

UFRRJ

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E
BIOTECNOLOGIA APLICADA**

DISSERTAÇÃO

**CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS CERCOSPORÓIDES NO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO
E
INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO MICELIAL *IN VITRO* DE
Fusarium solani COM BACTÉRIAS PROMOTORAS DE
CRESCIMENTO**

Jéssica Rembinski

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E
BIOTECNOLOGIA APLICADA**

**CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS CERCOSPORÓIDES NO ESTADO
DO RIO DE JANEIRO
E
INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO MICELIAL *IN VITRO* DE *Fusarium
solani* COM BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO
VEGETAL**

JÉSSICA REMBINSKI

Sob a Orientação do Professor
Ph.D. Carlos Antonio Inácio

e Co-orientação do Pesquisador/Embrapa Agrobiologia
Dr. Jerri Edson Zilli

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Área de Concentração Fitossanidade Aplicada.

Seropédica, RJ
Março de 2018

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R385c Rembinski, Jéssica , 1993-
Caracterização de Fungos Cercosporoides no Estado do Rio de Janeiro e Inibição de Crescimento Micelial In Vitro de Fusarium Solani com Bactérias Promotoras de Crescimento / Jéssica Rembinski. - 2018.
168 f.: il.

Orientador: Carlos Antonio Inácio.
Coorientador: Jérri Edson Zilli.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, 2018.

1. Cercosporoides. 2. Hifomicetos. 3. Taxonomia.
4. Fusarium solani. 5. Controle Biológico. I. Inácio, Carlos Antonio, 1966-, orient. II. Zilli, Jérri Edson, 1974-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada. IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FITOSSANIDADE E BIOTECNOLOGIA APLICADA**

JÉSSICA REMBINSKI

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Fitosanidade e Biotecnologia Aplicada, Área de Concentração em Fitosanidade.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 17/08/2018

Carlos Antonio Inácio. (Ph.D.). UFRRJ
(Orientador)

Margarida Goréte Ferreira do Carmo (Dr^a.) UFRRJ

Jorge Teodoro de Souza. (Ph.D.) UFLA

DEDICATÓRIA

*A Deus, pelo dom da vida, e a oportunidade de realizar mais um sonho!
Aos meus pais, Maria Aparecida e José Luiz, pelo amor e carinho dedicados!
E a todos os amigos, colegas e familiares que me apoiam e incentivam a crescer e ser uma
pessoa melhor!!!*
DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela benção e oportunidade de realizar mais um sonho.

Aos meus pais, irmão e namorado por todo amor, carinho, dedicação e incentivo.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e o Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada por tornar possível a realização de mais uma etapa profissional importante em minha vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro à pesquisa, através da concessão de bolsa.

Ao meu orientador Prof. Carlos Antonio Inácio, pela orientação, dedicação, carinho, paciência e confiança na realização deste trabalho.

Ao meu Coorientador Jerri Édson Zilli, da Embrapa Agrobiologia, pela imprescindível ajuda com os análises moleculares, ao desenvolvimento do segundo capítulo deste trabalho e por todo seu ensinamento e atenção.

Aos professores do Programa, por compartilharem seus conhecimentos.

Aos amigos que fiz durante a execução deste trabalho que contribuíram direta ou indiretamente para a execução do mesmo, ou forças para seguir em frente neste caminho.

Aos professores Helena e Pimentel pelo carinho, incentivo e motivação.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Micologia/Fitopatologia.

A todos os funcionários do Programa de Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Ivanette, Hemylson, Adriana e, pela atenção e colaboração prestada, e o secretário Roberto Tadeu pela dedicação e disponibilidade.

A todos os funcionários e amigos do Laboratório de Ecologia Microbiana da Embrapa Agrobiologia.

Ao amigo Peter Soares pela colaboração no processo de análise molecular.

Ao meu primo Jonas Dias, pela compreensão, apoio e amizade nos momentos de dificuldade.

A minha amiga Raquel Arantes pela companhia, risadas, compreensão, apoio e carinho.

Aos meus familiares e amigos que mesmo na distância me deram apoio nos momentos difíceis.

BIOGRAFIA

Jessica Rembinski. Nasceu em 19 de junho de 1993 em São Gabriel da Palha -ES. Filha de Maria Aparecida Carvalho Rembinski e Jose Luiz Rembinski, lavradores, casados. Concluiu ensino fundamental EMEF Maria Luiza Jorge dos Reis, em São Jorge da Barra Seca. Ensino médio na EEEFM Atilio Vivacqua em Vila Valério. Formou-se em Engenheira Agrônoma pelo IFES Campus Itapina em Colatina. Desenvolveu projetos de iniciação científica no IFES (2011-2016) na área de Produção Vegetal. Realizou Estágio no Departamento de Fitopatologia, no Laboratório de Interação Planta Patógeno (UFV). Concluindo o curso de Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada na UFRRJ (2016-2018) na área de concentração Fitossanidade Aplicada.

RESUMO GERAL

REMBINSKI, Jéssica. **Caracterização de Fungos Cercosporóides no Estado do Rio de Janeiro e Inibição de Crescimento Micelial in vitro de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* (= *Fusarium solani*) com Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal**. 2018. 168 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Departamento de Entomologia e Fitopatologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Dentro do Reino *Fungi* (fungos verdadeiros) estão os fungos de fase imperfeita (ou assexuada) de vários membros das divisões (ou Filos) *Ascomycota* e alguns *Basidiomycota*, conhecidos como fungos anamórficos [antigos Hyphomycetes (Incl. Agonomycetes) e Coelomycetes]. Neste grupo estão diversos gêneros de fungos causadores de fitomoléstias que afetam a sanidade das plantas, sejam elas espontâneas ou de importância econômica. Dentre eles estão os fungos cercosporóides, hifomicetos responsáveis por manchas foliares e queda das folhas (Cercosporioses), e os fungos do gênero *Fusarium* responsáveis pelas fusariose, que se caracterizam pelo entupimento dos vasos do xilema, murcha, secamento foliar, e morte da planta. O presente estudo objetivou a caracterização de espécies de fungos cercosporóides associados à lesões foliares em plantas daninhas e plantas cultivadas de importância agrônoma no Estado do Rio de Janeiro; e obtenção de estirpes bacterianas com potencial antagonista à *Fusarium solani* f.sp. *piperis*, agente causal da Fusariose da Pimenta-do-reino. Amostras sintomáticas obtidas no em áreas do município de Seropédica, incluindo o *campus* da UFRRJ, foram levadas aos laboratórios de Micologia/Fitopatologia do Departamento de Entomologia e Fitopatologia/ICBS e analisadas através de microscópio óptico e estereoscópico; realizaram-se isolamentos em meio de cultura BDA para incorporação na coleção de fungos fitopatogênicos, e posterior extração de DNA genômico dos isolados fúngicos, amplificação por PCR e sequenciamento. Foram estudados 20 cercosporóides, nos gêneros: *Camptomeris*, *Cercospora*, *Cylindrosporium*, *Passalora* e *Pseudocercospora*; onde 15 isolados foram analisados molecularmente através do uso da análise Blast/NCBI presente no banco de dados do Genbank, e as sequências obtidas foram analisadas e comparadas com o uso do programa MEGA 6 e gerada uma árvore filogenética por “Neighbor-joining”(NJ) com 1000 replicações. O isolado de *Fusarium solani* foi proveniente de áreas produtoras do município de Água Doce do Norte/ES causando murcha e secamento de folhas em mudas de pimenta-do-reino com 3-4 meses de idade. O fungo foi isolado e seu DNA extraído. As estirpes bacterianas foram provenientes da coleção de culturas da EMBRAPA Agrobiologia localizada no município de Seropédica, sendo utilizadas 29 estirpes, dentre elas *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Microvirga* e *Serratia*. Realizou-se o cultivo duplo em placas de petri contendo BDA a $\pm 28^{\circ}\text{C}/15$ dias, sendo depositado um disco micelial de 8 mm no centro da placa e as estirpes bacterianas ao redor, totalizando 8 placas no primeiro screening avaliadas pelo tamanho do halo de inibição de crescimento micelial formado pelas bactérias. Das 29 estirpes foram selecionadas 21, as quais passaram novamente pelo procedimento de cultivo duplo por 4 repetições consecutivas, obtendo-se assim um total de 5 isolados bacterianos (*Bacillus* (BR 10788), *Pseudomonas* (BR 10376; BR 10449; BR 10218) e *Burkholderia* (BR 10920) com potencial para controle do fungo *Fusarium solani*.

Palavras-chave: Hifomicetos, morfologia, microrganismos antagonistas.

