuído para com a identificação errônea dos fungos (GLIENKE et al., 2011).

Assim, os pesquisadores têm associado análises de sequências de DNA de diferentes regiões gênicas com estudos morfológicos a fim de esclarecer a taxonomia das espécies já relatadas, assim como identificar espécies novas (GLIENKE et al., 2011; SU e CAI, 2012; WONG et al., 2012; WIKEE et al., 2013; WULANDARI et al., 2013).

Os fungos pertencentes ao mesmo gênero possuem características morfológicas semelhantes e, tendo em vista que um mesmo fungo pode sofrer variações morfológicas mesmo sob condições controladas de laboratório, há grande dificuldade neste tipo de caracterização, mesmo apoiada pela identificação molecular (WULANDARI et al., 2009). Este é o caso dos endofíticos *P. capitalensis* e *P. citribraziliensis* e do patógeno *G. citricarpa* que colonizam frutos de citros (BAAYEN et al., 2002; GLIENKE et al., 2011) e do endofítico *P. capitalensis* e do patógeno *P. melochiae* que estão presentes em folhas de plantas da família Sterculiaceae (WULANDARI e TO-ANUN, 2014).

2.4. Sequenciamento e análise de diversidade genética

Técnicas de sequenciamento vêm sendo amplamente utilizadas na discriminação de espécies de *Phyllosticta* (BAYEEN et al., 2002; OKANE et al., 2001; PROMPUTTHA et al., 2007; MOTOHASHI et al., 2009; WICKERT et al., 2009; WIKEE et al., 2011; SHIVAS e TAN & GRICE et al., 2012; WICKERT et al., 2012), bem como de outras espécies de fungos como *Fusarium* (PEREZ et al., 2011), *Colletotrichum* (HYDE et al., 2009; LATINOVIC et al., 2012; SOUZA et al., 2013), *Fusicoccum* (CROUS et al., 2006), *Phomopsis* (MOTOHASHI et al., 2009; UDAYANGA et al., 2011), *Pestalotiopsis* (LIU et al., 2010; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2011), *Diplodia* (PHILLIPS et al., 2008; LAZZIZERA et al., 2008).

A fim de minimizar os erros na identificação dos fungos, preconizou-se a análise concatenada de diferentes sequências gênicas, como da β -tubulina, calmodulina, actina, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, fator α 1 de alongação da tradução e histonas, além da região ITS (PHOULIVONG et al., 2010; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2011; SU e CAI, 2012; WONG et al., 2012; LIMA et al., 2013; LIU et al., 2013; WIKEE et al., 2013; TAO et al., 2013).

O sequenciamento dos espaços intergênicos de unidades repetidas do rDNA nuclear, ITS (*Internal Transcribed Spacer*), constitui uma importante ferramenta para discriminação de espécies de fungos por acumularem maior variabilidade genética (WHITE et al., 1990; BACIARELLI-FALINI et al., 2006). Os primers ITS utilizam regiões do 18S, 5.8S e 28S do DNA ribossomal para amplificar as regiões não codificadoras entre eles (WHITE et al., 1990). A região 18S é a mais conservada, enquanto a porção 28S é mais variável. As regiões ITS, por evoluírem rapidamente, são apropriadas para discriminar espécies (FUNGARO, 2000). As reações PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e o sequenciamento direto dessas regiões ribossomais oferecem muitas vantagens como rapidez, simplicidade, sequências com baixo número de erros, requer pequenas quantidades de DNA e é um método compatível com sequenciadores automáticos (WHITE et al., 1990).

Dado aos benefícios apresentados, a região ITS é considerada como marcador universal dos fungos (SCHOCH et al., 2012). Para o gênero *Phyllosticta*

esse marcador tem sido amplamente utilizado na identificação das espécies, como a classificação do endófito *G. endophyllicola*, oriundo de folhas sadias de 91 espécies de plantas no Japão (OKANE et al., 2003). Wickert et al. (2014), por meio de sequências ITS, identificaram isolados de *P. citricarpa* colonizando assintomaticamente folhas de laranja azeda e frutos de laranja Valência com sintomas de mancha preta do citros, assim como, isolados de *P. capitalensis* oriundos de folhas assintomáticas de lima ácida Tahiti, laranja azeda, manga, banana, eucalipto, pitanga, jaboticaba e goiaba, e colonizando frutos sintomáticos de goiaba.

Ainda no contexto da técnica mencionada anteriormente, um estudo global envolvendo a identidade do agente causal da sarda das bananeiras, identificou o endófito cosmopolita *P. capitalensis*, oriundo de tecido sadio e *P. musarum* ocorrendo em folhas e frutos sintomáticos de banana, oriundos da Índia e da Tailândia (WONG et al., 2012). Sequências ITS também permitiram a classificação de novas espécies do fungo associadas à esta doença, como *P. maculata*, ocorrendo no Sudeste Asiático e Oceania, *G. stevensii* ocorrendo no Havaí, *G. musicola* encontrada no norte da Tailândia e *P. cavendishii*, que é amplamente distribuída (WONG et al., 2012).

A discriminação de espécies de *Phyllosticta*, mediante avaliações de sequências dos genes codificadores da actina (ACT) e do gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPDH), dentre outros também vêm sendo largamente realizada. O gene ACT codifica a proteína actina, que em conjunto com a proteína miosina e moléculas de ATP, atuam no sistema de transporte vesicular para a entrega de proteínas e lipídios de seus sítios de síntese aos seus respectivos lugares de localização e ação (ASHIMOTO et al., 2002). Já o gene GPDH é responsável por codificar a proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, essencial na via da glicólise e da gliconeogênese, catalisando a fosforilação oxidativa do substrato gliceraldeído-3-fosfato em 1,3- bifosfoglicerato na presença de NAD^+ e fosfato inorgânico, sendo também capaz de catalisar a reação inversa (XIANJIN et al., 2006). Estudos revelaram que, dentre outras funções, o GPDH pode desempenhar um papel importante no processo de adesão dos fungos à superfície do hospedeiro, visto que a proteína GPDH ligada à proteína plasmina adquire atividade proteolítica,

o que facilita a invasão do fungo no tecido do hospedeiro (HERNANDEZ-FONSECA et al., 2005; HARA e SNYDER, 2006).

Pela combinação de sequências ITS e gênicas, várias espécies novas de *Phyllosticta* foram relatadas recentemente, tais como *P. hostae*, *P. schimae* e *P. ilicis-aquifolii* (SU e CAI, 2012). Assim como a espécie *P. citrichinaensis*, responsável pela Mancha Preta em pomelos, na China (WANG et al., 2012) e *P. citrimaxima*, também associada à Mancha Preta dos Citros na Tailândia (WIKEE et al., 2013). Adicionalmente, foram identificadas recentemente as espécies *P. ampellicida* e *P. parthenocissi*, isoladas de sintomas de podridão negra da uva (ZHANG et al., 2013).

A aplicação das análises de sequências gênicas também permitiu a distinção entre as fases anamórficas e teleomórficas dos fungos. Zhang et al. (2013) ao compararem sequências de *P. vaccini* e do seu respectivo teleomorfo *G. vaccini*, verificaram uma dissimilaridade entre estas e sugeriram que *P. elongata* seriam, na verdade, o anamorfo de *G. vaccini*.

Outras técnicas moleculares têm sido utilizadas para estabelecer relações genéticas entre isolados de uma mesma espécie ou de diferentes espécies de fungos. Dentre as técnicas empregadas incluem-se RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (PANDEY et al., 2003), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (STRINGARI et al., 2009; WICKERT et al., 2014); e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (BAYEEN et al., 2002; BALDASSARI et al., 2008; WICKERT et al., 2014). Contudo, a técnica AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) tem se destacado em relação às demais técnicas, dada a possibilidade da obtenção de alto nível de polimorfismo, devido à ampla cobertura do genoma, e altas reprodutibilidade e confiabilidade (LOPES et al., 2002; YANG et al., 2005).

Os marcadores AFLP foram desenvolvidos por Zabeau e Vos (1993). A técnica se baseia na propriedade de certas enzimas de restrição, como a *EcoRI* e a *MseI*, de deixar após a clivagem do DNA, extremidades coesivas de sequência conhecida. Assim, construiu-se sequências de nucleotídeos de fita dupla que pudessem se ligar às extremidades dos fragmentos de restrição, denominadas adaptadores. Uma vez que a sequência dos adaptadores e a do sítio de restrição são conhecidas, foi possível o desenvolvimento de iniciadores específicos utilizados

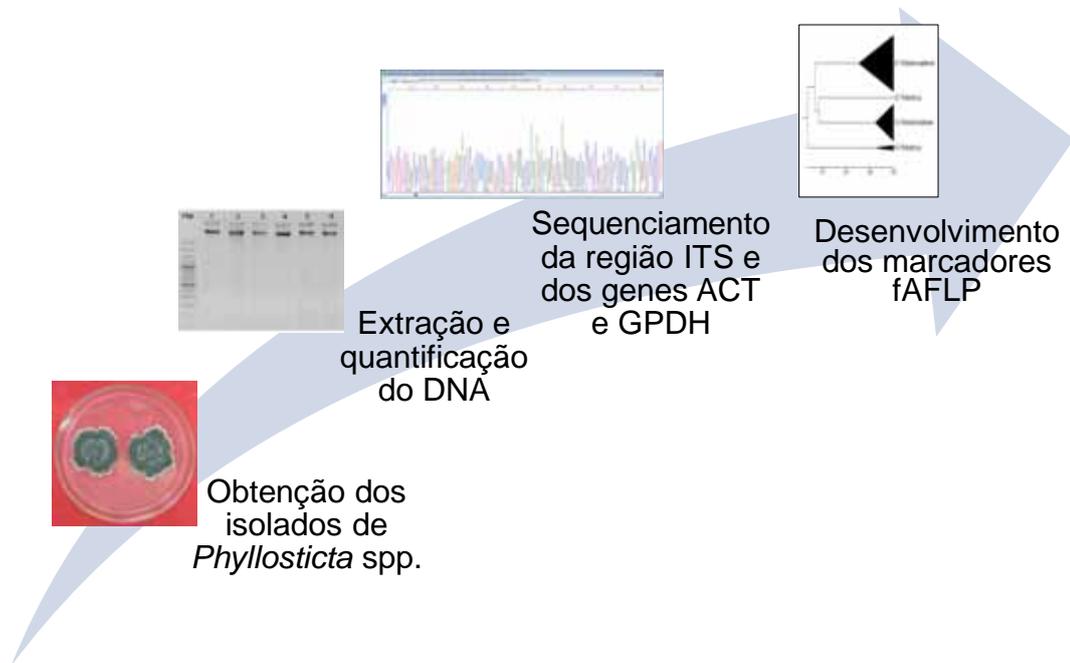
para a pré-amplificação dos fragmentos de restrição. Na pré-amplificação, os primers são constituídos por uma sequência complementar ao adaptador, seguida de outra específica do sítio de restrição da enzima e um nucleotídeo seletivo na extremidade 3' (LOPES et al., 2002). Após a pré-seleção dos fragmentos, o produto da PCR é submetido a uma seleção final acrescentando-se de uma a duas bases ao final de cada oligonucleotídeo específico. A leitura dos fragmentos pode ser realizada em gel de poliacrilamida ou ser automatizada, pela utilização da eletroforese de capilar, o que requer marcação fluorescente dos primers. Neste último caso a técnica passa a ser conhecida como fAFLP (*fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism*) (LOPES et al., 2002).

Embora existam poucos trabalhos na literatura que contemplem a utilização de AFLP na caracterização molecular de espécies de *Phyllosticta*, os estudos já existentes que utilizaram tal técnica comprovaram que os resultados podem ser elucidativos, como o trabalho de Souza et al. (2013) cujo resultado mostrou a variabilidade genética entre isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* e a diversidade genética entre isolados da mesma espécie obtidos de mangueiras e citros. Os únicos estudos envolvendo análises de marcadores AFLP e *Phyllosticta* já realizados englobaram o estudo de isolados *P. citricarpa* e *P. capitalensis* oriundos de citros, no qual se pôde observar a discriminação entre as espécies e a considerável diversidade genética entre os isolados (BALDASSARI et al., 2008), e outro estudo recente que analisou 14 isolados de *Phyllosticta* spp. oriundos de lima ácida Tahiti, laranja azeda, manga, banana, eucalipto, pitanga e jabuticaba, assim como, de folhas e frutos sintomáticos de goiaba, que mostrou a clara discriminação entre as diferentes espécies do gênero (WICKERT et al., 2014).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O cultivo dos fungos isolados deu-se no Laboratório de Fitopatologia, do Departamento de Fitossanidade, enquanto, os procedimentos para análises moleculares foram realizados no Laboratório de Epidemiologia Molecular, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, e o sequenciamento e análise de

polimorfismo (fAFLP) por capilares foi realizado no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas, do Departamento de Tecnologia, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), Campus de Jaboticabal. As atividades foram realizadas conforme o processo a seguir:



3.1. Obtenção dos isolados de *Phylosticta* spp.

Para a obtenção dos isolados de *Phylosticta*, folhas assintomáticas de goiabeiras e mangueiras, foram coletadas de plantas pertencentes a bancos de germoplasma localizado em Estação Experimental e de áreas de produção comercial localizadas em seis municípios do estado de São Paulo (Tabela 1). De cada planta amostrada, em localidade e espécie de planta, foram coletadas, aleatoriamente, dez folhas fisiologicamente desenvolvidas e íntegras. No total foram amostradas 30 plantas. Amostragens de frutos sintomáticos de goiabeiras foram realizadas somente em áreas de produção comercial. Os mesmos foram coletados aleatoriamente, tanto em termos de número de frutos e de plantas, assim como de locais.

As folhas de ambas as espécies de plantas foram coletadas em área de bancos de germoplasma, visando o isolamento de *Phylosticta* que não sofreram a

pressão de seleção de fungicidas, e em áreas de produção comercial, a fim de obter isolados que prevaleceram colonizando as plantas mesmo sob tratamento fitossanitário.

Para o isolamento do fungo, fragmentos de cerca de 5mm² foram obtidos a partir da região mediana do limbo foliar das dez folhas amostradas por planta, e a partir da região de transição doente/sadio das lesões pretas grandes (1,0 a 3,0 cm) em frutos de goiaba. A seguir, os fragmentos foram imersos em etanol 70% (v/v) por um minuto e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio: água estéril (1:3 v/v), por três minutos. Posteriormente, os mesmos foram enxaguados com água destilada esterilizada por 30 segundos, secos em papel de filtro estéril e distribuídos aleatoriamente em placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). Para o desenvolvimento das colônias, as placas de Petri contendo os fragmentos foram incubadas em B.O.D. a 27°C ± 1°C por aproximadamente quatro dias. Colônias típicas de *Phyllosticta* foram então repicadas e preservadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA, e em seguida recobertas por óleo mineral estéril.

Tabela 1. Origem das amostras de folhas assintomáticas de goiabeiras e de mangueiras e de frutos sintomáticos de goiabeiras.

Hospedeiro	Área de coleta	Procedência ^b	Variedade	Tecido vegetal	Sintoma ^c
Goiabeira	Banco de germoplasma ^a	Pindorama	Vários	Folhas	A
	Área de produção	Vista Alegre do Alto	Tailandesa	Folhas	A
		Taquaral	Paluma	Frutos	S
		Matão	Paluma	Frutos	S
		Itápolis	Paluma	Frutos	S
Mangueira	Banco de germoplasma	Pindorama	Vários	Folhas	A
	Área de produção	Taquaritinga	Palmer	Folhas	A

^aBanco de germoplasma pertencente a APTA (Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios).

^bMunicípios do estado de São Paulo, Brasil.

^cA: isolados obtidos de folhas assintomáticas; S: isolados obtidos de frutos com sintomas de podridão preta.