ABSTRACT GERAL

REMBINSKI, Jéssica. **Characterization of Cercosporoid Fungi in the State of Rio de Janeiro and Inhibition *In vitro* of Mycelial Growth of *Fusarium solani* by Plant Growth Promoting Bacteria**. 2018. 168 p. Dissertation (MSc in Phytosanitary and Applied Biotechnology). Institute of Biological Sciences and Health. Department of Entomology and Phytopathology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Within the Kingdom *Fungi* (true fungi) are the imperfect (or asexual phase) fungi of various members of the *Ascomycota* and some *Basidiomycota* divisions, known as anamorphic fungi [before Hyphomycetes (including Agonomycetes) and Coelomycetes]. In this group are several genera of fungi that cause diseases that affect the sanity of plants, weeds or of economic importance. Among them are cercosporoid fungi, hyphomycetes responsible for leaf spots and leaf fall (Cercosporioses), and fungi of the genus *Fusarium* responsible for the fusariosis, which are characterized by the clogging of xylem, wilting, foliar drying, and plant death. This study aimed to characterize species and new taxa of cercosporoid fungi associated with foliar lesions in weeds and cultivated plants of agronomic importance in the State of Rio de Janeiro; and to obtain bacterial strains with antagonistic activity against to *Fusarium solani*, causal agent of Pepper Fusarium. Symptomatic samples obtained in the areas of the municipality of Seropédica, including the campus of UFRRJ, were taken to the Micology / Phytopathology laboratories of the Department of Entomology and Phytopathology / ICBS and analyzed through an optical and stereoscopic microscopes; isolations were carried out in BDA culture medium for incorporation into the collection of phytopathogenic fungi, and subsequent extraction of genomic DNA from fungal isolates, PCR amplification and sequencing. A total of 20 cercosporoids were studied, in the genera: *Camptomeris*, *Cercospora*, *Cylindrosporium*, *Passalora* and *Pseudocercospora*; and 15 isolates were molecularly analyzed using the Blast / NCBI analysis present in the Genbank database, and the sequences obtained were analyzed and compared with the use of the MEGA 6 program and generated a "Neighbor-joining" phylogenetic tree (NJ) with 1000 replications. The isolate of *Fusarium solani* came from producing areas of the municipality of Água Doce do Norte / ES, causing wilt and drying of leaves in pepper plants of 3-4 months of age. The fungus was isolated and its DNA extracted. The bacterial strains were obtained from the EMBRAPA Agrobiology cultures collection located in the municipality of Seropédica, and 29 strains were used, among them *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Microvirga* and *Serratia*. Double culture was performed on petri dishes containing BDA at $\pm 28^\circ\text{C}$ / 15 days, and an 8 mm mycelial disc was deposited in the center of the plate and the surrounding bacterial strains, totaling 8 plates in the first screening evaluated by the size of the halo of inhibition of mycelial growth formed by bacteria. From these 29 strains, 21 were selected, which were again crossed by the double culture procedure for 4 consecutive repetitions, obtaining a total of 5 bacterial isolates [*Bacillus* (BR 10788), *Pseudomonas* (BR 10376; BR 10449; BR 10218) and *Burkholderia* (BR 10920)] with potential for fungus control *Fusarium solani*.

Key words: *Hyphomycetes*, morphology, antagonistic microorganism.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Hospedeiros coletados e gêneros fúngicos identificados.....	20
TABELA 3. Características de <i>Camptomeris</i> sp. em <i>Leucaena leucocephala</i> L.....	26
TABELA 4. Características de <i>Cercospora</i> sp. em folhas de <i>Spinacia oleracea</i> L. (<i>Amaranthaceae</i>).....	30
TABELA 5. <i>Cercospora</i> sp. em folhas de <i>Solanum betaceum</i> (<i>Solanaceae</i>).....	34
TABELA 6. Característica de <i>Cylindrosporium</i> sp. em folhas de <i>Triplaris americana</i> L. (<i>Polygonaceae</i>).....	38
TABELA 7. Características de <i>Passalora</i> sp. em folhas de <i>Bougainvillea glabra</i> L. (<i>Nyctaginaceae</i>).....	42
TABELA 8. Características de <i>Pseudocercospora bixae</i> em folhas de <i>Bixa orellana</i> L. (<i>Bixaceae</i>).....	46
TABELA 9. Características de <i>Pseudocercospora</i> em folhas de <i>Canavalia ensiformis</i> (L.) DC. (<i>Fabaceae</i>).....	50
TABELA 10. Características de <i>Pseudocercospora</i> em folhas de <i>Centratherum punctatum</i> Cass. (<i>Asteraceae</i>).....	54
TABELA 11. Características de <i>Pseudocercospora</i> em folhas <i>Crotalaria incana</i> L. (<i>Fabaceae</i>).....	58
TABELA 12. Características de <i>Pseudocercospora</i> em folhas de <i>Croton lobatus</i> L. var. <i>lobatus</i> (<i>Euphorbiaceae</i>).....	62
TABELA 13. Características de <i>Pseudocercospora</i> em folhas de <i>Eucalyptus grandis</i> L. (<i>Myrtaceae</i>).....	66
TABELA 14. Características de <i>Pseudocercospora</i> em folhas de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. (<i>Fabaceae</i>).....	70
TABELA 15. Características de <i>Pseudocercospora</i> em folhas <i>Muntingia calabura</i> L. (<i>Muntingiaceae</i>).....	74
TABELA 16. Características de <i>Pseudocercospora</i> sp. em <i>Solanum americanum</i> (<i>Solanaceae</i>).....	78
TABELA 17. Características de <i>Pseudocercospora</i> sp. em folhas de em <i>Solanum cernum</i> Vell (<i>Solanaceae</i>).....	82
TABELA 18. Características de <i>Pseudocercospora</i> em folhas de <i>Handroanthus impetiginosus</i> (Mart. ex DC.) Mattos (<i>Bignoniaceae</i>).....	88
TABELA 19. Características de <i>Pseudocercospora</i> em folhas de <i>Turnera ulmifolia</i> L. (<i>Turneraceae</i>).....	92
TABELA 20. Características de <i>Pseudocercospora</i> em folhas de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp. (<i>Fabaceae</i>).....	96
TABELA 21. Patógenos e hospedeiros identificados em 7 grupos distintos pela análise heurística no programa MEGA 6 baseados sequenciA ITS.....	107
TABELA 22. Isolados bacterianos endofíticos provenientes da embrapa agrobiologia e seu crescimento em meio de cultura BDA ±25 °c/4dias.	137

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Mapa político do Estado do Rio de Janeiro e Município de Seropédica (área de estudo/coletas).....	15
FIGURA 2. Mapa do clima presente no Estado do Rio de Janeiro e no Município de Seropédica localizado próximo a Nova Iguaçu.....	16
FIGURA 3. A-H: <i>Camptomeris leucaenae</i> em folhas de <i>Leucena leucocephala</i> L. (<i>Fabaceae</i>).	27
FIGURA 4. A-B: <i>Camptomeris leucaenae</i> em meio de cultura BDA a $\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}/ 15$ dias	28
FIGURA 5. A- H: <i>Cercospora</i> sp. em folhas de <i>Spinacia oleracea</i> L. (<i>Amaranthaceae</i>).....	31
FIGURA 6. A- B: <i>Cercospora</i> sp. em meio de cultura BDA a $\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}/ 15$ dias (Barra = 1 cm).	32
FIGURA 7. A- H: <i>Cercospora</i> sp. em folhas de <i>Solanum betaceum</i> (<i>Solanaceae</i>).....	32
FIGURA 8. a- b: <i>Cercospora</i> sp. em meio de cultura BDA a $\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}/ 15$ dias.....	36
FIGURA 9. A-M: <i>Cylindrosporium</i> sp. em folhas de <i>Triplaris americana</i> L.	39
FIGURA 10. A- B: <i>Pluripassalora</i> sp. em meio de cultura BDA a $\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}/ 15$ dias (Barra = 1 cm).....	44
FIGURA 11. A- B: <i>Pluripassalora</i> sp. em meio de cultura BDA a $\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}/ 15$ dias (Barra = 1 cm).....	40
FIGURA 12. A-L: <i>Pseudocercospora</i> em folhas de <i>Bixa orellana</i> l (<i>Bixaceae</i>).....	43
FIGURA 13. A-B: <i>Pseudocercospora</i> sp. em meio de cultura BDA a $\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}/ 15$ dias (Barra = 1 cm).....	44
FIGURA 14. A-L: <i>Pseudocercospora</i> em folhas de <i>Canavalia ensiformis</i> (L) DC. (<i>Fabaceae</i>).....	47
FIGURA 15. A-B: <i>Pseudocercospora</i> sp. em meio de cultura bda a $\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}/ 15$ dias (BARRA = 1 cm).....	48
FIGURA 16. A-L: <i>Pseudocercospora</i> em folhas de <i>Centratherum punctatum</i> Cass. (<i>Asteraceae</i>).....	51
FIGURA 17. A-L: <i>Pseudocercospora</i> em folhas de <i>Crotalaria incana</i> L. (<i>Fabaceae</i>).....	54
FIGURA 18. A-B: <i>Pseudocercospora</i> sp. em meio de cultura BDA a $\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}/ 15$ dias.....	60
FIGURA 19. A-K: <i>Pseudocercospora</i> em folhas de <i>Croton lobatus</i> L. var. <i>lobatus</i> (<i>Euphorbiaceae</i>).....	63
FIGURA 20. A-B: <i>Pseudocercospora</i> sp. em meio de cultura BDA a $\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}/ 15$ dias (Barra = 1 cm).....	64
FIGURA 21. A-K: <i>Pseudocercospora</i> em folhas de <i>Eucalyptus grandis</i> L. (<i>Myrtaceae</i>).....	67
FIGURA 22. A-B: <i>Pseudocercospora</i> sp. em meio de cultura BDA a $\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}/ 15$ dias.....	68
FIGURA 23. <i>Pseudocercospora</i> em folhas de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. (<i>Fabaceae</i>).....	70
FIGURA 24. A-B: <i>Pseudocercospora</i> sp. em meio de cultura BDA a $\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}/ 15$ dias.....	72
FIGURA 25. A-K: <i>Pseudocercospora</i> em folhas <i>Muntingia calabura</i> L. (<i>Muntingiaceae</i>)....	70
FIGURA 26. A-B: <i>Pseudocercospora</i> sp. em meio de cultura BDA a $\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}/ 15$ dias.....	76
FIGURA 27. A-J: <i>Pseudocercospora</i> em folhas de <i>Solanum americanum</i> Mill. (<i>Solanaceae</i>)..	79
FIGURA 28. A-B: <i>Pseudocercospora</i> sp. em meio de cultura BDA a $\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}/ 15$ dias.....	80
FIGURA 29. A-K: <i>Pseudocercospora</i> sp. em folhas de em <i>Solanum cernuum</i> Vell (<i>Solanaceae</i>).....	85