3.2. Caracterização fenotípica das colônias de *Phyllosticta* spp.

As colônias com característica fenotípica de *Phyllosticta* foram observadas e agrupadas de acordo com padrões específicos e típicos entre si. Para tal, foram tomados como referência a forma, coloração, presença de halo e textura das colônias.

3.3. Extração de DNA

Para a extração de DNA, os isolados do estudo foram repicados para tubos de vidro de 110 mL, contendo meio de cultura líquido BD (batata-dextrose) visando à obtenção de quantidades maiores de massa miceliana e, também, permitir a fácil separação da mesma do meio de cultura. Após aproximadamente 15 dias de desenvolvimento, a massa miceliana foi retirada do meio de cultura com o auxílio de peneira de pequena trama. Ainda na peneira, a mesma foi enxaguada com água destilada, e em seguida, colocada para secar em placas de Petri limpas, em temperatura ambiente, por cerca de 12 horas. Posteriormente, a massa miceliana seca foi submetida à maceração com nitrogênio líquido até a formação de um pó, que foi transferido para tubos eppendorf de 2,0 mL.

A extração de DNA foi baseada no protocolo de Kuramae-Izioka (1997). A cada tubo eppendorf contendo cerca de 0,1 g da massa miceliana macerada, foram acrescentados 800 µL de tampão de extração [Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 100 mM pH 8.0 e SDS 0,5% (p/v)]. Os tubos foram agitados em vórtex e seguidamente mantidos em banho-maria a 65°C por 45 minutos, sendo agitados a cada 10 minutos gentilmente. Após serem retirados do banho-maria, foram acrescentados aos tubos 400 µL de acetato de potássio 5M. Misturou-se a solução por inversão e incubou-se no gelo por 30 minutos, invertendo-se os a cada 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 15294 x g por 10 minutos, a 10°C, e o sobrenadante obtido foi transferido para tubos novos, sendo acrescentado a estes 650 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). A solução foi misturada por inversão durante dois minutos, centrifugando-se as amostras novamente a 15294 x g por 10 minutos, a 10°C. Após a centrifugação, a fase superior (sobrenadante) foi transferida para

tubos novos com cuidado, para não tocar na interface inferior, e acrescentou-se 18 µL de RNase (20 ng/mL). A fim de possibilitar a ação da RNase, os tubos foram mantidos em Thermomixer (Eppendorf) a 37°C por 1 hora e 30 minutos. Ao final desta etapa, o sobrenadante foi novamente tratado com 570 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) sob as mesmas condições. Em seguida, a fase superior foi, mais uma vez, transferida cuidadosamente para tubos novos. Posteriormente, foram acrescentados 1000 µL de etanol absoluto gelado à solução, a qual foi misturada gentilmente, e depois levada ao freezer -20°C por aproximadamente 12 horas.

Após a precipitação do DNA em etanol, os tubos foram centrifugados a 15294 x g por 20 minutos, a 10°C. A fase líquida foi descartada e o *pellet* foi lavado com 700 µL de etanol 70% (v/v). Novamente os tubos foram centrifugados, a 15294 x g por 7 minutos, a 10°C, e a fase líquida foi novamente descartada e o *pellet* foi colocado para secar. Posteriormente, o *pellet* foi ressuspensionado em 60 µL de tampão TE 10:1 (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0) por 24 horas à 4°C. A avaliação da quantidade do DNA e da sua qualidade foi realizada com o auxílio de um espectrofotômetro NanoDrop-100 (Uniscience), medindo-se a absorvância de cada amostra nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A relação da absorvância entre estes dois comprimentos de onda resulta no valor referente à qualidade do DNA, que se estiver no intervalo de 1,8 a 2,0 caracteriza um DNA de boa qualidade (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). As amostras também foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 g/mL) e padrão de concentração 100 pb DNA Ladder Plus (Fermentas) para verificação da qualidade do DNA. O gel foi visualizado sob luz UV em equipamento de fotodocumentação GEL DOC XR (BioRad).

3.4. Sequenciamento do DNA e análise dos dados

3.4.1. Amplificação do DNA

Para a amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 foi utilizado o par de primers ITS1/ ITS4 (WHITE et al., 1990), para um fragmento esperado de cerca de 650 pb. A

amplificação parcial do gene codificador da actina (ACT) foi realizada pela utilização dos primers ACT-512F/ACT-783R (CARBONE e KOHN, 1999), para um fragmento esperado de cerca de 300 pb. Já os primers GDF1 (GUERBER et al., 2003) e Gpd2-LM (MYLLYS et al., 2002) foram utilizados para amplificar parcialmente o gene codificador do gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GPDH), para um fragmento esperado de cerca de 1000 pb.

As reações de PCR foram realizadas utilizando-se tampão 1X (KCl 50mM, TRIS-HCl 200mM, pH 8,4); MgCl₂ 2mM; dNTP's 0,2mM, 0,5 U de Taq DNA polimerase, 2,5 pmol de cada primer, 40 ng de DNA genômico e água pura estéril q.s.p. 20 µL. Para a amplificação, as reações foram realizadas em termociclador Nexus (Eppendorf), sendo utilizado 1 ciclo a 95°C por 4 minutos, 36 ciclos a 94°C por 40 segundos, 40 segundos a 60°C e 72°C por 1 minuto, e para finalizar um ciclo a 72°C por 10 minutos. O produto da amplificação das amostras foi visualizado em gel de agarose 1 % sob luz UV, em equipamento de fotodocumentação GEL DOC XR (BioRad).

Como a reação PCR de amplificação do fragmento foi otimizada de forma a não deixar restos de reagentes após a reação, prosseguiu-se o sequenciamento direto do produto de PCR. Assim, o fragmento de DNA amplificado foi então submetido à PCR de sequenciamento utilizando-se os pares de primers separadamente e o Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems), conforme instruções do fabricante. O programa de termociclagem utilizado foi de 1 ciclo a 95°C por 4 minutos, 39 ciclos a 94°C por 40 segundos, 40 segundos a 60°C e 72°C por 1 minuto, e para finalizar um ciclo a 72°C por 10 minutos. Posteriormente, o produto da PCR de sequenciamento foi precipitado em 80 µL de isopropanol 75% (v/v) e então submetido à centrifugação a 3220 x g por 45 minutos a 15°C. Posteriormente, a fase líquida foi descartada e o pellet foi lavado com 180 µL de etanol 70% (v/v). Após a lavagem, o pellet foi seco em um concentrador à vácuo a 45°C por 5 minutos. O produto da PCR de sequenciamento foi então submetido à desnaturação em formamida (Applied Biosystems) na temperatura de 95°C por 5 minutos. Após a desnaturação, as amostras foram depositadas imediatamente no gelo a fim de se manter as fitas de DNA desnaturadas. A leitura das bases foi realizada por um sequenciador ABI 3100 (Applied Biosystems).

3.4.2. Análise das sequências

No sequenciador, os dados foram coletados pelo *software ABI Analysis Data Collection* (Applied Biosystems) após serem auto-analisados. Os eletroferogramas gerados pelo processo de sequenciamento foram então submetidos ao pacote de programas Phred/Phrap/Consed (EWING e GREEN, 1998; GORDON et al., 1998), para verificação da sua qualidade, alinhamento e corte das extremidades. Foram consideradas sequências com conjunto de bases que apresentaram qualidade Phred igual ou superior a 20. As sequências de DNA qualificadas foram então comparadas a outras sequências depositadas no banco de dados GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) através da ferramenta BLAST (ALTSCHULL et al., 1997).

3.5. Análises das relações filogenéticas

Para a construção da árvore filogenética, as sequências de cada uma das regiões, ITS, ACT e GPDH foram alinhadas separadamente pela ferramenta ClustalW (THOMPSON et al., 1994). Após o alinhamento, às extremidades das sequências de cada isolado, foram acrescentadas letras *N* aos dados considerados faltantes, com o objetivo de igualar o tamanho das mesmas. Assim, as sequências das regiões ITS, ACT e GPDH, alinhadas e de igual tamanho, de cada isolado, foram concatenadas.

A construção da árvore filogenética foi realizada pelo método da Máxima Parcimônia (NEI e KUMAR, 2000), e deu-se após o realinhamento das sequências concatenadas, utilizando-se bootstrap de 1.000 repetições (FELSENSTEIN, 1985) e o algoritmo Close-Neighbor-Interchange (NEI e KUMAR, 2000), por meio do *software* MEGA 5.0 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (TAMURA et al., 2011).

Para a construção do filograma, sequências ITS, ACT e GPDH obtidas no estudo foram alinhadas a outras sequências de *Phyllosticta* depositadas no banco de dados GenBank (Tabela 2). Como grupo externo, foram acrescentadas as sequências: IMI 350839 *Colletotrichum guajavae* (espécie-tipo), CBS 129953 *C. rhombiforme* (espécie-tipo) e CBS 632.80 *C. orchidophilum*.

Tabela 2. Códigos de acesso de isolados de *Guignardia* e *Phyllosticta* presentes no banco de dados GenBank. As sequências de DNA destes isolados foram alinhadas às sequências de DNA dos isolados deste estudo

Espécie	Código ^a	Hospedeiro/ Família	País	Gene e número de Acesso do GenBank ^b		
				ITS	ACT	GPDH
<i>Guignardia citricarpa</i>	CBS 120489	<i>Citrus limon</i> (Rutaceae)	Brasil	FJ538315	FJ538431	JF343685
<i>G. citricarpa</i> *	CBS 127454	<i>Citrus limon</i> (Rutaceae)	Austrália	JF343583	JF343667	JF343771
<i>G. gaultheriae</i>	CBS 447.71	<i>Gaultheria humifusa</i> (Ericaceae)	Estados Unidos	JN692543	JN692519	JN692508
<i>G. gaultheriae</i> *	CBS 447.70	<i>Gaultheria humifusa</i> (Ericaceae)	Estados Unidos	AB095506	JN692519	JN692508
<i>G. mangiferae</i>	CBS 356.52	<i>Ilex</i> sp. (Aquifoliaceae)		FJ538342	FJ538458	JF343721
<i>G. mangiferae</i>	CBS 111638	<i>Capsicum</i> sp. (Solanaceae)	República Dominicana	FJ538345	FJ538461	JF343709
<i>G. mangiferae</i>	IMI 260576	<i>Mangifera indica</i> (Anacardiaceae)	Índia	JF261459	JF343641	JF343748
<i>G. psidii</i>	CBS100250	<i>Psidium guajava</i> (Myrtaceae)	Brasil	FJ538351	FJ538467	-
<i>G. sansevieriae</i>	CBS 120428	-	-	JN692544	JN692520	JN692509
<i>Phyllosticta bifrenariae</i> *	VIC 30556	<i>Bifrenaria harrissoniae</i> (Orchidaceae)	Brasil	JF343565	JF343649	JF343744

Continuação

Espécie	Código ^a	Hospedeiro/ Família	País	Gene e número de Acesso do GenBank ^b		
				ITS	ACT	GPDH
<i>P. brazilianiae</i>	LGMF342	<i>Mangifera indica</i> (Anacardiaceae)	Brasil	JF343576	JF343660	JF343762
<i>P. brazilianiae</i>	LGMF334	<i>Mangifera indica</i> (Anacardiaceae)	Brasil	JF343566	JF343650	JF343752
<i>P. brazilianiae</i> *	LGMF 330	<i>Mangifera indica</i> (Anacardiaceae)	Brasil	JF343572	JF343656	JF343758
<i>P. capitalensis</i> *	CPC 18848	<i>Stanhopea graveolens</i> (Orchidaceae)	Brasil	JF261465	JF343647	JF343776
<i>P. citriasiana</i>	CBS 123371	<i>Citrus maxima</i> (Rutaceae)	Vietnã	FJ538356	FJ538472	JF343690
<i>P. citriasiana</i>	CBS 120487	<i>Citrus maxima</i> (Rutaceae)	China	FJ538361	FJ538477	JF343687
<i>P. citriasiana</i> *	CBS 120486	<i>Citrus maxima</i> (Rutaceae)	Tailândia	FJ538360	FJ538476	JF343686
<i>P. citribraziliesis</i>	LGMF09	<i>Citrus</i> sp. (Rutaceae)	Brasil	JF261436	JF343618	JF343693
<i>P. citribraziliesis</i> *	CBS 100098	<i>Citrus</i> sp. (Rutaceae)	Brasil	FJ538352	FJ538468	JF343691
<i>P. concentrica</i>	CBS 937.70	<i>Hedera helix</i> (Araliaceae)	Itália	FJ538350	KF289257	JF411745
<i>P. cussonia</i>	CPC 14873	<i>Cussonia</i> sp. (Araliaceae)	África do Sul	JF343578	JF343662	JF343764

Continuação

Espécie	Código ^a	Hospedeiro/ Família	País	Gene e número de Acesso do GenBank ^b		
				ITS	ACT	GPDH
<i>P. cussonia</i>	CPC 14875	<i>Cussonia</i> sp. (Araliaceae)	África do Sul	JF343579	JF343663	JF343765
<i>P. hymenocallidicola</i>	CBS 131309	<i>Hymenocallis littoralis</i> (Amaryllidaceae)	Austrália	JQ044423	KF289242	KF289142
<i>P. hostae</i>	CGMCC 3.14356	<i>Hosta plantaginea</i> (Liliaceae)	China	JN692536	JN692512	JN692504
<i>P. hostae</i> *	CGMCC3.14355	<i>Hosta plantaginea</i> (Liliaceae)	China	JN692535	JN692511	JN692503
<i>P. hubeiensis</i> *	CGMCC3.14986	<i>Viburnum odoratissimum</i> (Adoxaceae)	China	JX025037	JX025042	JX025027
<i>P. hypoglossi</i>	CBS 434.92	<i>Ruscus aculeatus</i> (Ruscaceae)	Itália	FJ538367	FJ538483	JF343695
<i>P. hypoglossi</i>	CBS 101.72	<i>Ruscus aculeatus</i> (Ruscaceae)	Itália	FJ538365	FJ538481	JF343694
<i>P. mangifera-indica</i>	CPC 20274	<i>Mangifera indica</i> (Anacardiaceae)	Tailândia	KF170305	KF289296	KF289121

Continuação

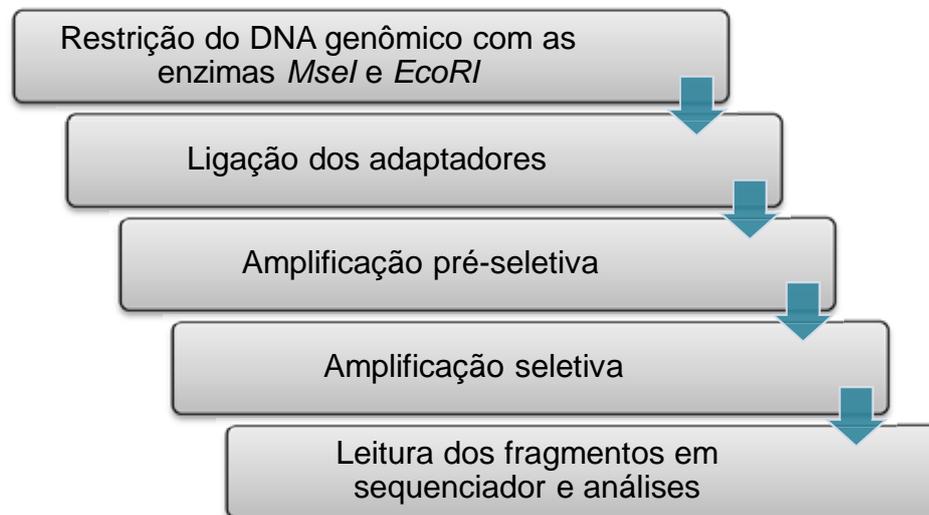
Espécie	Código	Hospedeiro/ Família	País	Gene e número de Acesso do GenBank ^b		
				ITS	ACT	GPDH
<i>P. owaniana</i>	CBS 776.97	<i>Brabejum stellatifolium</i> (Proteaceae)	África do Sul	FJ538368	FJ538484	JF343767
<i>P. spinarum</i>	CBS 292.90	<i>Chamaecyparis pisifera</i> (Cupressaceae)	França	JF343585	JF343669	JF343773
<i>P. spinarum</i>	CBS 937.70	<i>Hedera helix</i> (Araliaceae)	Itália	FJ538350	FJ538466	JF411745
<i>P. styracicola</i> *	CGMCC3.14985	<i>Styrax grandiflorus</i> (Styracaceae)	China	JX025040	JX025045	JX025030
<i>P. vaccinii</i>	ATCC 46255	<i>Vaccinium macrocarpon</i> (Ericaceae)	Estados Unidos	KC193585	KC193580	KC193583
<i>P. yuccae</i>	CBS 117136	<i>Yucca elephantipes</i> (Asparagaceae)	Nova Zelândia	JN692541	JN692517	JN692507
<i>P. schimae</i> *	CGMCC3.14354	<i>Schima superb</i> (Theaceae)	China	JN692534	JN692510	JN692506

^aATCC: American Type Culture Collection, Virgínia, EUA; CBS: CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Países Baixos; CGMCC: China General Microbial Culture Collection; CPC: Coleção de culturas de P.W. Crous, pertencente à CBS; IFO: Instituto de Fermentação, Osaka, Japan; IMI: Instituto Microbiológico Internacional, CABI-Bioscience, Egham, Bournemouth Lane, Reino Unido; LGMF: Coleção de Culturas do Laboratório de Genética de Microorganismos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil; PD: Serviço de Proteção de Plantas, Wageningen, Países Baixos; VIC: Coleção de culturas da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil.

* culturas espécie-tipo.
^bITS: espaços intergênicos de unidades repetidas do DNA ribossômico; ACT: sequência parcial do gene codificador da actina; GPDH: sequência parcial do gene codificador do glicerato 3-fosfato desidrogenase.

3.6. Desenvolvimento dos marcadores fAFLP

Para o desenvolvimento da técnica fAFLP, foram utilizadas na etapa de restrição do DNA, as enzimas *MseI* e *EcoRI* da marca New England Biolabs. As etapas subsequentes foram realizadas utilizando-se o “AFLP™ Microbial Fingerprinting Kit” (Applied Biosystems). O protocolo foi otimizado por Souza et al. (2013).



3.6.1. Restrição do DNA

A etapa de clivagem do DNA genômico foi realizada com as enzimas *MseI*, de corte frequente, e *EcoRI*, de corte raro (Figura 2). A reação de restrição foi constituída de 500 ng de DNA, Tampão Cutsmart 1X (Tris-acetato 20 mM; pH 7,9; MgAc 10 mM; KAc 50 mM; BSA 100 µg/mL – New England Biolabs), *MseI* 0,5U (New England Biolabs), *EcoRI* 2,5 (New England Biolabs), 0,01% de BSA (*Bovine Serum Albumin*, Invitrogen) e água pura estéril para 10 µL de reação. A reação foi incubada a 37°C por 14 horas em termociclador Nexus (Eppendorf).

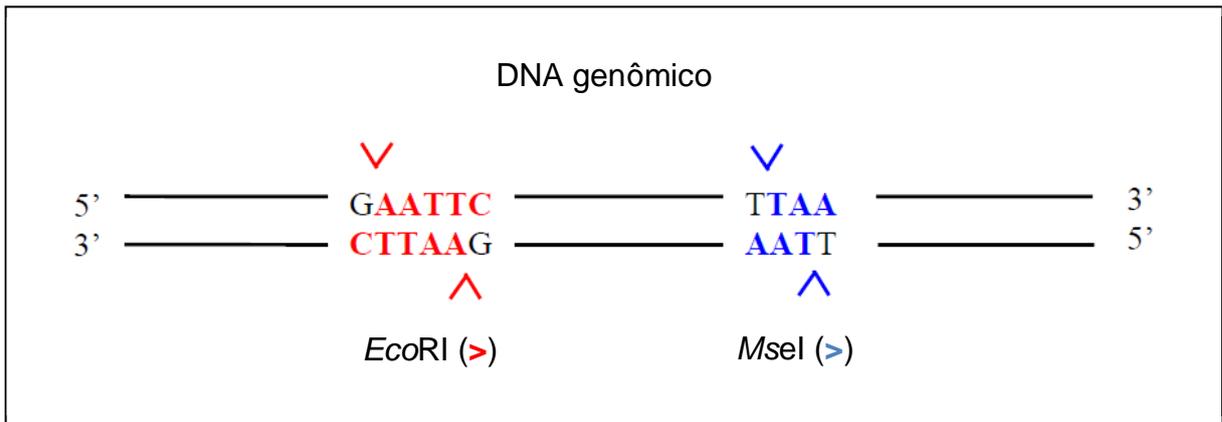


Figura 2. Ação das enzimas de restrição *EcoRI* e *MseI*.

3.6.2. Ligação dos adaptadores

Após a etapa de restrição, adaptadores específicos que possuem terminais complementares às extremidades resultantes da clivagem do DNA pelas enzimas *EcoRI* e *MseI* foram ligados aos fragmentos com o auxílio da enzima T4 DNA ligase (Figura 3). Antes de preparar a reação de ligação, os adaptadores *MseI* e *EcoRI* foram desnaturados separadamente a 95°C por 5 minutos e, logo após, foram colocados imediatamente no gelo. Para a reação para a ligação dos adaptadores específicos, utilizou-se tampão da T4 DNA ligase 1X [250 mM Tris-HCl, pH 7,6; 50 mM MgCl₂; 5 mM ATP; 5 mM DTT; 25% (p/v) polietilenoglicol 8000 - Invitrogen], T4 DNA Ligase 0,5 U (Invitrogen), 0,33 µL do adaptador *MseI* (1,1 µM); 0,33 µL do adaptador *EcoRI* (0,1 µM) e 3,7 µL do DNA restringido. A reação foi incubada a 20°C por 2 horas em termociclador Nexus (Eppendorf). Após a ligação dos adaptadores, o produto ligado foi diluído na proporção 1:8 (1µL de produto ligado: 8µL de tampão TE 10:1).

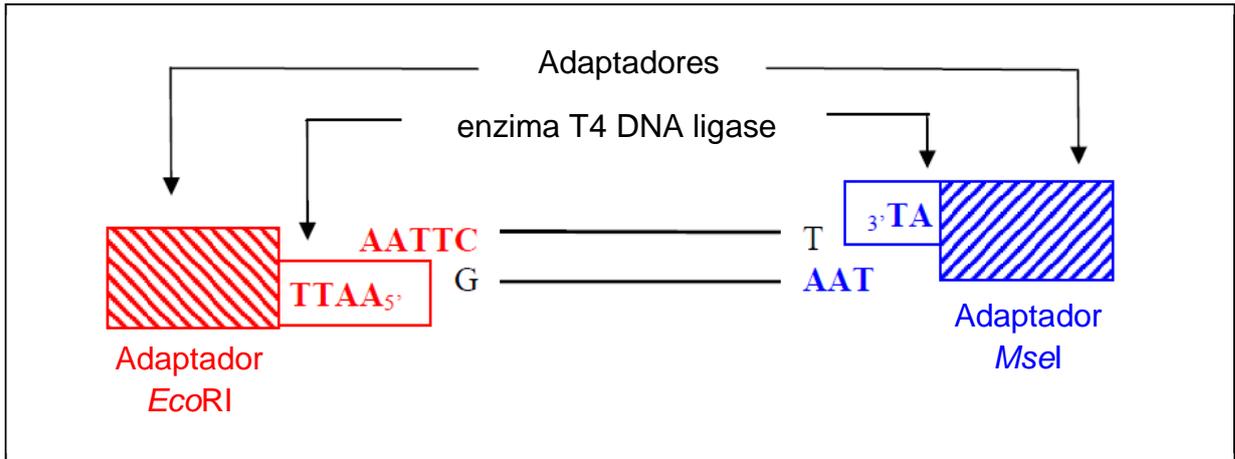


Figura 3. Ligação dos adaptadores, uma sequência conhecida de 20 nucleotídeos que será utilizada posteriormente como primer.

3.6.3. Pré-amplificação

Esta etapa consiste da seleção de fragmentos a serem amplificados. Assim, os primers usados para a amplificação pré-seletiva, construídos a partir de uma sequência complementar ao do adaptador seguida de outra sequência específica para o sítio de restrição e ainda de uma extensão de um nucleotídeo complementar na região 3' terminal, hibridizarão somente aqueles fragmentos que possuírem sequência de nucleotídeos complementar à sua sequência (Figura 4).

A reação pré-seletiva foi composta por 0,25 µL de *Core Sequence Msel* (0,25 µM), 0,25 µL de *Core Sequence EcoRI* (0,25 µM), 7,5 µL de *Core Mix* (tampão, nucleotídeos e *AmpliTaq® DNA polimerase*) e 2,0 µL do DNA ligado anteriormente diluído. O programa de termociclagem utilizado para a reação foi de 72°C por 2 minutos, seguido de 20 ciclos a 94°C por 20 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos.

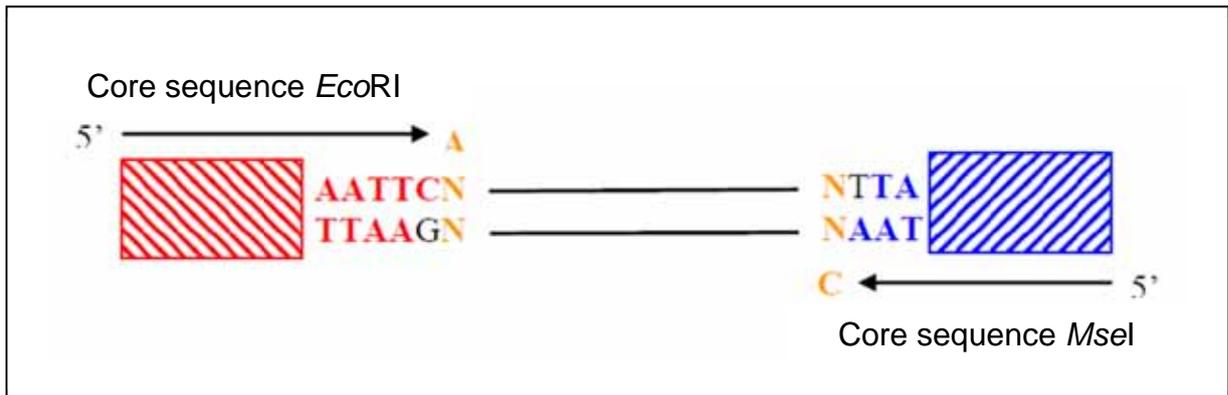


Figura 4. Pré-amplificação usando 'A' como nucleotídeo seletivo no iniciador *EcoRI* e 'C' no *MseI*.

3.6.4. Amplificação seletiva

Na etapa de amplificação seletiva podem ser adicionados à extremidade 3' das sequências de primers de zero a dois nucleotídeos. Assim, apenas fragmentos que possuam nucleotídeos complementares aos nucleotídeos seletivos serão amplificados. Os primers *EcoRI* utilizados nessa etapa podem ser marcados com fluorescências (NED, FAM e JOE), o que possibilita a análise dos fragmentos por meio de um sequenciador (Figura 5). A reação seletiva foi constituída de 0,5 μL do primer *MseI* (0,22 μM), 0,5 μL do primer *EcoRI* (45 M), 7,5 μL de *Core Mix* (tampão, nucleotídeos e *AmpliTaq® DNA polimerase*) e 0,5 μL do produto da reação de pré-amplificação. O programa de termociclagem utilizado para a reação encontra-se na Tabela 3.

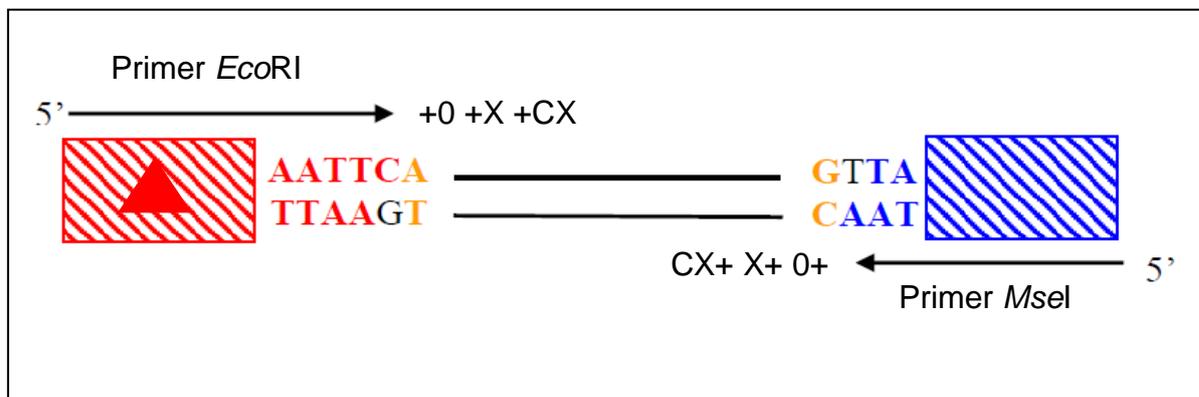


Figura 5. Amplificação seletiva, na qual pode ser acrescentado nucleotídeos às extremidades 3' dos primers de acordo com o polimorfismo esperado. Os primers *EcoRI* são marcados com fluorescência (Δ).

Para a visualização dos fragmentos, foram utilizados 0,5 µL do produto da amplificação seletiva de cada isolado, 0,36 µL do padrão de tamanho molecular GeneScan ROX 500 (Applied Biosystems) e 9 µL de formamida. Posteriormente, as amostras foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos e colocadas imediatamente no gelo. Os fragmentos foram visualizados em um sequenciador ABI 3100 (Applied Biosystems), utilizando-se polímero POP6 e um capilar de 50 cm.

Testes foram realizados para a seleção dos melhores primers capazes de evidenciar a possível diversidade genética entre os isolados. Assim, foram selecionados três primers para compor as análises de AFLP, por apresentarem maior número de bandas polimórficas: JOE*EcoRI-G/MseI-CA, NED*EcoRI-C/MseI-CA e JOE*EcoRI-G/MseI-CT.

Tabela 3. Programa do termociclador para amplificação seletiva.

Passo único	Ciclos			Nº de ciclos
94°C por 2 min	94°C - 20 seg	66°C - 30 seg	72°C - 2 min	1
-	94°C - 20 seg	65°C - 30 seg	72°C - 2 min	1
-	94°C - 20 seg	64°C - 30 seg	72°C - 2 min	1
-	94°C - 20 seg	63°C - 30 seg	72°C - 2 min	1
-	94°C - 20 seg	62°C - 30 seg	72°C - 2 min	1
-	94°C - 20 seg	61°C - 30 seg	72°C - 2 min	1
-	94°C - 20 seg	60°C - 30 seg	72°C - 2 min	1
-	94°C - 20 seg	59°C - 30 seg	72°C - 2 min	1
-	94°C - 20 seg	58°C - 30 seg	72°C - 2 min	1
-	94°C - 20 seg	57°C - 30 seg	72°C - 2 min	1
-	94°C - 20 seg	56°C - 30 seg	72°C - 2 min	20
60°C por 30 min	-	-	-	1
4°C	-	-	-	1

3.6.5. Análise dos dados de AFLP

Primeiramente, os dados foram analisados no sequenciador por meio do *software* Data Collection (Applied Biosystems). Após, os dados foram coletados e escaneados pelo *software* GeneScan versão 3.7 (Applied Biosystems) utilizando-se como padrão de tamanho molecular o GeneScan ROX 500 (Figura 6). Os projetos criados pelo *software* GeneScan permitiram a leitura detalhada dos picos utilizando-se o *software* Genotyper versão 3.7 (Applied Biosystems). Assim, com o auxílio desse *software* foi possível marcar criteriosamente o tamanho molecular de cada pico, obtendo-se uma matriz binária, cujo princípio é o de ausência, representado pelo 0, e presença, representado pelo número 1, de um pico de mesmo tamanho molecular.