FIGURA 30. A-B: <i>Pseudocercospora</i> sp. em meio de cultura BDA a $\pm 25^{\circ}\text{C}$ /15 dias (Barra = 1 cm).....	86
FIGURA 31. A-K: <i>Pseudocercospora</i> sp. em folhas de <i>Handroanthus impetiginosus</i> (<i>Bignoniaceae</i>).	89
FIGURA 32. A-B: <i>Pseudocercospora</i> sp. em meio de cultura BDA a $\pm 25^{\circ}\text{C}$ / 15 dias.....	90
FIGURA 33. A-M: <i>Pseudocercospora</i> em folhas de <i>Turnera ulmifolia</i> L. (<i>Turneraceae</i>).	93
FIGURA 34. A-N: <i>Pseudocercospora</i> em folhas de <i>vigna unguiculata</i> (L.) Walp. (<i>Fabaceae</i>).	97
FIGURA 35. A-B: <i>Pseudocercospora</i> sp. em meio de cultura BDA a $\pm 25^{\circ}\text{C}$ / 15 dias.....	98
FIGURA 36. A-J: <i>Pseudocercospora</i> sp. em folhas de <i>Macroptillum lathyroides</i> (L.) Urb. (<i>Fabaceae</i>).	94
FIGURA 37. A-G: <i>Pseudocercospora</i> sp. em folhas de <i>Hibiscus sabdariffa</i> (<i>Malvaceae</i>).	97
FIGURA 38. Árvore filogenética baseada na região IT1-5.8S-ITS2 mostrando a relação dos novos isolados agrupados nos generos de <i>Pseudocercospora</i> e <i>Cercospora</i> com similaridade com outras espécies dos gêneros presentes em Silva (2016b), Nguanhom et al. (2016), Groenewald et al (2005) e Goodwin et al. (2011). A significância de cada ramo é indicada pelo valor de Bootstrap (maior que 50%) calculado com 1000 repetições. Barra indica 5 substituições a cada 100 nucleotídeos.....	99
FIGURA 39. Árvore filogenética baseada na região IT1-5.8s-ITS2 mostrando a relação dos novos isolados agrupados nos generos de <i>Pseudocercospora</i> e <i>Cercospora</i> . a significância de cada ramo é indicada pelo valor de bootstrap (maior que 50%) calculado com 1000 repetições. barra indica uma substituição a cada 5 nucleotídeos.....	100
FIGURA 40. Cultivo <i>invitro</i> : 29 isolados bacterianos X <i>Fusarium solani</i> f.sp. <i>piperis</i>	139
FIGURA 41. Avaliação da formação de halo bacteriano ao longo de 8-15 dias, resultando na diminuição do crescimento micelial.....	140
FIGURA 42. Estirpes bacterianas que apresentaram potencial de inibição do crescimento micelial do fungo <i>Fusarium solani</i> f.sp. <i>piperis</i>	141

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I	3
CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS CERCOSPORÓIDES NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO	3
RESUMO.....	5
ABSTRACT	7
1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 Reino <i>Fungi</i>	11
2.2 Hifomicetos	13
2.3 Cercosporóides	13
2.3.1 <i>Camptomeris</i>	14
2.3.2 <i>Cercospora</i>	14
2.3.3 <i>Cylindrosporium</i>	15
2.3.4 <i>Passalora</i>	15
2.3.5 <i>Pseudocercospora</i>	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Análises morfológicas	17
3.1.2 Área de coleta, Material coletado, processamento e caracterização.....	17
3.2 análises moleculares: extração, PCR, sequenciamento e filogenia.....	22
3.2.1 Extração do DNA genômico:	22
3.2.2 PCR.....	22
3.2.3 Sequenciamento das amostras amplificadas e filogenia.....	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 Espécies do gênero <i>Camptomeris</i>	25
4.1.1 <i>Camptomeris leucaenae</i> (F. Stevens & Dalbey) Syd., <i>Annales Mycologici</i> 28: 222 (1930) em folhas de <i>Leucena leucocephala</i> (<i>Fabaceae</i>) (Fig. 3-4).....	25
4.2 Espécies do genero <i>Cercospora</i>	29
4.2.1 <i>Cercospora</i> sp. em folhas de <i>Spinacia oleracea</i> L. (<i>Amaranthaceae</i>) (Fig 5-6). Provável espécie nova n° 1.	29
4.2.2 <i>Cercospora</i> sp. em folhas de <i>Solanum betaceum</i> (<i>Solanaceae</i>) (Fig. 7-8). Provável espécie nova n° 2.	33
4.3 Espécie do genero <i>Cylindrosporium</i>	37
4.3.1 <i>Cylindrosporium</i> sp. em folhas de <i>Triplaris americana</i> L. (<i>Polygonaceae</i>). (Fig. 9). Provável espécie nova n° 3.	37
4.4 Espécie do gênero <i>Pluripassalora</i>	41

4.4.1 <i>Pluripassalora</i> sp. em folhas de <i>Bougainvillea glabra</i> L. (<i>Nyctaginaceae</i>). (Fig. 10-11). Provável <i>Pluripassalora bougainvilleae</i> .	41
4.5 Espécies do gênero <i>Pseudocercospora</i>	45
4.5.1 <i>Pseudocercospora</i> sp. em folhas de <i>Bixa orellana</i> L. (<i>Bixaceae</i>) (Fig. 12-13). Provável <i>Pseudocercospora bixae</i> .	45
4.5.2 <i>Pseudocercospora</i> em folhas de <i>Canavalia ensiformis</i> (L.) DC. (<i>Fabaceae</i>) (Fig. 14-15). Provável espécie nova n° 4.	49
4.5.3 <i>Pseudocercospora</i> em folhas de <i>Centratherum punctatum</i> Cass. (<i>Asteraceae</i>) (Fig. 16). Provável espécie nova n° 5.	53
4.5.4 <i>Pseudocercospora</i> em folhas de <i>Crotalaria incana</i> L. (<i>Fabaceae</i>) (Fig. 17-18). Provável espécie nova n° 6.	57
4.5.5 <i>Pseudocercospora</i> em folhas de <i>Croton lobatus</i> L. var. <i>lobatus</i> (<i>Euphorbiaceae</i>) (Fig. 19-20). Provável espécie nova n° 7.	61
4.5.6 <i>Pseudocercospora</i> em folhas de <i>Eucalyptus grandis</i> L. (<i>Myrtaceae</i>) (Fig. 21-22). Provável espécie nova n° 8.	65
4.5.7 <i>Pseudocercospora</i> em folhas de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. (<i>Fabaceae</i>) (Fig. 23-24). Provável espécie nova n° 9.	69
4.5.8 <i>Pseudocercospora</i> em folhas de <i>Muntingia calabura</i> L. (<i>Muntingiaceae</i>) (Fig. 25-26). Provável espécie nova n° 10.	73
4.5.9 <i>Pseudocercospora</i> em folhas de em <i>Solanum americanum</i> Mill. (<i>Solanaceae</i>) (Fig. 27-28). Provável espécie nova n° 11.	77
4.5.10 <i>Pseudocercospora</i> em folhas de <i>Solanum cernuum</i> Vell (<i>Solanaceae</i>) (Fig. 29-30). Provável espécie nova n° 12.	81
4.5.11 <i>Pseudocercospora</i> em folhas <i>Handroanthus impetiginosus</i> (Mart. ex DC.) Mattos (<i>Bignoniaceae</i>) (Fig. 31-32). Provável espécie nova n° 13.	87
4.5.12 Características de <i>Pseudocercospora</i> em folhas de <i>Turnera ulmifolia</i> L. (<i>Turneraceae</i>) (Fig. 33). Provável espécie nova n° 14.	91
4.5.13 <i>Pseudocercospora</i> em folhas de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp. (<i>Fabaceae</i>) (Fig. 34-35). Provável espécie nova n° 14.	95
4.5.14 <i>Pseudocercospora</i> sp. em folhas de <i>Macroptillum lathyroides</i> (L.) Urb. (<i>Fabaceae</i>) (Fig. 36). Provável espécie nova n° 16.	99
4.5.15 <i>Pseudocercospora</i> sp. em folhas de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. (<i>Malvaceae</i>) (Fig. 37). Provável espécie nova n° 17.	103
5 CONCLUSÃO	113
CAPÍTULO II	123
INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO MICELIAL <i>IN VITRO</i> DE <i>Fusarium Solani</i> fCOM BACTERIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO	123
RESUMO	125
ABSTRACT	127
1 INTRODUÇÃO	129
2 REVISÃO DE LITERATURA	131