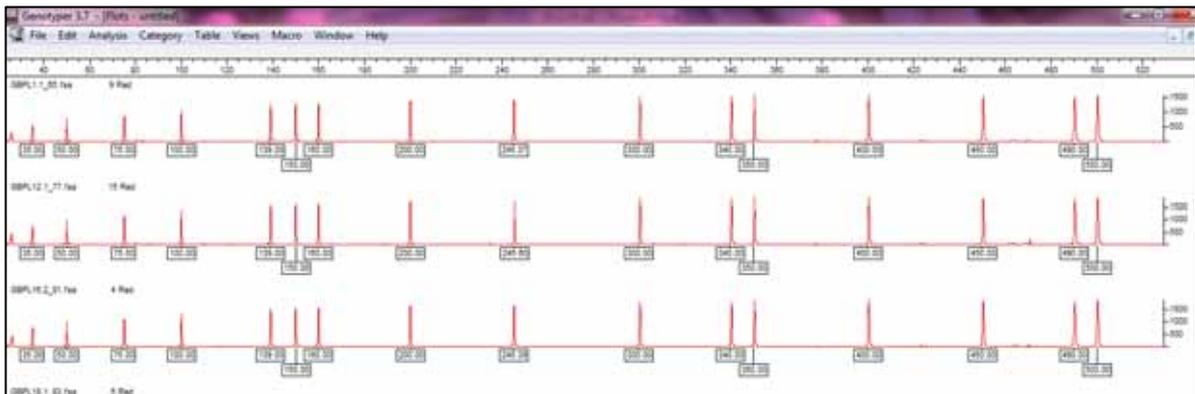


Figura 6. Padrão de tamanho molecular GeneScan ROX 500 – 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 245, 300, 340, 350, 400, 450, 490 e 500 pb.

A matriz binária obtida foi convertida em uma matriz de distância por meio do *software* PAUP versão 4.0b10 (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*) (SWOFFORD, 2002). Essa matriz foi utilizada na construção dos dendrogramas para a visualização das relações genéticas estabelecidas entre os isolados. Os dendrogramas foram gerados utilizando-se o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average*), pelo *software* MEGA 5.0 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (TAMURA et al., 2011). O mesmo *software* foi utilizado para o cálculo das distâncias genéticas dentro e entre grupos. A distância

genética entre grupos foi calculada pela fórmula $d_A = d_{XY} - [(d_X + d_Y)/2]$, onde d_{XY} é a média da distância genética entre os grupos X e Y, e d_X e d_Y são as distâncias médias dentro dos grupos.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção dos isolados e caracterização fenotípica das colônias de *Phyllosticta* spp.

A caracterização fenotípica das colônias de *Phyllosticta* spp., baseada na forma, coloração, presença de halo e textura, possibilitou classificá-las de 1 a 9, de acordo com o aspecto visual das mesmas (Figuras 7A, 7B e 7C). Assim, no total foram selecionados, de acordo com fenótipo das colônias, 102 isolados para compor as análises moleculares (Tabela 4).

4.2. Sequenciamento e análise das relações filogenéticas

Os isolados obtidos foram classificados em *P. capitalensis*, *P. brazilianiae* e em outras duas espécies de *Phyllosticta* spp., de acordo com o GenBank. Os isolados de *P. capitalensis* e *P. brazilianiae* foram identificados com similaridade de 99 a 100% com as sequências de DNA depositadas no banco de dados. O isolado MBPL25.8, por outro lado, não pôde ser identificado quanto à espécie, uma vez que a sequência ITS do mesmo alinhou-se apenas às de *Phyllosticta* sp. depositadas no GenBank, enquanto as sequências ACT e GPDH alinharam-se a *P. bifrenariae* (92 a 94%). Já em outro grupo de isolados (MBPL20.9, MBPL22.9, MBPL21.9, MBPL24.9 e MBPL30.9), a sequência ITS apresentou identidade de 100% com *Phyllosticta* sp., enquanto as sequências ACT e GPDH foram similares às de *P. citriasiana*, *P. citricarpa*, *P. hostae* e *P. hypoglossi* (93 a 96%).

O alinhamento de todas as sequências concatenadas de ITS, ACT e GPDH foi utilizado para gerar a árvore filogenética pelo método de Máxima Parcimônia

(Figuras 8 e 9). Nessa análise foram geradas 636 árvores mais parcimoniosas, dentre as quais a concenso correspondeu aos seguintes dados: comprimento da árvore = 642; Índice de Consistência= 0,613946; Índice de Retenção= 0,928255; Índice de Consistência Rescalonada= 0,600040. Os isolados foram agrupados, na árvore filogenética, em quatro clados, nos quais três destes foram bem suportados pelo bootstrap, com valores superiores a 70%.

No primeiro clado agruparam-se isolados identificados como *P. capitalensis* (bootstrap = 83%), todos oriundos de tecidos sintomáticos e assintomáticos de goiabeiras e de folhas assintomáticas de mangueiras, de diferentes ambientes bioecológicos (Figura 8). Neste clado também agruparam-se as sequências *G. psidii* e *G. sansevieriae* do banco de dados. Tal resultado indica que *G. psidii* e *G. sansevieriae* podem ser conspecíficas com *P. capitalensis*. Por outro lado, uma sequência adicional, classificada como *G. mangiferae* (IMI 260576) se uniu ao clado *P. capitalensis* com baixo valor de bootstrap (23%), indicando que esta espécie, considerada até recentemente como teleomorfo de *P. capitalensis* (BAAYEN et al., 2002; WICKERT et al., 2009) pode não ser admitida como tal, segundo indicações de outros pesquisadores (BAYEEN et al., 2002; GLIENKE et al., 2011).

O segundo clado foi composto por isolados que enquadraram-se em *P. brazilianiae*, com bootstrap de 99% (Figura 9). No terceiro clado, por outro lado, encontra-se apenas um isolado, MBPL25.8, oriundo de mangueira de banco de germoplasma e classificado como *Phyllosticta* sp., que provavelmente pertence a uma espécie ainda não identificada, fato este também observado para o quarto clado que constituiu-se de cinco isolados oriundos de mangueiras de banco de germoplasma, suportado pelo bootstrap (99%).

Tabela 4. Origem dos isolados de *Phylllosticta* e os códigos usados para sua nomenclatura: (hospedeiro) + (área de coleta) + (procedência) + (tecido vegetal) . (aspecto da colônia) + (número do isolado) = (número de isolados obtidos)

Hospedeiro (código)	Área de coleta (código)	Procedência ^b (código)	Variedade	Tecido vegetal (código)	Aspecto da colônia ^c (código)	Sintoma ^d	Número de isolados
Goiabeira (G)	Banco de germoplasma ^a (B)		Vários	Folhas (L)	1 ou 2	A	15
		Vista Alegre do Alto (V)	Tailandesa	Folhas (L)	1, 2 ou 3	A	18
	Área de produção (P)	Taquaral (Ta)	Paluma	Frutos (F)	1, 2 ou 3	S	4
		Matão (M)	Paluma	Frutos (F)	1, 2 ou 3	S	1
Itápolis (I)		Paluma	Frutos (F)	1, 2 ou 3	S	5	
Mangueira (M)	Banco de germoplasma (B)		Vários	Folhas (L)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9	A	47
	Área de produção (P)	Taquaritinga (Tt)	Palmer	Folhas (L)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9	A	12

^a Banco de germoplasma pertencente a APTA (Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios).

^b Municípios do estado de São Paulo, Brasil.

^c Aspectos das colônias: referente às morfologias descritas nas figuras 7A, 7B e 7C.

^d A: isolados obtidos de folhas assintomáticas; S: isolados obtidos de frutos com sintoma de podridão preta.

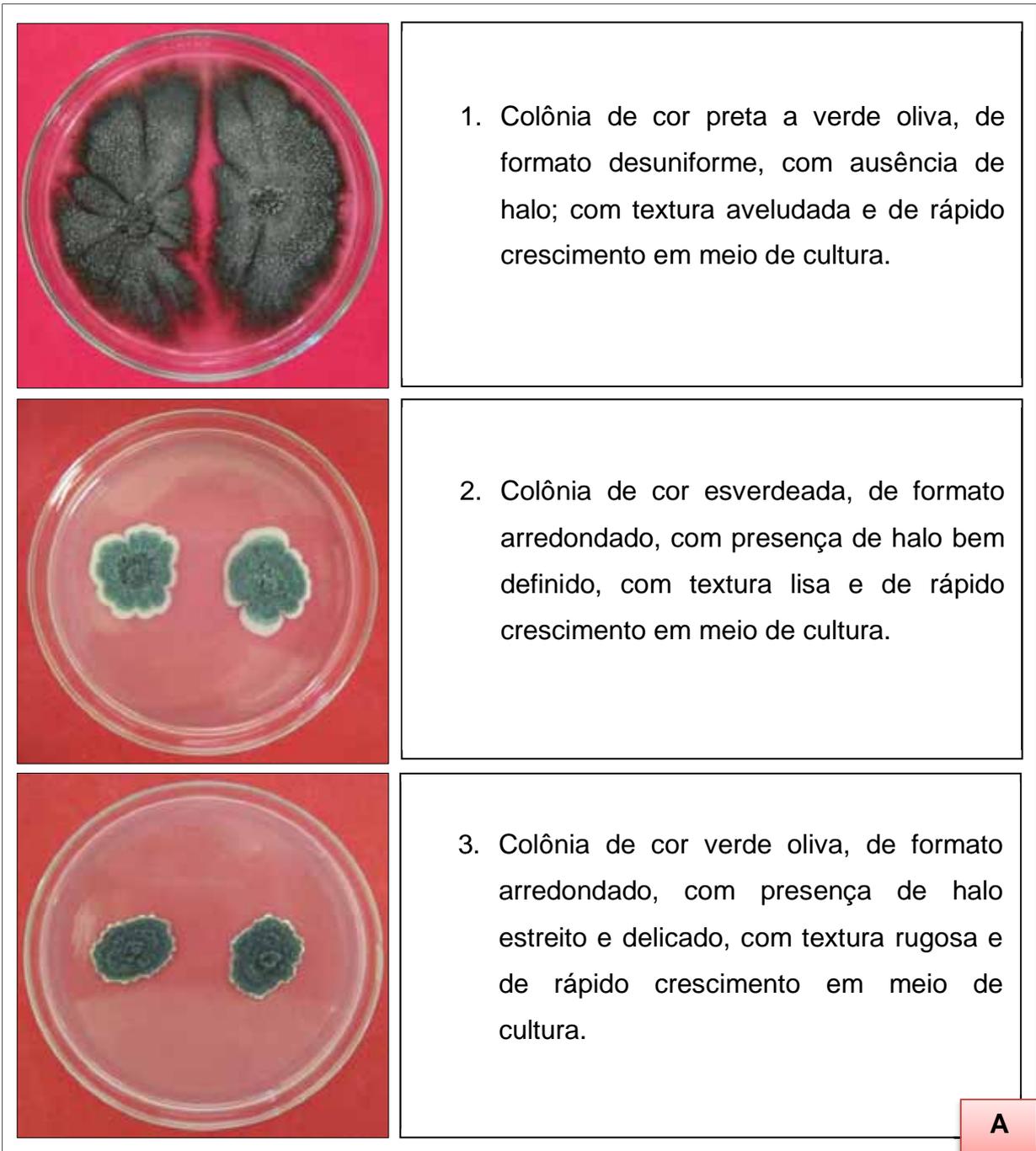


Figura 7A. Característica fenotípica das colônias de *Phyllosticta capitalensis*.

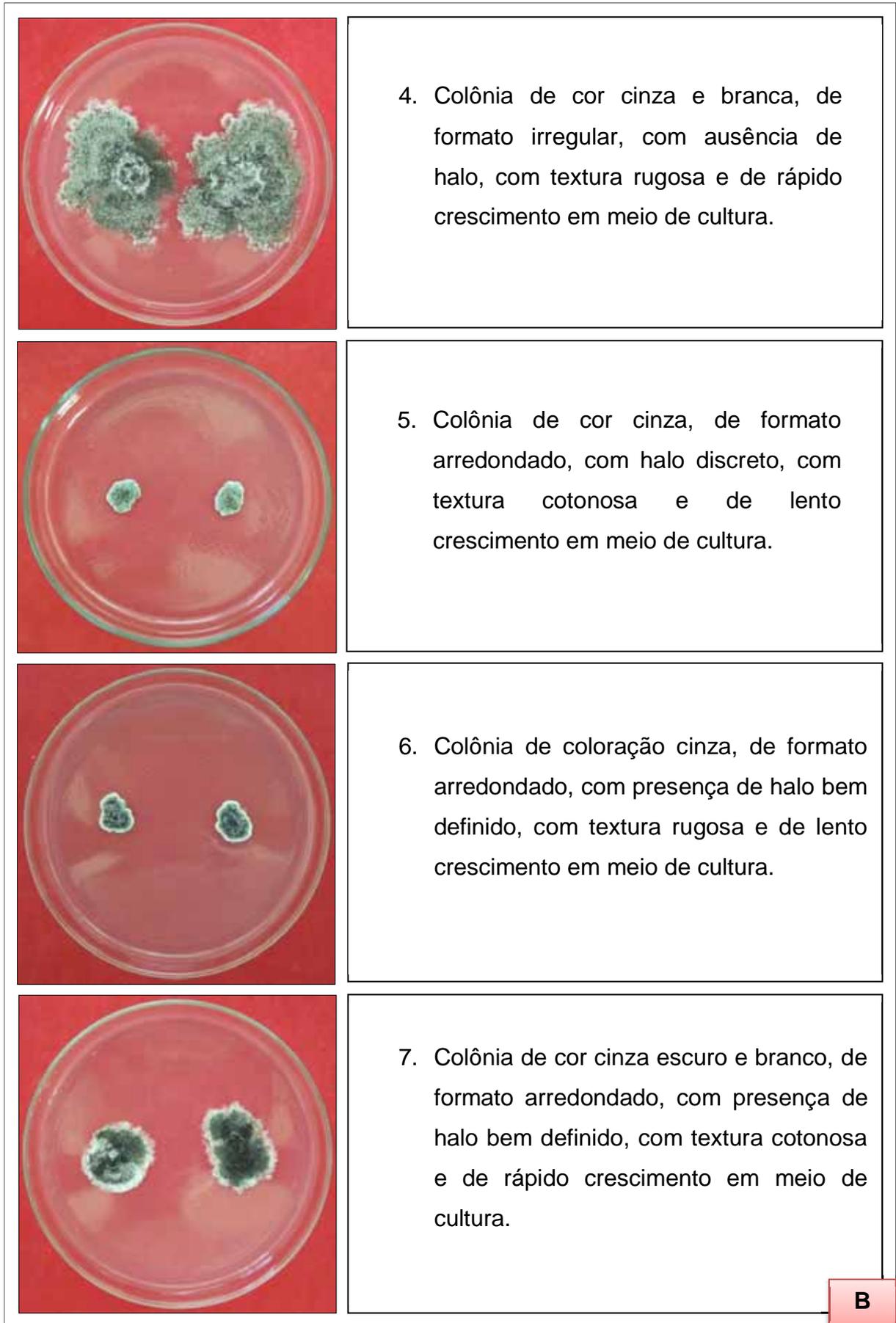
**B**

Figura 7B. Característica fenotípica das colônias de *Phyllosticta brazilianiae*.