2.1 Pimenta-do-reino	131
2.3 Fusariose	132
2.4 Microorganismos antagonistas: BPCP	134
3 MATERIAL E MÉTODOS	137
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	139
5 CONCLUSÃO.....	143
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145
CONCLUSÕES GERAIS	151
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	153

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é considerado o país de maior diversidade biológica, destacando-se no ranking mundial entre os países. A diversidade de fungos é estimada em um mínimo de 1,5 milhões de espécies (HYDE, 2001; HAWKSWORTH; ROSSMAN, 1997; HAWKSWORTH, 2001) estimado pelo critério adotado por Hawksworth (1991) do baseado no número de espécies fúngicas por planta hospedeira.

Os hifomicetos ou "*Hyphomycetes*" são fungos anamórficos de ampla distribuição, presentes em diferentes habitats terrestres e aquáticos, e dispersos pelo ar na forma de conídios e/ou fragmentos de hifas (esporos de reprodução assexuada) (KIRK *et al.*, 2008). Entre as espécies fúngicas presentes neste grupo de fungos, estão presentes os fungos cercosporóides (*Capnodiales*, *Mycosphaerellaceae*, *Dothideomycetes*) causadores de manchas foliares e desfolhamentos (CROUS; BRAUN, 2003) e *Fusarium* sp. (*Gibberella* sp., *Nectriaceae*, *Hypocreales*) agente causal de murcha foliar, secamento e podridão de raízes; estes patógenos causam grandes perdas econômicas em diferentes culturas no mundo.

O grupo dos fungos cercosporóides (membros de *Capnodiales*, *Dothideomycetes*) é um dos maiores grupos de fungos anamórficos distribuídos em uma ampla gama de hospedeiros em países tropicais e subtropicais, compreendendo mais de 2000 espécies com diversos gêneros, tradicionalmente classificadas no gênero *Mycosphaerella*; são constantemente encontrados causando manchas foliares e desfolha, bem como atacando flores, frutos e sementes de cereais, hortaliças, de plantas ornamentais, de essências florestais e gramíneas. (SILVA, 2016a). Nos últimos quatro anos estudos de caracterização estão sendo realizados no Estado do Rio de Janeiro afim de divulgar a biodiversidade de cercosporóides presentes no Estado, o qual apresenta clima quente e úmido, favorável ao desenvolvimeto destes fungos; mas ainda existem muitos fungos a serem descritos e novos táxons discutidos.

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.), originária da Índia, é uma das especiarias mais importantes e utilizadas no mundo, e foi introduzida no Brasil por colonos portugueses no século XVII, ficando restrita aos Estados do litoral brasileiro. Atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de pimenta-do-reino e o Espírito Santo é o primeiro colocado entre os Estados brasileiros, com uma produção de 37 mil toneladas do grão (IBGE, 2017). Apesar da importância da pipericultura no cenário regional, nacional e internacional, conhecimentos que garantam a produção sustentável e econômica da cultura ainda são escassos (SILVA *et al.* 2011). A fusariose, também conhecida como podridão do pé e podridão das raízes, é causada pelo fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis* F.C. Albuquerque. (Telemorfo *Nectria haematococca* f. sp. *piperis* F.C. Albuquerque; Ferraz), ambos nomes aceitos agora em *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. A doença pode iniciar a partir das raízes ou da parte aérea (ALBUQUERQUE; DUARTE, 1991) e, é a principal doença da pimenta-do-reino (KIMATI *et al.*, 1997; TRINDADE; POLTRONIERI, 1997; TREMACOLDI, 2010). A doença é responsável por dizimar lavouras inteiras. Até o momento, não há tratamento químico eficaz contra o *Fusarium*, nem tampouco cultivares de pimentas-do-reino comerciais resistentes à fusariose (TREMACOLDI, 2010). Entretanto, métodos ou produtos alternativos têm sido parcialmente testados visando o aproveitamento de suas atividades antibióticas (fungicidas e fungistáticas) no controle de doenças de plantas.

O presente estudo objetivou a caracterização e descrição de espécies e novos taxons de fungos cercosporóides associados à lesões foliares em plantas daninhas e plantas cultivadas de importância agrônômica no estado do Rio de Janeiro; e a obtenção de estípes bacterianas com potencial antagonico ao fungo *Fusarium solani* agente causal da Fusariose na cultura pimenta-do-reino.

CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS CERCOSPORÓIDES NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

RESUMO

REMBINSKI, Jéssica. **Caracterização de Fungos Cercosporóides no Estado do Rio de Janeiro**. 2018. 168 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Departamento de Entomologia e Fitopatologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Os fungos hifomicetos ou “*Hyphomycetes*” são fungos anamórficos pertencentes ao Reino *Fungi* (fungos verdadeiros) e são a fase assexuada ou imperfeita de das divisões (ou filos) *Ascomycota* e alguns *Basidiomycota*. Possui diversos gêneros de fungos causadores de fitomoléstias que afetam a sanidade das plantas, sendo elas daninhas ou de importância econômica. Dentre eles estão os fungos cercosporóides responsáveis por manchas foliares e queda das folhas (Cercosporioses). O presente estudo objetivou a caracterização de espécies e novos taxons de fungos cercosporóides associados à lesões foliares em plantas daninhas e plantas cultivadas de importância agrônômica no Estado do Rio de Janeiro; amostras sintomáticas obtidas no campus da UFRRJ, contendo manchas foliares, foram levadas ao laboratório de Micologia/Fitopatologia do Departamento de Entomologia e Fitopatologia/ICBS e examinadas com uso de microscópio óptico e estereoscópico; realizou-se isolamentos em meio de cultura BDA para incorporação na coleção de fungos fitopatogênicos, e posterior extração, amplificação por PCR e sequenciamento do DNA genômico dos isolados fungicos. Foram obtidos 18 cercosporóides classificados taxonomicamente entre os gêneros: *Camptomeris*, *Cercospora*, *Cylindrosporium*, *Passalora* e *Pseudocercospora*; e 15 isolados classificados molecularmente através da análise Blast/NCBI presente no banco de dados do Genbank, onde as sequências obtidas foram analisadas e comparadas pelo programa MEGA 6, sendo gerada uma árvore filogenética por junção vizinha com 1000 replicações.

Palavras-chave: Hifomicetos, cercosporóides, morfologia.

ABSTRACT

REMBINSKI, Jessica. **Characterization of Cercosporoid Fungi in the State of Rio de Janeiro**. 2018. Dissertation (MSc in Phytosanitary and Applied Biotechnology). Institute of Biological Sciences and Health. Department of Entomology and Phytopathology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Hyphomycete or "Hyphomycetes" are anamorphic fungi belonging to the *Fungi* Kingdom (true fungi) and are the asexual or imperfect phase of the *Ascomycota* divisions (or phyla) and some *Basidiomycota*. It has several genera of fungi that causes phytomoltes that affect the sanity of the plants, being weeds or of crops. Among them are cercosporoid fungi responsible for leaf spots and leaf fall (Cercosporioses). The present study aimed at the characterization of espécies and new taxa of cercosporoid fungi associated with foliar lesions in weeds and cultivated plants of agronomic importance in the State of Rio de Janeiro. Symptomatic samples obtained at the campus of UFRRJ, with leaf spots, were taken to the Micology / Phytopathology laboratory of the Department of Entomology and Phytopathology / ICBS and examined using an optical and stereoscopic microscope; isolations were carried out in BDA culture medium for incorporation into the collection of phytopathogenic fungi, and subsequent extraction, PCR amplification and sequencing of the genomic DNA of the fungal isolates. There were 18 cercosporoids classified taxonomically among the genera: *Camptomeris*, *Cercospora*, *Cylindrosporium*, *Passalora* and *Pseudocercospora*; and 15 isolates classified molecularly by the Blast / NCBI analysis present in the Genbank database, where the sequences obtained were analyzed and compared by the MEGA 6 program, generating a neighboring junction phylogenetic tree with 1000 replications.

Key words: *Hyphomycetes*, cercosporoids, morphology,

1 INTRODUÇÃO

Os Fungos são organismos heterotróficos unicelulares ou pluricelulares, caracterizados pela formação de estruturas filamentosas, as hifas, que constituem o micélio, e tamanhos variados. Na fase reprodutiva, o micélio forma estruturas assexuadas e/ou sexuadas que originam os esporos. São cosmopolitas, ou seja, ocorrem em diversos *habitats*: ambientes aquáticos e terrestres, dos trópicos às regiões polares (ártica e antártica).