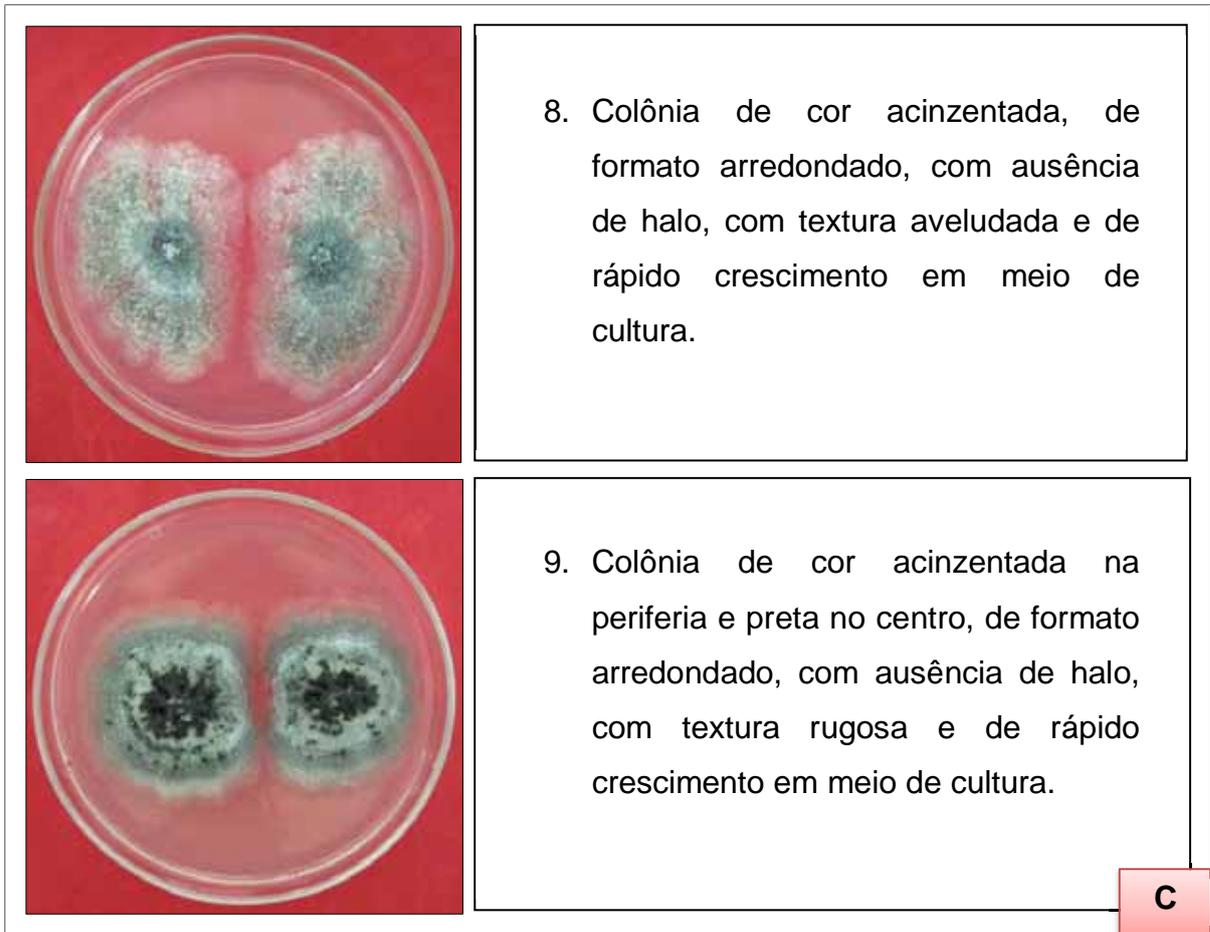


Figura 7C. Característica fenotípica das colônias de *Phyllosticta* spp.

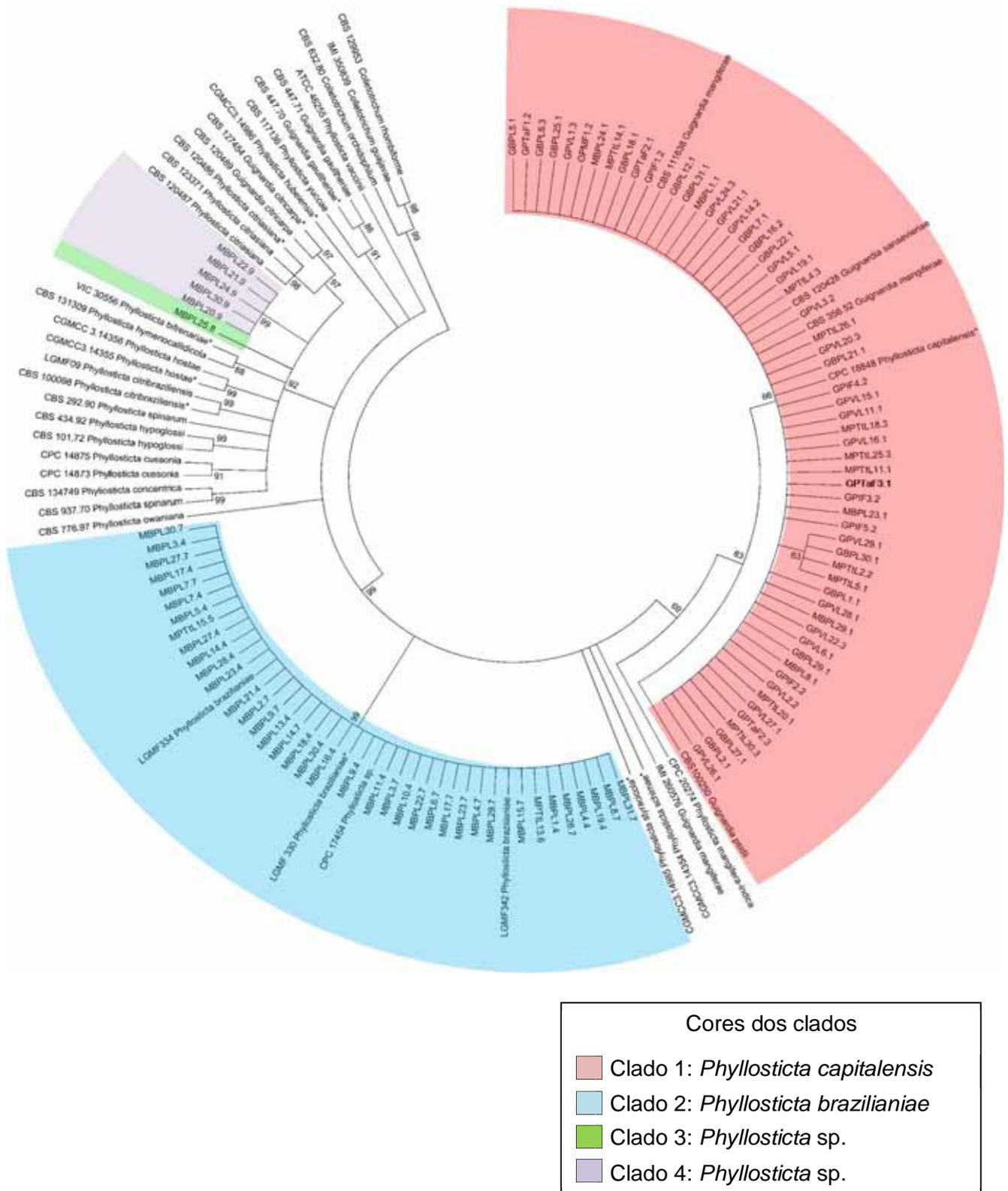


Figura 8. Árvore filogenética gerada pelo método da Máxima Parcimônia a partir do alinhamento concatenado das sequências ITS, ATC e GPDH.

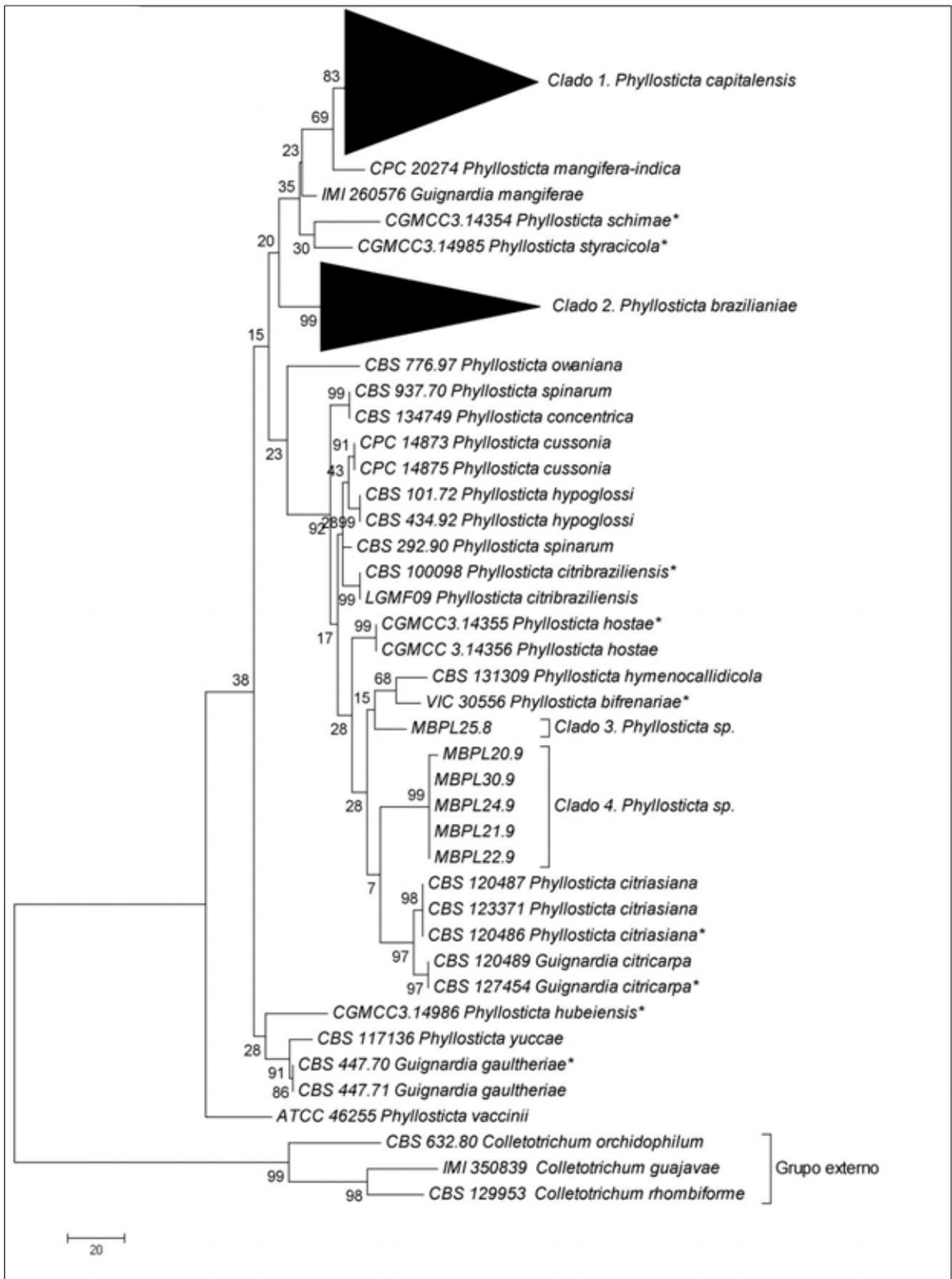


Figura 9. Árvore filogenética gerada pelo método da Máxima Parcimônia a partir do alinhamento concatenado das sequências ITS, ATC e GPDH.

4.3. Desenvolvimento dos marcadores fAFLP

Os primers da reação PCR seletiva selecionados proporcionaram a obtenção de 638 picos polimórficos, denotando um alto polimorfismo entre os isolados (Figura 10).



Figura 10. Leitura dos picos polimórficos dos isolados MBPL22.9 e MBPL23.1, utilizando-se os primers JOE*EcoRI-G/MseI-CA, NED*EcoRI-C/MseI-CA e JOE*EcoRI-G/MseI-CT, por meio do software Genotyper 3.7.

Conforme o dendrograma construído a partir da matriz de distância, pôde-se observar que os 102 isolados do estudo foram divididos em quatro grupos, G1, G2, G3 e G4, formados segundo a classificação em espécie dos mesmos, sendo o G1 formado pela espécie *P. capitalensis*, o G2 pelo isolado MBPL25.8, classificado como *Phyllosticta* sp., o G3 por *P. brazilianiae* e o G4 por isolados identificados como *Phyllosticta* sp. cuja característica morfológica é distinta das demais espécies (Figura 11).

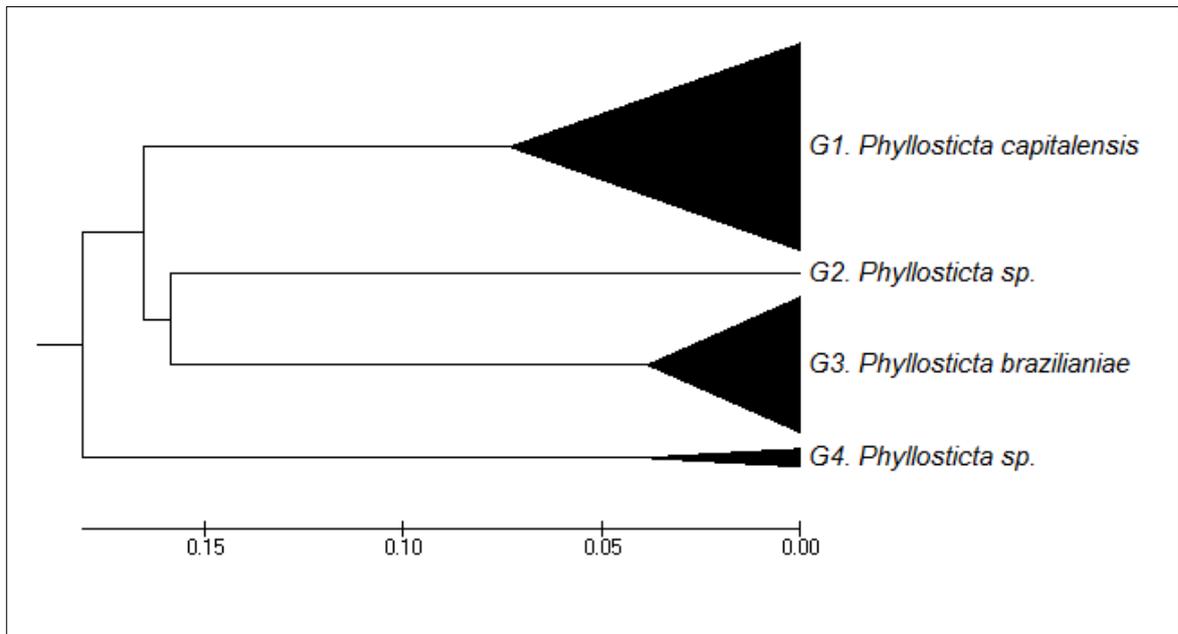


Figura 11. Dendrograma formado pelo agrupamento UPGMA obtido pela análise fAFLP. Os 102 isolados do estudo foram subdivididos em quatro grupos, sendo o G1 formado por isolados da espécie *Phyllosticta capitalensis*, o G2 constituído pelo isolado MBPL25.8, classificado como *Phyllosticta* sp., o G3 constituído por indivíduos da espécie *P. brazilianiae* e o G4, formado pelos isolados *Phyllosticta* sp.