Haviam controvérsias e dificuldades na delimitação dos fungos como um grupo, onde inclusões e exclusões eram comuns no último século. Recentemente com o advento da Biologia Molecular, o taxonomista possui novas ferramentas para identificação e descrição destes fungos. Assim com a definição filogenética, similaridades de sequências relevantes de DNA, aspectos morfológicos e fisiológicos (como produção de açúcares e outros compostos), agregaram informações importantes para a delimitação do grupo.

No complexo *Mycosphaerella* Johanson encontram-se várias espécies onde, os primeiros estudos moleculares publicados por Stewart *et al.* (1999), mostraram que o gênero *Mycosphaerella* era monofilético (CROUS *et al.*, 1999; GOODWIN *et al.*, 2001). Esta pesquisa foi continuada por Crous *et al.*, 2000, 2001; e os conceitos de anamorfo foram reavaliados, e baseado em um número limitado de espécies disponíveis, a maioria dos gêneros foram destacados para representar clados bem definidos dentro *Mycosphaerella*. O gênero *Mycosphaerella* foi recentemente tratado como um grupo polifilético, sendo dividido em vários gêneros com sinônimos, em que o nome do fungo válido e dado conforme a descrição do gênero mais antigo. Por exemplo, o gênero *Paracercospora* Deighton (contendo cicatrizes minuciosamente engrossadas ao longo das margens apicais do conidióforo), sinônimo do gênero *Pseudocercospora*, considera-se o nome mais antigo neste caso, o gênero *Pseudocercospora* (CROUS *et al.*, 2007). E que, Crous *et al.* (2001) também haviam mostrado que *Cercostigmina* seria sinônimo de *Pseudocercospora*. Isto levou Crous e Braun (2003) a concluir que os conídios catenulados, com formação de septos e proliferação de células conidiogênicas eram de menor importância para separar espécies ao nível genérico. *Mycovellosiella* Rangel e *Phaeoramularia* Munt. -Cvetk., foram posteriormente reduzidos a sinônimo com o nome mais velho, ou seja, *Passalora* Fr., e as características identificadas como significativas a nível genérico eram a pigmentação (*Cercospora* vs. *Passalora*), estrutura da cicatriz (*Passalora* vs. *Pseudocercospora*) e hifas superficiais verruculosas (*Stenella* vs. *Passalora*) (CROUS; BRAUN 2007), verificou-se também que o gênero *Cercospora* Fresen. agora é considerado um gênero holomórfico, ou seja, o nome é único para todas as formas do fungo seja anamórfica ou teleomórfica (micosfaereláceo), (CORLETT, 1991; CROUS *et al.*, 2004b) e isto vale para todos aqueles que tinham como teleomorfo o gênero *Mycosphaerella* ou seja o nome ficou reduzido para o anamorfo (BRAUN *et al.*, 2013; CROUS *et al.*, 2013).. O gênero *Mycosphaerella* Johanson (1884), agora é restrito aos anamorfos de *Ramularia* Unger (1833), onde o nome mais antigo que prevalece sobre o mais recente segundo as regras do Código de Nomenclatura Internacional para Algas, Fungos e Plantas (CNI). Essas novas modificações na nomenclatura são baseadas na mudança do artigo 59 do Código de Nomenclatura Internacional para Algas, Fungos e Plantas (CNI), também chamado (Código Melbourne) que trata dos fungos com ciclo de vida pleomórfico, mudanças

adotadas durante o XVIII Congresso Botânico Internacional realizado em Melbourne (CORLETT, 1991; CROUS *et al.*, 2004; GROENEWALD *et al.*, 2013).

As condições climáticas do Estado do Rio de Janeiro são favoráveis à ocorrência de uma grande variedade de fungos cercosporóides em diversos hospedeiros, sendo este quente e úmido em determinadas épocas do ano. Nos últimos quatro anos tem-se detectado uma ampla gama de hospedeiros desse grupo no Estado, incluindo novos relatos destas ocorrências, porém há necessidade de uma maior caracterização deste grupo tanto morfológica quanto molecular (REMBINSKI *et al.*, 2017; ANDRADE, 2016).

Com um clima tropical, quente e úmido, o estado do Rio de Janeiro oferece condições favoráveis ao desenvolvimento de espécies de cercosporóides em diversos hospedeiros suscetíveis.

O presente estudo objetivou a identificação e caracterização morfológica e molecular de fungos cercosporóides associados à lesões foliares em hospedeiros de diversas famílias botânicas do bioma Mata Atlântica, em especial no Estado do Rio de Janeiro, visando desta forma, ampliar o conhecimento sobre a biodiversidade presente, bem como complementar os estudos de etiologia destes patógenos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Reino *Fungi*

Micologistas definem fungos verdadeiros como heterotróficos, eucariontes, geralmente com paredes celulares de β -glucana e quitina (embora alguns tenham perdido a quitina ou mesmo sua densa parede durante a evolução). Os fungos são geralmente aeróbicos, possuem mitocôndrias com cristas planas, e são cosmopolitas podem ser encontrado nos mais diversos habitats (CAVALIER-SMITH, 2001; BLACKWELL *et al.*, 2006). Por estes critérios, estimativas do número de espécies de fungos variam de 1,5 a 5,1 milhões de espécies com menos de 100.000 presentemente descritos (HAWKSWORTH, 2001).

O Reino *Fungi* se divide em nove filos ou divisões, segundo as novas classificações filogenéticas, advindas pela descoberta de novos genes codificadores do DNA ribossomal, como Tef (REHNER, 2001) e β -Tubulina (O'DONNELL; CIGELNIK, 1997): Filo *Ascomycota*, Filo *Basidiomycota*, Filo *Chytridiomycota*, Filo *Zygomycota*, Filo *Glomeromycota* Fungos Anamórficos, Filo *Blastocladiomycota*, Filo *Neocallimastigomycota*, e Filo *Microsporidia* (HIBBETT *et al.*, 2007; KIRK *et al.*, 2008; FITZPATRICK, 2006; RUGGIERO, 2015).

O filo *Ascomycota* é derivado das palavras gregas askos (um saco, bexiga) e mykes (um fungo), é o maior e mais diverso filo do reino *Fungi* contendo aproximadamente 65.000 gêneros descritos, são conhecidos como fungos-saco ou ascomicetos que, em sua maioria desempenham uma função vital, atuando como saprófitas, outros são patógenos de plantas que causam grandes perdas econômicas no mundo, entre alguns exemplos de patógenos estão “giberela” (*Gibberella* spp.) ou “fusário” (*Fusarium* sp.) do trigo e outros cereais, e os fungos cercosporóides (*Mycosphaerellaceae*) distribuídos em países tropicais e subtropicais causando desfolhamentos em diversos hospedeiros. Os fungos de *Ascomycota* são responsáveis por causar graves doenças em animais e seres humanos.

O filo *Basidiomycota* caracteriza-se por formar grampos de conexão, responsáveis por manter a dicariocidade da hifa, ter septo dolipórico, alguns leveduriformes (levedura) distinguindo dos ascomicetos pela morfologia da cicatriz de brotação vermelha com Azul de diazônio B, reação positiva em urease, e outros caracteres ultraestruturais (KIRK *et al.*, 2001). São originados de reprodução sexuada, onde os esporos originados de meiose são os basidiósporos (exósporos); neste grupo, estão cerca de 22.500 espécies, e muitos são causadores de grandes perdas em culturas de importância econômica como, por exemplo, os fungos causadores de “ferrugens” e “carvões”.

O Filo *Chytridiomycota* caracteriza-se pela presença de organismos unicelulares, asseptados ou cenocíticos, possuem zoósporos com um flagelo simples anterior tipo “chicote”, são aquáticos e terrestres, não formam corpos de frutificação; são saprofitos, aquáticos, parasíticos, crescendo sobre outros organismos (incluindo Nematóides, insetos, plantas, outros “Chytrids”), alguns anaeróbios obrigatórios em trato digestivo de herbívoros; divididos em 3 ordens e 10 famílias com 98 gêneros em 678 espécies (KIRK *et al.*, 2008).

O Filo *Zygomycota* caracteriza-se por formar micélio cenocítico ou asseptado, hifa reprodutiva denominada de esporangióforo, a qual pode sustentar um ou mais esporângios (estrutura onde são formados esporos endógenos e denominados de esporangiósporos). Estes esporangiósporo são provenientes de reprodução assexuada e por não apresentarem mobilidade (imóveis), são denominados de aplanósporos. Reprodução sexuada se dá através de zigósporos que são estruturas de resistência, formados através da fusão de isogametas. Ex.: *Rhizopus* Ehrenb. (1821), *Mucor* P. Micheli ex L. (1753) (LUZ, 2008). Na décima edição do *Dictionary of the fungi* (KIRK et al., 2008) são aceitas 10 ordens em 27 famílias com 168 gêneros em 1065 espécies.

O Filo *Glomeromycota* caracteriza-se por apresentar micélio cenocítico e reprodução assexual (não se conhece reprodução sexuada em detalhe, sendo sugerida uma reprodução “críptica” para o grupo). Os “glomales” Glomales ou Glomerales podem produzir esporângios ramificados, cada esporângio com esporos denominados glomerósporos e em sua maioria são obrigatórios. São denominados “MA (Micorrizas arbusculares) ou MVA (Micorrizas vesículo-arbusculares)” devido à suas hifas entrarem em contato com as raízes das plantas, e penetrarem a parede celular das radículas formando vesículas em seu interior responsáveis pelo armazenamento de nutrientes fornecidos pela planta através da fotossíntese, e em troca as micorrizas solubilizam o fosforo adsorvido pelas moléculas do solo para as plantas. Um exemplo conhecido de simbiote endomicorrízico e o gênero *Glomus*, sendo poucos os glomeromycetes conhecidos vivendo simbioticamente com cianobactérias (ex. *Geosiphon* spp.) ao invés de raízes de plantas; dividem-se em 4 ordens e 9 famílias com 12 gêneros em 169 espécies (KIRK et al., 2008).

Fungos anamórficos antes classificados como Deuteromycota, Deuteromycotina, com o passar dos anos, tiveram diferentes tratamentos, tais como: fungos imperfeitos, fungos conidiais, fungos mitospóricos, fungos assexuados, caracterizam-se por serem formas assexuais de *Ascomycota* e de alguns *Basidiomycota* (KIRK et al., 2008). Existem aproximadamente 15.000 espécies de fungos anamórficos conhecidas até o momento, correspondendo a 30% do total de fungos já conhecido (LUZ, 2011). A metade das doenças das plantas é produzida por estes fungos e ocasionando grandes perdas em culturas de importância econômica (LUZ, 2011). Apresentam diferentes tipos de esporos e corpos somáticos, a diversificação e invasão de diferentes tipos de ambientes é o resultando da evolução deste grupo de fungos (BARNETT; HUNTER, 1998; SEIFERT, 2011; KENDRICK; CARMICHAEL, 1980; SUTTON, 1980; NAG RAJ, 1993; ELLIS, 1971, 1976). Em geral os fungos mitospóricos possuem micélio septado e a reprodução assexual constitui na mais importante fase do seu ciclo vital. Os fungos anamórficos são representados por três classes informais importantes, denominados Hyphomycetes (hiphomicetos), Coelomycetes (celomicetos) e Agonomycetes (agonomicetos ou *micelia sterilia*).

O Filo *Blastocladiomycota* surgiu a partir da ordem Blastocladales (anteriormente pertencente ao Filo *Chytridiomycota*) (JAMES et al., 2006; KIRK et al., 2008) logo, possui uma única classe, *Blastocladiomycetes*, contendo cerca de 179 espécies, cujos representantes divergem do clado das quitrídias e são considerados grupo irmão juntamente com *Zygomycota*, *Glomeromycota*, *Rozella* spp. e *Olpidium brassicae* (JAMES et al., 2006). Historicamente, a classificação de *Blastocladiomycota* e *Chytridiomycota* baseava-se nas características morfológicas, tais como: tipo de desenvolvimento do talo (monocêntrico ou policêntrico), presença ou ausência de opérculo, morfologia dos zoosporângios e presença e tipo de esporos de resistência, dentre outras (SPARROW, 1960; KARLING, 1977; BARR, 1980); características como o tipo de talo e opérculo, foram consideradas preponderantes para a classificação desses grupos basais (JAMES et al., 2000). Foi a partir dos estudos de Barr

(1980) que a classificação começou a ser reformulada, tendo em vista as características ultraestruturais dos zoósporos e, mais recentemente, por sequências de genes do DNA ribossomal (JAMES *et al.*, 2006).

O Filo *Neocallimastigomycota* (1 Ordem, 1 família, 6 gêneros), Esses fungos anaeróbios são encontrados, em sua maioria, vivendo no sistema digestório de mamíferos herbívoros. Produzem zoósporos não flagelados.

O Filo *Microsporidia* é caracterizado por apresentar fungos que não possuem peroxissomos e flagelos e que são parasitas obrigatórios de animais e causando doenças em humanos imunodeprimidos.

2.2 Hifomicetos

Os fungos são uma das comunidades mais importantes da biodiversidade, essencial para a sobrevivência de outros organismos e crucial nos processos ecológicos vitais para a manutenção dos ecossistemas (HAWKSWORTH 2002; SUBRAMANIAN, 1982).

Os hifomicetos ou “*Hyphomycetes*” são fungos anamórficos, amplamente distribuídos no ambiente, presentes em diferentes habitats terrestres e aquáticos, e mesmo dispersos pelo ar na forma de conídios e/ou fragmentos de hifas (esporos de reprodução assexuada) (KIRK *et al.* 2008). Atuam tanto como saprófitos, participando do processo de decomposição de diversos substratos nos ecossistemas, em particular os de origem vegetal, sendo o grupo mais numeroso dentre os fungos anamórficos ocorrendo em abundância no folheto (GRANDI; GUSMÃO 2002). Bem como, patogênicos biotróficos, dependem do hospedeiro vivo para se multiplicar (Ex: *Oidium* sp.) ou facultativos, sobrevivem fora do hospedeiro por meio de estruturas de resistência (Ex: *Sclerotinia* sp.)

2.3 Cercosporóides

Os fungos cercosporóides (*Capnodiales*, *Dothideomycetes*) são um dos maiores grupos de fungos anamórficos, distribuídos em uma ampla gama de hospedeiros, em países tropicais e subtropicais, compreendendo mais de 2000 espécies tradicionalmente classificadas no gênero *Mycosphaerella* Johanson, e são constantemente encontrados causando manchas e desfolhamentos, bem como em flores, frutos e sementes de cereais, hortaliças, plantas ornamentais, de essências florestais e de gramíneas. (SILVA, 2016)

Agrupados inicialmente no complexo gênero *Cercospora*, esses fungos foram recentemente desmembrados em gêneros menores, utilizando-se, estudos de biologia molecular e reclassificados, com os trabalhos iniciados por Crous *et al.*(2000) e posteriormente por Crous e Braun (2003).

No Brasil, foram vários os autores que têm estudado os fungos cercosporóides, cujos trabalhos foram iniciados por Viégas (1945) e posteriormente uma excelente compilação destaca as espécies descritas por Batista e colaboradores (SILVA; MINTER, 1995); com

importantes informações fornecidas por Crous *et al.* (1997), Inácio *et al.* (1996) e Mendes *et al.* (1998) e Freire (2005), Braun (2013), Dianese (2001), Deighton (1976), Chupp (1954), Braun (1995), Crous e Braun (2003), Crous *et al.*, 2013 e Groenewald *et al.*, 2013, entre outros. Estes autores vêm ao longo dos anos discutindo a evolução do conceito do gênero de cercosporóides exaustivamente com especial ênfase em *Pseudocercospora* e *Cercospora*, respectivamente, e inúmeros trabalhos foram feitos, para a classificação do gênero *Cercospora*, sendo um número significativo de espécies adicionais já descrito (ANDRADE, 2016).

2.3.1 *Camptomeris*

O gênero *Camptomeris* Sydow foi descrito por Sydow em 1927 em espécies da família *Fabaceae*, pertencentes aos gêneros: *Leucaena* Benth., *Calliandra* Benth., *Acacia* Mill., *Desmanthus* Willd., *Pithecolobium* Benth. e *Albizzia* Benth. (BESSEY, 1953; ELLIS, 1971; SYDOW, 1927;).

O agente etiológico de manchas foliares em *Leucaena* Benth foi relatado pela primeira vez em *L. glauca* (L.) Benth por Stevens e Dalbey (1919) [= *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit] em Porto Rico. Este fungo causa severa desfolha no seu hospedeiro e caracteriza-se por apresentar conidióforos marrom-claros a marrons, curtos, fasciculados emergindo do estroma interno formando esporodóquio hipófilo, originando conídios cicatrizados na base (ELLIS, 1971).

2.3.2 *Cercospora*

O gênero *Cercospora* foi descrito por Georg Fresenius em 1863 e validada no mesmo ano por Fuckel (Fresenius, 1863; Fuckel, 1863), baseando-se na espécie-tipo *Cercospora apii* Fresen. A maioria destas espécies, ainda não tem um estágio sexual conhecido e o número de conhecidas aumenta anualmente, porque são em sua maioria patogênicas e específicas ao hospedeiro (BARRETO, 2006; DEN BREEÏEN *et al.*, 2006; HUNTER *et al.*, 2006; PEREIRA;).

As espécies pertencentes ao gênero *Cercospora* se caracterizam-se pela formação de células conidiogênicas geniculadas, desenvolvendo-se simpodialmente, com *loci* conidiogênicos conspícuos, evidenciando cicatrizes laterais ou no ápice das células conidiogênicas, os conídios são formados nos conidióforos os quais são liberados tanto lateralmente quanto a partir da extremidade no *locus* conidiogênico. Os conidióforos estão presos à células estromáticas que culminam na formação de fascículos de conidióforos. Os fungos cercosporóides apresentam uma grande variação na germinação, penetração, colonização e esporulação. As espécies podem penetrar por via direta, por aberturas naturais ou por mecanismos químicos, devido à ação de toxinas como cercosporina, por aberturas naturais, como estômatos e hidatódios e por ferimentos ocasionados por insetos ou outros organismos (GAUMANN, 1950).