O grupo G1 foi composto por isolados de *P. capitalensis* que, em geral, distribuíram-se dentro do agrupamento de maneira randomizada, com exceção do subgrupo G1.1, formado por isolados obtidos de frutos sintomáticos de goiabeiras provenientes de pomares comerciais, cujo aspecto das colônias foi classificado como 2 e do subgrupo G1.2, formado apenas por isolados obtidos de folhas assintomáticas de goiabeiras (Figura 12). Notou-se que os isolados do subgrupo G1.2 são, em sua maioria, provenientes de banco de germoplasma, com exceção de apenas um isolado obtido de área de produção (GPVL1.3), remetendo à sugestão de que os fungos que compartilham este perfil genético podem ter sofrido uma seleção em área de produção. Neste mesmo agrupamento G1, destacou-se o subgrupo G1.3, formado somente pelo isolado GPTaF2.3, fenotipicamente

classificado como 3, que apresentou-se distante geneticamente dos demais (0,145), fato este não observado pela análise das sequências gênicas.

O isolado MBPL25.8, como observado nas análises de sequenciamento, formou um grupo (G2) distante geneticamente dos demais (Tabela 5). O isolado é proveniente de folhas assintomáticas de mangueira de banco de germoplasma e o aspecto da colônia é único, descrito como morfologia 8 (Figura 7B).

O grupo G3 foi composto por isolados de *P. brazilianiae* (Figura 13). Neste grupo destacou-se o subgrupo G3.1, formado apenas pelo isolado MPTtL15.5, obtido de folhas assintomáticas de mangueira oriunda de área de produção comercial da fruta, sendo este o único isolado classificado como pertencente ao aspecto de colônia 5. Apesar de ter se destacado no grupo, a distância genética entre este e os demais isolados não mostrou-se expressiva (0,033) (Tabela 5). Os demais isolados distribuíram-se de maneira randomizada no grupo, incluindo o isolado MPTtL13.6, também obtido de pomar comercial, cuja morfologia da colônia, classificada como 6, foi única para este isolado. Com exceção desses dois isolados obtidos de área de produção, os demais isolados deste grupo são oriundos de banco de germoplasma, denotando-se que tal espécie não é comumente encontrada em áreas que recebem tratamentos fitossanitários.

No grupo G4 agruparam-se apenas isolados de *Phyllosticta* sp. oriundos de folhas assintomáticas de mangueiras provenientes de banco de germoplasma (Figura 13). Estes isolados apresentaram aspecto fenotípico característico, classificado como 9, e essa característica sugere que o mesmo pertença a uma nova espécie de *Phyllosticta*, ainda não identificada.

Assim, a maior distância genética entre isolados pertencentes a um mesmo agrupamento foi observada entre isolados da espécie *P. capitalensis* (G1), seguido de *P. brazilianiae* e daqueles integrantes do grupo G4. Por outro lado, os grupos apresentaram distâncias genéticas semelhantes entre si, cujos valores foram consideráveis, indicando alta diversidade genética entre as diferentes espécies de *Phyllosticta* (Tabela 5).

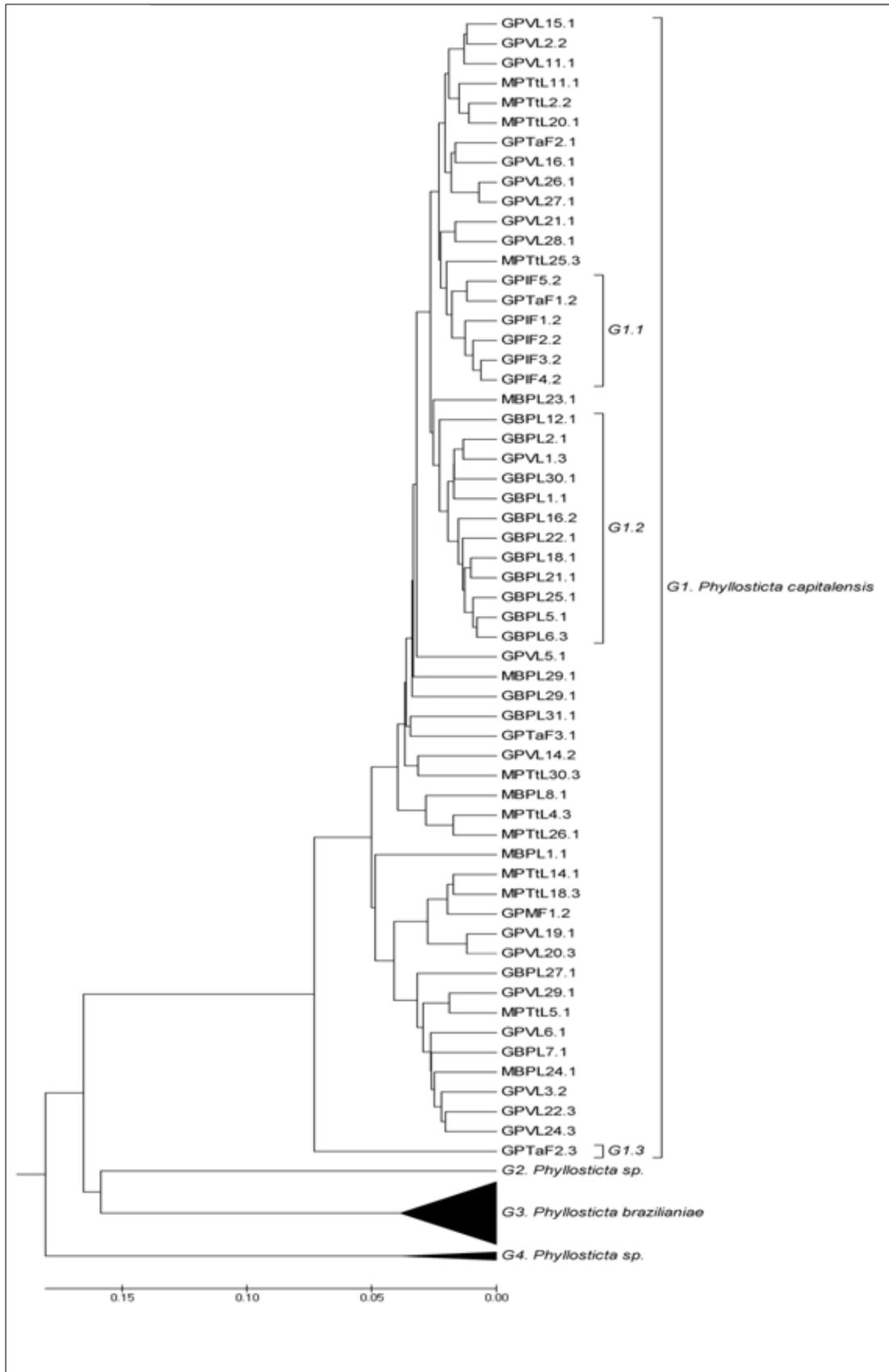


Figura 12. Dendrograma formado por isolados de *Phyllosticta* spp. obtido a partir das análises fAFLP. Destaque para o grupo G1 constituído por isolados *Phyllosticta capitalensis*.

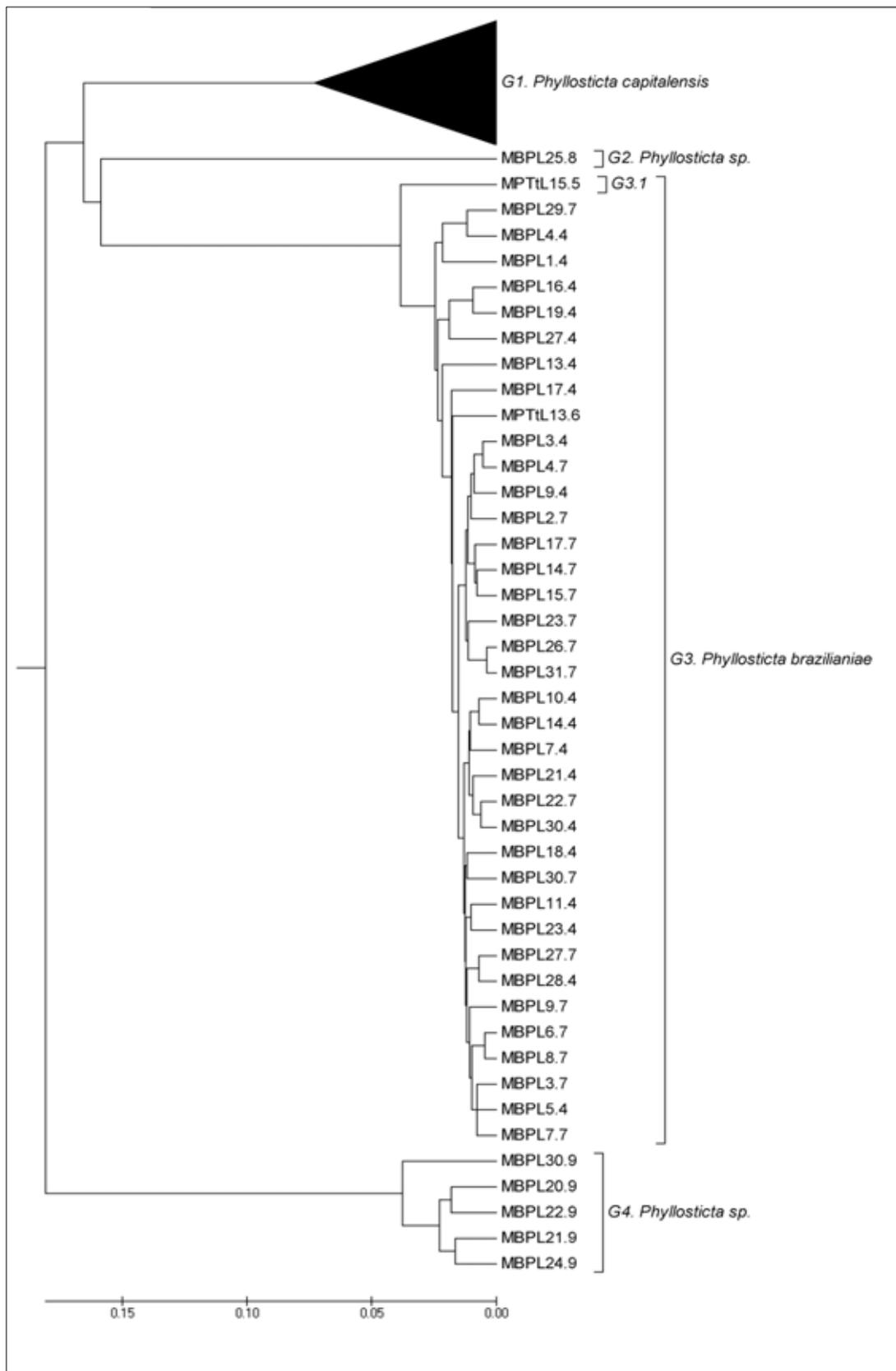


Figura 13. Dendrograma formado por isolados de *Phyllosticta* spp. obtido a partir das análises fAFLP. Destaque para os grupos G2, G3 e G4 constituídos por isolados *Phyllosticta* sp., *Phyllosticta brazilianiae* e *Phyllosticta* sp., respectivamente.

Tabela 5. Média da distância genética dentro dos grupos e dentro dos subgrupos, e distância genética (d_A) entre grupos e subgrupos.

Grupos	Dentro dos grupos	Subgrupos	Dentro dos subgrupos	Subgrupos			Grupo		
				G1.1	G1.2	G1.3	G2	G3.1	G4
G1	0,086	G1.1	0,029	-					
		G1.2	0,035	0,055	-				
		G1.3	-	0,139	0,153	-			
G2	-	-	-	0,335	0,344	0,342	-		
G3	0,035	G3.1	-	0,324	0,333	0,306	0,324	-	
G4	0,055	-	-	0,369	0,382	0,360	0,381	0,344	-

5. DISCUSSÃO

O sequenciamento da região ITS e dos genes ACT e GPDH possibilitaram a distinção entre as espécies de *Phyllosticta* spp. dos 102 isolados obtidos neste estudo, assim como os resultados obtidos por outros pesquisadores (WICKERT et al., 2009; WULANDARI et al., 2009; GLIENKE et al., 2011; SU e CAI, 2012; WONG et al., 2012; WIKEE et al., 2013; ZHANG et al., 2013). Foram identificadas as espécies *P. capitalensis* e *P. brazilianiae* e, outras duas espécies, cuja identificação ainda não foi realizada, denominadas até então de *Phyllosticta* sp.

Mediante os resultados, verificou-se que goiabeiras e mangueiras são plantas hospedeiras de *P. capitalensis* e que mangueiras podem abrigar diferentes espécies de *Phyllosticta* dependendo das condições ambientais as quais as mesmas se encontram. Notou-se que a espécie *P. capitalensis* ocorre em sua maioria em pomares comerciais de mangueiras, enquanto a espécie *P. brazilianiae* pode ser encontrada geralmente em banco de germoplasma, assim como as outras espécies ainda não identificadas, denotando a flexibilidade de *P. capitalensis* de sobreviver sob pressão de seleção em detrimento das demais espécies.

No Brasil, os únicos estudos envolvendo análises moleculares, *Phyllosticta*, goiabeiras e mangueiras, abordaram apenas o estudo de populações do fungo

obtidas de banco de germoplasma (WICKERT et al., 2009; WICKERT et al., 2014). Estes pesquisadores relataram primeiramente a presença de duas espécies de *Phyllosticta* não identificadas colonizando mangueiras, além da *P. capitalensis* (WICKERT et al., 2009). Posteriormente, Glienke et al. (2011) identificaram uma das espécies oriundas de mangueiras, descrita anteriormente por Wickert et al. (2009), como *P. brazilianiae*. A outra espécie ainda não identificada, relatada por WICKERT et al. (2009), corresponde ao clado 4 das análises filogenéticas, formado por isolados deste estudo, e à característica fenotípica 9. Ainda, neste estudo foram encontradas além dessas espécies, outra ainda não relatada na literatura, referente ao isolado MBPL25.8, cujo aspecto morfológico corresponde a 8, mostrando a diversidade de espécies que podem habitar mangueiras que não sofrem tratamentos fitossanitários.

Por outro lado, goiabeiras são, possivelmente, hospedeiras apenas de *P. capitalensis*, cujos resultados corroboram aqueles publicados por Wickert et al. (2009). Embora a espécie *G. psidii* tenha sido descrita na literatura como a responsável pela expressão dos sintomas de podridão em frutos de goiabeira (TOZELLO e RIBEIRO, 1998; ESCANFERLA et al., 2009), não há disponibilidade de sequências de uma coleção de isolados classificados como *G. psidii* no banco de dados. Além disso, as sequências ITS e ACT de *G. psidii* do banco de dados agruparam-se junto às sequências de *P. capitalensis* deste estudo e com aquelas depositadas no GenBank, denotando que possivelmente tratam-se de espécies conspecíficas (WICKERT et al., 2009; STRINGARI et al., 2009; GLIENKE et al., 2011; WICKERT et al., 2014). Na tentativa de elucidar a distinção entre as espécies *P. capitalensis* e *G. psidii*, Wickert et al. (2009) obtiveram uma coleção de isolados de *Phyllosticta* de goiabeiras, sem sucesso no isolamento da suposta *G. psidii*, assim como os resultados obtidos neste estudo.

Na árvore filogenética notou-se que as sequências de *G. mangiferae* (IMI 260576) se agruparam no mesmo clado das *P. capitalensis*, porém com baixo valor de bootstrap, diferentemente do observado por outros pesquisadores (OKANE et al., 2001; GLIENKE et al., 2011), que sugeriram, portanto, que *P. capitalensis* não seria o anamorfo de *G. mangiferae*, como relatado anteriormente (BAAYEN et al., 2002). A espécie *G. mangiferae* foi descrita inicialmente por Roy, em 1968, que relatou a

ocorrência desse fungo em sintomas de necrose em folhas de mangueiras, na Índia. Com base em comparações morfológicas e culturais, este pesquisador descreveu esta espécie como sendo o teleomorfo de *P. capitalensis*. Posteriormente, Okane et al. (2001), observaram em um estudo envolvendo análises morfológicas e moleculares que as sequências ITS de apenas dois isolados da espécie *G. endophyllicola*, endófito de plantas da família Ericaceae, apresentavam similaridade com as sequências ITS de isolados de *P. capitalensis*, que por sua vez, não eram similares à *G. mangiferae*, observação esta realizada novamente por Glienke et al. (2011).

No entanto, a análise de apenas uma sequência de *G. mangiferae* e duas de *G. endophyllicola* não são suficientes para uma classificação definitiva (WIKKEE et al., 2011). Assim, além dos testes de patogenicidade que se fazem necessários, uma revisão acerca das interações patógeno-hospedeiro, incluindo o táxon, complementado com análises morfoculturais e moleculares são também imprescindíveis para dirimir essas incertezas.

Muitos gêneros de fungos endofíticos pertencentes à Ordem Botryosphaerales podem apresentar comportamento ecológico diferencial, tornando-se saprófitos ou patógenos, muitas vezes muito virulentos, dependendo das condições ambientais e/ou fisiológicas em que o hospedeiro se encontra (ÁLVAREZ-LOAYZA et al., 2011; SLIPPERS e WINGFIELD, 2007; HUANG e WANG, 2011; PROMPUTTHA et al., 2005; PROMPUTTHA et al., 2007; PROMPUTTHA et al., 2010). Além do impasse envolvendo a classificação da fase teleomórfica de *P. capitalensis*, este fungo apresenta comportamento variável quanto às relações com seus hospedeiros.

Embora a maioria dos estudos indiquem a prevalência de *P. capitalensis* na condição de endofítico, a comprovação da patogenicidade desse fungo já foi relatada em associação com as orquídeas da espécie *Bifrenia harrisoniae* (SILVA et al., 2008) e do gênero *Stanhopea*, hospedeiro do qual foi descrita a espécie-tipo de *P. capitalensis*. Adicionalmente, estudos recentes apontaram que isolados desta espécie de fungo provenientes de diferentes hospedeiros como eucalipto, citros, banana, jabuticaba, pitanga e goiabeiras foram capazes de ocasionar lesões pretas em frutos de goiaba, indicando ausência de especificidade de hospedeiro de *P.*

capitalensis (WICKERT et al., 2014). No entanto, Wikee et al. (2013) observaram que isolados *P. capitalensis* obtidos de folhas sintomáticas e assintomáticas de *Cordyline fruticosa*, *Dendrobium lindleyi*, *Ficus* sp., *Ophiopogon japonicus* e *Punica granatum*, plantas ornamentais comumente cultivadas na Tailândia, não ocasionaram sintomas quando inoculados em folhas saudáveis de seus hospedeiros, com indicação, portanto, de que essa espécie é de fato endofítica para tais plantas. Assim, tendo em vista que *P. capitalensis* é uma espécie cosmopolita, coloniza uma vasta gama de hospedeiros, e pode ocasionar sintomas em algumas espécies de plantas, há necessidade de mais estudos envolvendo testes de patogenicidade cruzados entre plantas que abrigam esta espécie de fungo.

Os resultados obtidos pela análise com marcadores moleculares fAFLP, validaram aqueles obtidos pelo sequenciamento. Estes marcadores foram eficientes na separação dos isolados quanto à espécie, notando-se uma considerável distância genética entre as quatro diferentes espécies de *Phyllosticta* relatadas neste estudo, representadas pelos agrupamentos G1, G2, G3 e G4 do dendrograma. Tais resultados corroboram aqueles encontrados por Baldassari et al. (2008), Wickert et al. (2014) e Stringari et al. (2009).

Embora o grupo G1 tenha sido formado por isolados *P. capitalensis* que, em sua maioria, distribuíram-se dentro do agrupamento de maneira randomizada, destacaram-se dois subgrupos, sendo o G1.1 formado por 6 isolados e o G1.3 por apenas um indivíduo, provenientes de frutos sintomáticos de goiabeiras de pomares comerciais. Como tais frutos foram coletados em áreas de produção comercial onde ocorre pressão de seleção ocasionada principalmente pela aplicação sucessiva de fungicidas no controle de doenças presentes em alta intensidade, é provável que esteja ocorrendo nessas áreas o surgimento de estirpes de *P. capitalensis* mais adaptadas, e provavelmente com comportamento diferencial aos grupos de fungicidas empregados. Ou então, é possível que esteja ocorrendo uma especiação de *P. capitalensis* entre indivíduos endofíticos e patogênicos. Pese a isto o fato de que, segundo a literatura, *P. capitalensis* é uma espécie de fungo fracamente patogênica (WIKKEE et al., 2013). Testes de patogenicidade futuros poderão revelar a especialidade do isolado GPTaF2.3 (G1.3), além de ser o único cujo aspecto de colônia foi denominado como 3.

Em *G1*, notou-se também a formação de outro subgrupo, o *G1.2*, constituído apenas por isolados obtidos de folhas assintomáticas de goiabeiras, que em sua maioria, foram provenientes de banco de germoplasma, com exceção de apenas um isolado obtido de área comercial (GPVL1.3), remetendo à sugestão de que os fungos que compartilham este perfil genético podem ter sofrido uma seleção em área de produção.

Quanto ao grupo *G3*, formado por isolados *P. brazilianiae* obtidos de folhas assintomáticas de mangueiras, apenas dois isolados são provenientes de áreas de produção, sendo os demais isolados oriundos de banco de germoplasma, denotando-se que tal espécie ainda não está adaptada aos tratamentos fitossanitários, embora a presença de dois isolados de áreas comerciais neste grupo aponte que no futuro existe a possibilidade de adaptação dessa população. Observação similar pode ser realizada para os grupos *G2* e *G4*, ainda não identificados em espécie. Os isolados que compõem ambos os grupos são provenientes de mangueiras de banco de germoplasma, indicando que estes podem não estar adaptados ao ambiente de áreas comerciais e, portanto, por serem raramente isolados, ainda não foram identificados em espécie por outros pesquisadores.

Assim, nesse estudo, em termos de composição da comunidade microbiana constituída por fungos do gênero *Phyllosticta*, foi observado um comportamento ecológico diferencial entre os isolados, cuja espécie, incidência e frequência dos mesmos encontraram-se relacionados à possível estabilidade do ecossistema.

6. CONCLUSÃO

- Análise mediante avaliação das sequências das regiões ITS1-5.8S-ITS2 e dos genes codificadores da ACT e GPDH possibilitou a identificação de quatro espécies do gênero *Phyllosticta*, sendo a *P. capitalensis* presente em mangueiras e goiabeiras, e a *P. brazilianiae* e outras duas espécies ainda não identificadas, presentes apenas em mangueiras;

- Há um comportamento diferenciado entre as espécies de *Phyllosticta* em função das condições bioecológicas em que se encontram as mangueiras, sob baixa e alta pressão de seleção oriunda do emprego de agroquímicos. As espécies de *Phyllosticta* ainda não identificadas e noventa e cinco por cento dos isolados da espécie *P. brazilianiae* estão presentes apenas em mangueiras de banco de germoplasma;
- Marcadores fAFLP, aplicados na interação *Phyllosticta-M.indica* e *Phyllosticta-P. guajava*, foram eficientes na caracterização molecular de isolados de fungos do gênero, de diferentes populações, cujos resultados corroboram aqueles obtidos mediante análise das sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 e dos genes codificadores da ACT e GPDH;
- Há fungos do gênero *Phyllosticta* associados a mangueiras e goiabeiras que não se enquadraram nos padrões morfológicos, culturais e moleculares àqueles apresentados na literatura, com indicação da existência de novas espécies associadas aos ambientes agroecológicos analisados;
- Baseado nos estudos das sequências das regiões ITS e gênicas, assim como dos marcadores fAFLP, tem-se indicação de que, baseado na literatura, *P. capitalensis* apresenta uma abrangência ecológica mais ampla em termos de hospedeiros, assim como do seu comportamento ecológico, podendo ser a causa de diversas doenças cujo agente causal não fora ainda associado, ou o foi de forma equivocada.

7. REFERÊNCIAS

ALY, A. H.; DEBBAB, A.; KJER, J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 41, p. 1-16. 2010.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of

protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.25, p. 3389-3402, 1997.

ÁLVAREZ-LOAYZA, P.; WHITE Jr, J. F.; TORRES, M. S.; BALSLEV, H.; KRISTIANSEN, T.; SVENNING, J. C.; GIL, N. Light Converts Endosymbiotic Fungus to Pathogen, Influencing Seedling Survival and Niche-Space Filling of a Common Tropical Tree, *Iriartea deltoidea*. **Plos One**, Cambridge, v. 6, n. 1, p. 16386, 2011.

ASHIMOTO, H.; ABE, M.; HIRATA, A.; NODA, Y.; ADACHI, H.; YODA, K. Progression of the stacked Golgi compartments in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by overproduction of GDP-mannose transporter. **Yeast**, Chichester, v. 19, p. 1413-1424, 2002.

BAAYEN, R. P.; BONANTS, P. J. M.; VERKLEY, G.; CARROLL, G. C.; VAN DER AA, H. A.; DE WEERDT, M.; VAN BROUWERSHAVEN, I. R.; SCHUTTE, G. C.; MACCHERONI, W. J. R.; GLIENKE DE BLANCO, C.; AZEVEDO, J. L. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, p. 464-477, 2002.

BACIARELLEI-FALINI, L.; RUBINI, A.; RICCIONI, C.; PAOLOCCI, F. Morphological and molecular analysis of ectomycorrhizal diversity in a man-made *T. melanosporum* plantation: description of a novel truffle-like morphotypes. **Mycorrhiza**, Heidelberg, v. 16, p. 474-484, 2006.

BALDASSARI, R. B.; BRANDIMARTE, I.; ANDRADE, A. G. de; SOUZA, D. C. G.; MORETTO, C.; GOES, A. de. Indução da expressão precoce de sintomas de *Guignardia citricarpa* em frutos de laranjeira 'Pera-Rio'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.29, n.2, p.269-275, 2007.

BALDASSARI, R. B.; WICKERT, E.; GOES, A. Pathogenicity, colony morphology and diversity of isolates of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae* isolated. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 120, p.103 -110, 2008.

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

CROUS, P. W.; SUMMERELL, B. A.; SHIVAS, R. G.; BURGESS, T. I.; DECOCK, C. DREYER, L. L.; GRANKE, L. L.; GUEST, D. I.; HARDY, G. J.; HAUSBECK, D.; HÜBERLI, M. K.; JUNG, T.; KOUKOL, O.; LENNOX, C. L.; LIEW, E. C. Y.; LOMBARD, L.; MCTAGGART, A. R.; PRYKE, J. S.; ROETS, F.; SAUDE, C.; SHUTTLEWORTH, L. A.; STUKELY, M. J. C.; VÁNKY, K.; WEBSTER, B. J.; WINDSTAM, S. T.; GROENEWALD, J. Z. Fungal planet description sheets: 107–127. **Persoonia**, Leiden, v. 28, p. 138–182, 2012.

CROUS, P. W.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; RHEEDER, J.; MARASAS, W. F. O.; PHILIPS, A. J.; ALVES, A.; BURGESS, T.; BARBER, P.; GROENEWALD, J. Z. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 55, p. 235–253, 2006.

ESCANFERLA, M. E.; MORAES, S. R. G.; SALAROLI, R. B.; MASSOLA JUNIOR, N.S. Penetration Stages of *Guignardia psidii* in Guava: Effects of Temperature, Wetness Duration and Fruit Age. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 157, p. 618-624, 2009.

EWING, B.; GREEN, P. Base calling of automated sequencer traces using PHRED. II. Error probabilities. **Genome Research**, New York, v. 8, p. 186–94, 1998.

FAIRMAN, C. E. Notes on new species of fungi from various localities. **Mycologia**, New York, v. 5, n. 4, p. 245 – 248, 1913.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, Lancaster, v.39, p.783-391, 1985.

FUNGARO, M. H. P. PCR na Micologia. **BioTecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.3, p. 12 - 18, 2000.

GLIENKE, C.; PEREIRA, O; STRINGARI, D.; FABRIS, J.; KAVA-CORDEIRO, V.; GALLI-TERASAWA, L.; CUNNINGTON, J.; SHIVAS, R. G.; GROENEWALD, J.; CROUS, P. W. Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species, with reference to those associated with Citrus Black Spot. **Persoonia**, Leiden, v. 26, p. 47–56, 2011.

GOES, A. Controle da mancha-preta dos frutos cítricos. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 19, n.2, p. 305-320, 1998.

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

GUERBER, J. C.; LIU, B.; CORRELL, J. C.; JOHNSTON, P. R. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. **Mycologia**, New York, v.95, p. 872-895, 2003.

HARA, M. R.; SNYDER, S. H. Nitric oxide-GAPDH-Siah: a novel cell death cascade. **Cellular and Molecular Neurobiology**, New York, v. 26, n. 4-6, p. 527-38, 2006.

HAWKSWORTH, D. L.; CROUS, P. W.; REDHEAD, S. A.; REYNOLDS, D. R.; SAMSON, R. A.; SEIFERT, K. A.; TAYLOR, J. W.; WINGFIELD, M. J.; ABACI, Ö.; AIME, C.; ASAN, A.; BAI, F.; BEER, Z. W.; BEGEROW, D.; BERIKTEN, D.; BOEKHOUT, T.; BUCHANAN, P. K.; BURGESS, T.; BUZINA, W.; CAI, L.; CANNON, P. F.; CRANE, J. L.; DAMM, U.; DANIEL H.; VAN DIEPENINGEN, A. D.; DRUZHININA, I.; DYER, P. S.; EBERHARDT, U.; FELL, J. W.; FRISVAD, J. C.; GEISER, D. M.; GEML, J.; GLIENKE, C.; GRÄFENHAN, T.; GROENEWALD, J. Z.;

GROENEWALD, M.; GRUYTER, J.; GUÉHO-KELLERMANN, E.; GUO, L.; HIBBETT, D. S.; HONG, S.; HOOG, G. S.; HOUBRAKEN, J.; HUHDORF, S. M.; HYDE, K. D.; ISMAIL, A.; JOHNSTON, P. R.; KADAIFCILER, D. G.; KIRK, P. M.; KÖLJALG, U.; KURTZMAN, C. P.; LAGNEAU, P.; LÉVESQUE, C. A.; LIU, X.; LOMBARD, L.; MEYER, W.; MILLER, A.; MINTER, D. W.; NAJAFZADEH, M. J.; NORVELL, L.; OZERSKAYA, S. M.; ÖZİÇ, R.; PENNYCOOK, S. R.; PETERSON, S. W.; PETTERSSON, O. V.; QUAEVLIEG, W.; ROBERT, V. A.; RUIBAL, C.; SCHNÜRER, J.; SCHROERS, H.; SHIVAS, R.; SLIPPERS, B.; SPIERENBURG, H.; TAKASHIMA, M.; TAŞKIN E.; THINES, M.; THRANE, U.; UZTAN, A. H.; VAN RAAK, M.; VARGA, J.; VASCO, A.; VERKLEY, G.; VIDEIRA, S. I.R.; VRIES, R. P.; WEIR, B. S.; YILMAZ, N.; YURKOV, A.; ZHANG, N. The Amsterdam declaration on fungal nomenclature. **IMA Fungus**, Surrey, v. 2, p. 105–112, 2011.

HERNANDEZ-FONSECA, K.; MONTIEL, T.; MASSIEU, L. Inhibition of glycehaldehydes-3-phosphate dehydrogenase by oxidate stress during metabolic inhibition leads to neuronal death in cultured hippocampal neurons. **The Journal of Neuroscience**, Washington, v. 35, 2005.