2.3.3 *Cylindrosporium*

Cylindrosporium é um gênero de fungo que tem sido associado com manchas foliares em muitas plantas lenhosas, incluindo *Shepherdia*, *Salix*, *Ulmus*, *Alnus*, *Corylus*, *Robinia*, *Rhus*, *Juglans*, *Morus*, *Ostrya*, *Prunus*, *Betula*, *Castanea*, *Fraxinus*, *Acer*, *Celtis*, *Carpinus* e *Quercus* (WEISS, 1960)

Cylindrosporium Grev. (1822) foi descrito e classificado como um gênero de fungos imperfeitos pertencentes a família *Melanconiaceae* dentro do grupo dos celomicetos ou Coelomycetes (categoria informal para abrigar fungos que formam estruturas fechadas de produção de conídio: acérvulo, picnídio e picnotírio), produzindo conídios filiformes hialinos em acérvulos (SUTTON, 1980; NAG RAJ, 1993; LUZ, 2012). Entretanto, Viégas (1946) em seu trabalho sobre alguns fungos do Brasil, já caracterizava o gênero *Cylindrosporium* com características pertencentes aos hifomicetos, como presença de esporodóquio subepidérmico (feixes de conidióforos presos em uma base estromática). Esta dificuldade em se determinar o tipo de conidioma (seja acervular ou esporodoquial), também foi salientada por Braun e Freire (2004). Onde o gênero *Cylindrosporium* fora alocado dentro da família *Polygonaceae* como sinônimo de *Phloeospora* por ainda não ter sido abordada a análise molecular naquele trabalho. Atualmente classificado em *Incertae sedis*, *Helotiales*, *Leotiomycetidae*, *Leotiomyces*, *Pezizomycotina*, *Ascomycota*, *Fungi* e caracterizado por formar conidioma esporodoquial, subcuticular, estroma irrompente originando vários feixes de conidióforos, reproduzindo uma grande quantidade de conídios alongados e estreitos, congruente ao acérvulo.

2.3.4 *Passalora*

O gênero *Passalora* foi descrito por Fries (1849) como o primeiro nome genérico dentro do complexo de hifomicetos cercosporóides, em cerca de 550 espécies.

Crous e Braun (2003) publicaram uma lista de verificação anotada de nomes nos gêneros *Cercospora* e *Passalora*, contendo 5720 táxons e realocações taxonômicas de numerosas espécies, e em 2005, Braun e Crous listaram as primeiras adições e correções à *Cercospora* e *Passalora*.

2.3.5 *Pseudocercospora*

Pseudocercospora (*Mycosphaerellaceae*, *Capnodiales*) é um gênero de fungos anamórficos de ampla ocorrência em diferentes plantas hospedeiras e locais, ocasionando manchas foliares, necroses e posterior queda das folhas. As manchas são inicialmente circulares, amareladas tornando-se amarronzadas ou escuras e posteriormente necrosadas e coalescentes, apresentando estruturas do fungo tanto na parte adaxial (epífila) como abaxial (hipófila) da folha, ou em ambas (anfígenas) (GUO; HSIEH, 1995).

O gênero *Pseudocercospora* foi estabelecido por Spegazzini (1910) baseado na espécie-tipo de *P. vitis*, causando manchas foliares em *Vitis vinifera*. O gênero foi reportado como patógeno em muitas espécies de plantas em diferentes lugares e culturas, podem ser também utilizado para controle biológico de plantas daninhas (FARR; ROSSMAN, 2015; MENDES; URBEN, 2015; PEREIRA; BARRETO, 2006).

O fungo tem sido encontrado associado com sua fase sexuada (teleomórfica) ou seja, o gênero *Mycosphaerella* (= *Ramularia*), onde hoje o nome do holomorfo é dado para o anamorfo, ou seja, *Pseudocercospora* (ANDRADE, 2016).

Este gênero hoje é aceito para acomodar fungos sinemáticos análogos de *Cercospora* como *Phaeoisariopsis* Ferraris (1909) e para fungos com estruturas conidiogênicas pigmentadas e conídios com hilos não engrossados e não escurecidos (DEIGHTON 1976, BRAUN 1995). Logo, são caracterizados pela ausência de cicatriz, o que não ocorre nos generos de *Cercospora* e *Passalora* por exemplo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A caracterização morfológica e molecular foram obtidas com base na coleta de amostras vegetais sintomáticas, processamento do material, isolamento do patógeno comparação com dados presentes na literatura, extração do DNA genômico, amplificação por PCR e análise filogenética, dados a seguir.

3.1 Análises morfológicas

3.1.2 Área de coleta, Material coletado, processamento e caracterização.

As amostras deste estudo (Tabela 1) foram coletadas no município de Seropédica-RJ (Latitude: 22° 44' 38" S Longitude: 43° 42' 27" W, Altitude: 26m, Área: 267, 7 Km², Clima: tropical, quente e úmido (IBGE, 2015), distribuídas dentro do Campus da UFRRJ, Fazendinha Agroecológica Km 47, Bairro Ecologia km 47, Bairro Fazenda caxias Km 49 e o Bairro INCRA(Fig. 1-2).

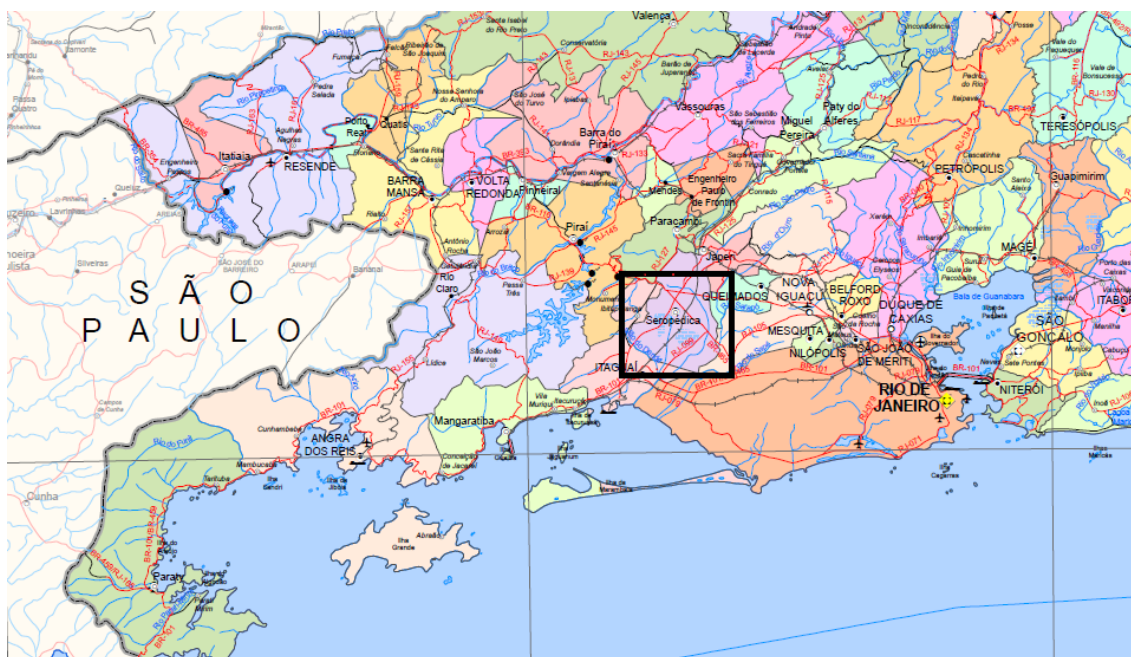


Figura 1. Mapa político do Estado do Rio de Janeiro e município de Seropédica (Área de estudo/coletas). FONTE: IBGE, 2015.