HYDE, K. D.; ABD-ELSALAM, K.; CAI, L. Morphology: still essential in a molecular world. **Mycotaxon**, New York, v. 114, n.1, p. 439–451, 2010a.

HYDE, K. D.; CHOMNUNTI, P.; CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z.; DAMM, U.; KOKO, T. W.; SHIVAS, R. G.; SUMMERELL, B. A.; TAN, Y. P. A case for reinventory of Australia's plant pathogens. **Persoonia**, Leiden, v. 25, p.50-60, 2010b.

HYDE, K. D.; CAI, L.; CANNON, P. F.; CROUCH, J. A.; CROUS, P. W.; DAMM, U.; GOODWIN, P. H.; CHEN, H.; JOHNSTON, P.R. ; JONES, E. B. G.; LIU, Z. Y.; MCKENZIE, E. H. C.; MORIWAKI, J.; NOIREUNG, P.; PENNYCOOK, S. R.; PFENNING, L. H.; PRIHASTUTI, H.; SATO, T.; SHIVAS, R. G.; TAYLOR, P. W. J.; TAN, Y. P.; WEIR, B. S.; YANG, Y. L.; ZHANG, J. Z. *Colletotrichum* - names in current use. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 39, p.147–182, 2009.

HYDE, K. .; SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 33, p. 163-173, 2008.

HUANG, C.; WANG, Y. New Records of Endophytic Fungi Associated with the Araucariaceae in Taiwan. **Collection and Research**, Taichung, v. 24, p. 87-95, 2011.

IBRAF. Instituto Brasileiro de Fruticultura. 2012. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est_frutas.asp>. Acesso em: 10 fev. 2014.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W. & STALPERS, J. A. 2008. **Dictionary of the Fungi**. 10th ed. CAB International, Wallingford.

KOGEL, K. H.; FRANKEN, P.; HÜCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite – what decides? **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 9, p.358–363, 2006.

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

LATINOVIC, J.; LATINOVIC, N.; TIODOROVIC, J.; ODALOVIC, A. First Report of Anthracnose Fruit Rot of Strawberry Caused by *Colletotrichum acutatum* in Montenegro. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 96, n. 7, p. 1066, 2012.

LAZZIZERA, C.; FRISULLO, S.; ALVES, A.; LOPES, J.; PHILLIPS, A. J. L. Phylogeny and morphology of *Diplodia* species on olives in southern Italy and description of *Diplodia olivarum* sp. nov. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 31, p. 63-71, 2008.

LIMA, N. B.; BATISTA, M. V. A.; MORAIS JR, M. A.; BARBOSA, M. A. G.; MICHEREFF, S. J.; HYDE, K. D.; CÂMARA, M. P. S. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 61, p. 75 – 88, 2013.

LIU, F.; DAMM, U.; CAI, L.; CROUS, P. W. Species of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex associated with anthracnose diseases of Proteaceae. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 61, p. 89 – 105, 2013.

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**, Amsterdam, v. 57, n. 2, p. 528–535, 2010.

LOPES, M. S.; LOPES, M. T. G.; FIGUEIRA, A.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v.5, n.29, p.56-60, 2002.

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

McNEIL, J.; BARRIE, F. R.; BURDET, H. M.; DEMOULIN, V.; HAWKSWORTH, D. J.; MARHOLD, K.; NICOLSON, D. H.; PRADO, J.; SILVA, P. C.; SKOG, J. E.; WIERSEMA, J. H.; TURLANE, N. J. International Code of Botanical Nomenclature (Vienna Code). In: INTERNATIONAL BOTANICAL CONGRESS, 17., 2005, Vienna. **Abstracts**.... Ruggel: ARG Gantner Verlag, Ruggell, 2012. p.1- 568.

McNEILL, J.; BARRIE, F. R.; BURDET, H. M.; DEMOULIN, V.; HAWKSWORTH, D. L.; MARHOLD, K.; NICOLSON, D. H.; PRADO, J.; SILVA, P.C.; SKOG, J.E.; WIERSEMA, J. H. & TURLAND, N. J. International Code of Botanical Nomenclature

(Vienna Code). In: INTERNATIONAL BOTANICAL CONGRESS, 17., 2005, Vienna. **Abstracts**.... Regnum Vegetabile, 2006. p. 1- 568.

McONIE, K. C. The latent occurrence in Citrus and other hosts of a *Guignardia* easily confused with *G. citricarpa*, the citrus black spot pathogen. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 54, p. 40-43, 1964.

MYLLYS, L.; STENROOS, S.; THELL, A. New genes for phylogenetic studies of lichenized fungi: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta tubulin genes. **The Lichenologist**, London, v.34, p. 237-246, 2002.

MOTOHASHI, K.; ARAKI, I.; NAKASHIMA, C. Four new species of *Phyllosticta*, one new species of *Pseudocercospora*, and one new combination in *Passalora* from Japan. **Mycoscience**, Tokyo, v. 49, n.2, p.138 -146, 2008.

MOTOHASHI, K.; INABA, S.; ANZAI, K.; TAKAMATSU, S.; NAKASHIMA, C. Phylogenetic analyses of Japanese species of *Phyllosticta* sensu stricto. **Mycoscience**, Tokyo, v.50, p. 291–302, 2009.

NEI, M.; KUMAR. S. **Molecular evolution and phylogenetics**. Oxford: Oxford University Press, 2000. p. 333.

OKANE, I.; NAKAGIRI, A.; ITO, T. Identity of *Guignardia* sp. inhabiting ericaceous plants. **Canadian Journal of Botany**, Ontario, v. 79, p.101–109, 2001.

OKANE, I.; LUMYONG, S.; NAKAGIRI, A.; ITO, T. Extensive host range of an endophytic fungus, *Guignardia endophyllicola* (anamorph: *Phyllosticta capitalensis*). **Mycoscience**, Tokyo, v. 44, p. 353–363, 2003.

PANDEY, A. K.; REDDY, M. S.; SURYANARAYANAN, T. S. ITS-RFLP and ITS sequence analysis of a foliar endophytic *Phyllosticta* from different tropical trees. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, n.4, p. 439-44, 2003.

PERSOON, C. H. Traitesur les champignons comestibles, contenantl' undication des especesnuisible precede d'une introduction al'histoire des Champignons. **Berlin-le-Prieur**, Paris, 1818.

PEREZ, B. A.; FARINON, O. M.; BERRETTA, M. F. First Report of *Fusarium solani* causing Root Rot of olive in Southeastern Argentina. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 95, n. 11, p. 1476, 2011.

PHILLIPS, A. J. L.; ALVES, A.; PENNYCOOK, S. R.; JOHNSTON, P. R.; RAMALEY, A.; AKULOV, A.; CROUS, P. W. Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the Botryosphaeriaceae. **Persoonia**, Leiden, v. 21, p. 29–55, 2008.

PHOULIVONG, S.; CAI, L.; CHEN,H.; MCKENZIE, E. H. C.; ABDELSALAM, K.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v.44, p. 33-43, 2010.

PROMPUTTHA, L.; JEEWON, R.; LUMYONG, S.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D. Ribosomal DNA fingerprinting in the identification of nonsporulating endophytes from *Magnolia liliifera* (Magnoliaceae). **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 20, p.167–186, 2005.

PROMPUTTHA, I.; HYDE, K. D.; MCKENZIE, E. H. C.; PEBERDY, J. F.; LUMYONG, S. Can leaf degrading enzymes provide evidence that endophytic fungi becoming saprobes? **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 41, p. 89-99, 2010.

PROMPUTTHA, I.; LUMYONG, S.; VIJAYKRISHNA, D.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D.; JEEWON, R. A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. **Microbial Ecology**, Cambridge, v. 53, p. 579–590, 2007.

PU, J.; XIE, Y.; ZHANG, X.; QI, Y.; ZHANG, C.; LIU, X. Preinfection behaviour of *Phyllosticta musarum* on banana leaves. **Australasian Plant Pathology**, Queensland, v. 37, p. 60–64, 2008.

RODRIGUEZ, R. J.; REDMAN, R. S. Fungal life-styles and ecosystem dynamics: Biological aspects of plant pathogens, plant endophytes and saprophytes. **Advances in Botanical Research**, London, v. 24, p. 169-193, 1997.

ROY, A. J. Some fungi from Almora. **Indian Phytopathology**, New Delhi, p. 20, v. 340-348, 1968.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3rd ed. Londres: CSHL Press, 2001. p. 1448.

SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K. A.; HUHNDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J. L.; LEVESQUE, A. C.; CHEN, W. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Calcutta, v. 109, p. 1 – 6, 2012.

SHIVAS, R. G.; TAN & GRICE, Y. P. *Phyllosticta aristolochiicola*. **Persoonia**, Leiden, v. 29, p. 155, 2012.

SILVA, M.; PEREIRA, O. L.; BRAGA, I. F.; LELI, S. M. Leaf and pseudobulb diseases on *Bifrenaria harrisoniae* (Orchidaceae) caused by *Phyllosticta capitalensis* in Brazil. **Australasian Plant Disease**, Queensland, v. 3, p. 53-56, 2008.

SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 2-3, p. 90-106, 2007.

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**, London, v. 62, p. 1038–1047, 2013.

STAMMLER, G.; SCHUTTE, G. C.; SPEAKMAN, J.; MIESSNER, S.; CROUS, P.W. *Phyllosticta* species on citrus: Risk estimation of resistance to QoI fungicides and identification of species with cytochrome b gene sequences. **Crop Protection**, Guildford, v. 48, p. 6 – 12, 2013.

STRINGARI, D.; GLIENKE, C.; CHRISTO, D.; MACCHERONI JR., W.; AZEVEDO, J. L. High Molecular Diversity of the Fungus *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae* and New Primers for the Diagnosis of the Citrus Black Spot. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, n. 5, p.1063 1073, 2009.

SU, Y. Y.; CAI, L. Polyphasic characterisation of three new *Phyllosticta* spp. **Persoonia**, Leiden, p. 76–84, 2012.

SWOFFORD, D. L. **PAUP**: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, version 4.0b10. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 28, n. 10, p. 2731- 2739, 2011.

TAO, G.; LIU, Z.; LIU, F.; GAO, Y.; CAI, L. Endophytic *Colletotrichum* species from *Bletillaochracea* (Orchidaceae), with descriptions of seven new species. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v.61, p.139 -164, 2013.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,

positions-specific gag penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.22, p.4673-4680, 1994.

TOZETTO, L. J.; RIBEIRO, W. R. C. Tratamento pós-colheita de goiaba (*Psidium guajava* L.) contra podridão de *Guignardia psidii*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 20, p. 229–234, 1998.

UDAYANGA, D.; LIU, X. X.; MCKENZIE, E. H. C.; CHUKEATIROTE, E.; BAHKALI, A. H.; HYDE, K. D. The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 50, p.189–225, 2011.

VAN DER AA, H. A. Studies in *Phyllosticta* I. **Studies in Mycology**, Netherlands, v. 5, p.1–110, 1973.

VAN DER AA, H. A.; VANEV, S. A revision of the species described in *Phyllosticta*. **Centraalbureauvoor Schimmelcultures**, Utrecht, 2002.

VIALA, P.; RAVAZ, L. Sur la denomination botanique (*Guignardia bidwellii*) du black-rot. **Bulletin de la Société Mycologique de France**, Paris, v. 8, p. 63, 1892.

XIANJIN, O.; CHAONENG, J.; XUEQING, H.; XIAODONG, Z.; XUEMEI, L.; YUMIN, M.; LUET-LOK, W.; MARK, B.; ZIHE, R. Crystal Structures of Human Glycerol 3-phosphate Dehydrogenase 1 (GPD1). **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 357, n. 3, p. 858-869, 2006.

ZABEAU, M.; VOS, P. **Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting**. European Patent Application 92402629,7. Paris, 1993. p.47 (Publication, 0 534 858).

ZHANG, K.; ZHANG, N.; CAI, L. Typification and phylogenetic study of *Phyllosticta ampellicida* and *P. vaccinii*. **Mycologia**, Stanford, v. 105, p. 1030–1042, 2013.

WANG, X.; CHEN, G.; HUANG, F.; ZHANG, J.; HYDE, K. D.; LI, H. *Phyllosticta* species associated with citrus diseases in China. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 52, p. 209-224, 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.; GELGARD, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T.J. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-322.

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**, London, v. 4, p. 116-125, 2014.

WICKERT, E.; GOES, A., LEMOS, E. G. M.; SOUZA, A.; SILVEIRA, E. L.; PEREIRA, F. D.; RINALDO, D. Relações filogenéticas e diversidade de isolados de *Guignardia* spp. oriundos de diferentes hospedeiros nas regiões ITS1-5,8S-ITS2. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 2, p. 360-380, 2009.

WICKERT, E.; LEMOS, E. G. M.; KISHI, L. T.; SOUZA, A.; GOES, A. Genetic Diversity and Population Differentiation of *Guignardia mangiferae* from "Tahiti" Acid Lime. **The Scientific World Journal**, Cairo, v. 1, p. 1-11, 2012.

WIKKEE, S.; LOMBARD, L.; NAKASHIMA, C.; MOTOHASHI, K.; CHUKEATIROTE, E.; CHEEWANGKON, R.; MCKENZIE, E.H.C.; HYDE, K.D.; CROUS, P. W. A phylogenetic re-evaluation of *Phyllosticta* (Botryosphaerales). **Studies in Mycology**, Netherlands, v. 76, p. 1–29, 2013.

WIKKEE, S.; LOMBARD, L.; CROUS, P. W.; NAKASHIMA, C.; MOTOHASHI, K.; CHUKEATIROTE, E.; SITI, A.; MCKENZIE, E. H. C.; KEVIN, D.; HYDE, K. *Phyllosticta capitalensis*, a widespread endophyte of plants. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, p. 512-524, 2013.

WIKEE, S.; UDAYANGA, D.; CROUS, P. W.; CHUKEATIROTE, E.; MCKENZIE, E. H. C.; BAHKALI, A. H.; DAI, D.; HYDE, K. D. *Phyllosticta* - an overview of current status of species recognition. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 51, p. 43–61, 2011.

WIKEE, S.; WULANDARI, N. F.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D. *Phyllosticta ophiopogonis* sp. nov. from *Ophiopogon japonicus* (Liliaceae). **Saudi Journal of Biological Sciences**, Amsterdam, v.19, p. 13–16, 2012.

WONG, M. H.; CROUS, P. W.; HENDERSON, J.; GROENEWALD, J. Z.; DRENTH A. *Phyllosticta* species associated with freckle disease of banana. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 56, p. 173-187, 2012.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, London, v.15, p.323-354, 1951.

WULANDARI, N. F.; TO-ANUN, C. *Phyllosticta capitalensis*, *P. helicteres*, *P. sterculiae* and other *Phyllosticta* species from Sterculiaceae. **Journal of Agricultural Technology**, Bangkok, v.10, n.1, p. 133-146, 2014.

WULANDARI, N. F.; TO-ANUN, C.; HYDE, K. D.; DUONG, L. M.; GRUYTER, J.; MEFFERT, J. P.; GROENEWALD, J. Z.; ROUS, P. W. *Phyllosticta citriasiana* sp. nov., the cause of Citrus tan spot of *Citrus maxima* in Asia. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 34, p. 23-39, 2009.

WULANDARI, N. F.; BHAT, D. J.; TO-ANUN, C. A modern account of the genus *Phyllosticta*. **Plant Pathology & Quarantine**, Chiang Rai, v. 3, n. 2, p. 145–159, 2013.

YANG, C.; ZHANG, J.; XU, Q.; XIONG, C.; BAO, M. Establishment of AFLP technique and assessment of primer combinations for mei flower. **Plant Molecular Biology Reporter**, Netherlands, v.23, p.790-791, 2005.