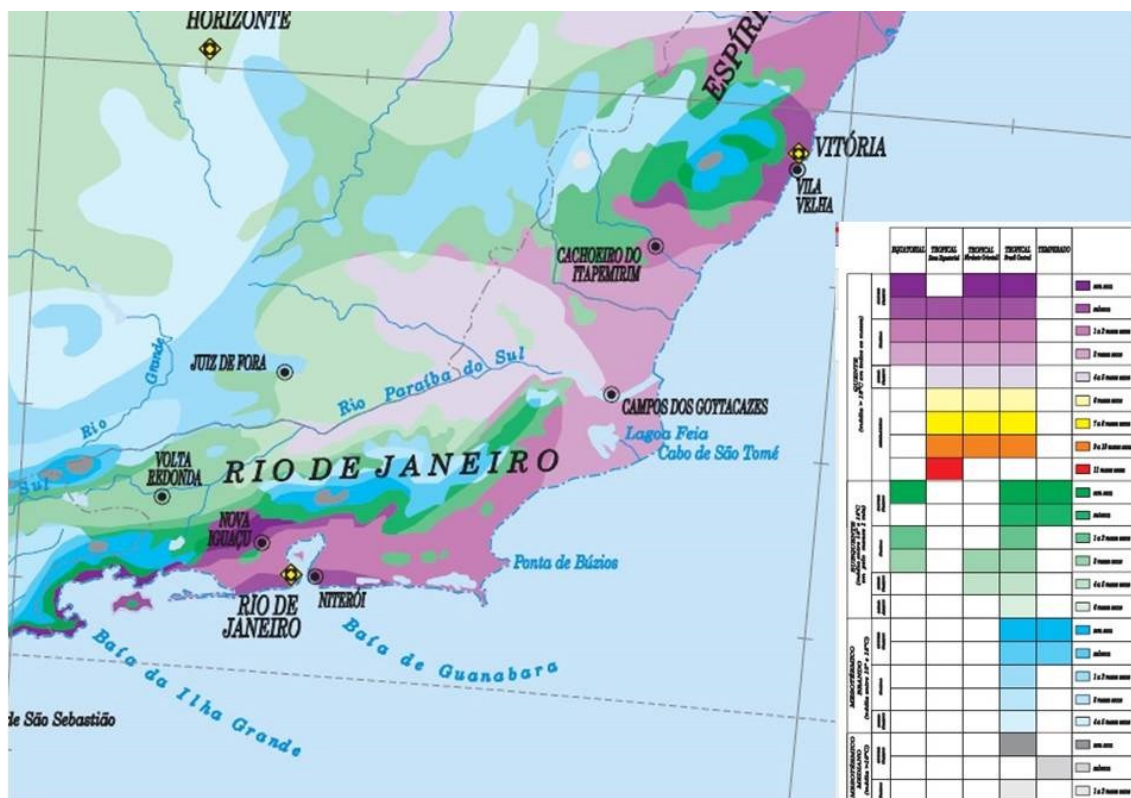


Figura 2. Mapa do clima presente no Estado do Rio de Janeiro e no Município de Seropédica localizado próximo a Nova Iguaçu.

FONTE: IBGE, 2015.

As amostras vegetais sintomáticas coletadas foram levadas ao laboratório de Micologia/Fitopatologia (DENF/UFRRJ), onde foram inicialmente examinadas utilizando-se microscópio estereoscópico (Lupa) para visualização das estruturas do fungo. Após, foram preparadas lâminas utilizando-se corante azul de algodão, lactoglicerol e floxina para visualização e fotodocumentação em microscópio óptico. Foram utilizados estiletos de ponta fina para a remoção das estruturas fúngicas, como também realizaram-se cortes histológicos à mão-livre e em micrótomo criostático (Leica CM1950) presente no Instituto de Química/UFRRJ, a fim de determinar a relação patógeno-hospedeiro intracelular. As lâminas foram observadas em microscópio óptico Olympus BX41 e as estruturas fúngicas foram medidas morfometricamente com régua micrométrica presente na lente ocular direita do microscópio, 50 repetições no aumento de 100x. Toda fotodocumentação foi realizada com câmera Cannon - Power Shot Elph 100 HS.

O material coletado foi herborizado e incorporado ao Herbário Fitopatológico “Verlande Duarte Silveira”, presente no laboratório de Micologia/Fitopatologia após a secagem em estufa de lâmpadas incandescentes a 60°C/7dias. Recebendo um numero de registro para armazenagem.

Os espécimes foram isolados em meio BDA por isolamento direto, tocando-se a extremidade do micélio com auxílio da ponta de um estilete previamente flambado, e depositando-se em placas de BDA⁺ (suplementado de antibiótico) e posteriormente incubados em BOD ajustada em 25°C/7 dias. Foram transferidos para tubos de vidro para armazenagem na coleção fitopatológica do laboratório de Micologia/fitopatologia após a confirmação da

identificação dos isolados fúngicos com o preparo de lamínas e visualização em microscópio óptico.

As identificações dos fungos foram feitas com base em literatura referente aos fungos cercosporóides: Chupp (1954), Deigton (1976), Hsieh e Goh (1990), Guo e Hsieh (1995), Crous e Braun (2003), Braun (2002), Crous (2013). A verificação de nomes científicos, nomes de autores, validade e sinonímias foram feitas em portais online como: o *Index Fungorum* (www.indexfungorum.org) do CABI Bioscience Database, administrado por Paul Kirk e colaboradores, o Cyberliber (<http://www.cybertruffle.org.uk/cyberliber/>) mantido por David W. Minter, o portal do United State Department of Agriculture (<http://nt.arsgrin.gov/fungaldatabases/fungushost/fungushost.cfm>) sob a responsabilidade de David Farr e Ammy Rossman, e o banco de dados da coleção micológica da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (<http://pragawall.cernagen.embrapa.br/aiqweb/michtml/fgbanco01.asp>).

Os hospedeiros não conhecidos foram identificados com auxílio da literatura pertinente, dentre elas o livro de Plantas Daninhas no Brasil (LORENZI, 2000). Na tabela a seguir seguem os dados dos hospedeiros e dos fungos coletados neste estudo.

Tabela 1. Hospedeiros coletados e gêneros fúngicos identificados. (Continuação)

Hospedeiro/Família	Fungo/Gênero	Isolado	Numero de registro	Local de coleta	Data de coleta
<i>Leucaena leucocephala/ Fabaceae</i>	<i>Camptomeris</i>	C182	12622	DENF/UFRRJ	13/12/2017
<i>Triplaris americana/ Polygonaceae</i>	<i>Cylindrosporium</i>	-	12646	UFRRJ	01/02/2018
			12656		17/04/2018
			12445		18/04/2017
<i>Spinacea oleraceae/ Brassicaceae</i>	<i>Cercospora</i>	C211	12447	Seropédica	22/11/2017
			12617		09/12/2017
<i>Solanum betaceum/ Solanaceae</i>	<i>Cercospora</i>	C217	12639	UFRRJ	15/01/2018
			12643		26/01/2018
<i>Bougainvillea glabra/ Nyctaginaceae</i>	<i>Passalora</i>	C204	12498	UFRRJ	14/08/2017
			12545		26/09/2017
			12549		29/09/2017
<i>Phaseolus vulgaris/ Fabaceae</i>	<i>Pseudocercospora</i>	C206	12568	INCRA	02/10/2017
			12431		27/03/2017
<i>Turnera ulmifolia/ Turneraceae</i>	<i>Pseudocercospora</i>	C175	12466	DENF/ UFRRJ	15/10/2017
			12652		20/03/2018
<i>Centraterum punctatum/ Asteraceae</i>	<i>Pseudocercospora</i>	C177	12465	DENF/UFRRJ	27/03/2017
<i>Crotalaria incana/ Fabaceae</i>	<i>Pseudocercospora</i>	C207	12576	DENF/UFRRJ	12/10/2017
			12619		13/12/2017
			12589		03/11/2017
<i>Croton lobatus/Euphorbiaceae</i>	<i>Pseudocercospora</i>	C218	12621	DENF	13/12/2017
			12651		20/03/2018
			12653		25/04/2018
<i>Canavalia ensiformis/ Fabaceae</i>	<i>Pseudocercospora</i>	C215	12620	Fazendinha	13/12/2017
<i>Vigna unguiculata/Fabaceae</i>	<i>Pseudocercospora</i>	C212	12593	UFRRJ	13/11/2017
<i>Macroptillum lathyroides/Fabaceae</i>	<i>Pseudocercospora</i>	-	12555	UFRRJ	29/09/2017
<i>Muntingia calabura/ Muntingiaceae</i>	<i>Pseudocercospora</i>	C216	12608	Seropédica	03/12/2017
			12649		20/03/2018

Tabela 1.Continuação.

			12609		
<i>Eucalyptus grandis/ Myrtaceae</i>	<i>Pseudocercospora</i>	C214	12654	Seropédica	03/12/2017
			12655		17/04/2018
			12657		
<i>Handroanthus impetiginosus/ Bignoniaceae</i>	<i>Pseudocercospora</i>	C209	12562	UFRRJ	18/09/2017
			12605		22/11/2017
<i>Hibiscus sabdariffa /Malvaceae</i>	<i>Pseudocercospora</i>	-	12483	Seropédica	10/06/2017
			12502		
			12556		17/08/2017
<i>Solanum americanum/ Solanaceae</i>	<i>Pseudocercospora</i>	C201	12563	UFRRJ	26/08/2017
			12565		30/09/2017
			12583		01/11/2017
			12638		
			12281		10/06/2016
			12300		05/02/2016
<i>Solanum cernum/ Solanaceae</i>	<i>Pseudocercospora</i>	C197	12519	UFRRJ	26/08/2017
			12523		14/09/2017
			12563		15/01/2018
			12638		
			12435		11/08/2017
<i>Bixa orellana/Bixaceae</i>	<i>Pseudocercospora</i>	C205	12520	UFRRJ	14/09/2017
			12544		22/09/2017

3.2 análises moleculares: extração, PCR, sequenciamento e filogenia.

3.2.1 Extração do DNA genômico:

Para a extração do DNA genômico, os isolados foram crescidos em meio de cultura BDA (Batata Dextrose Agar) em placas de Petri, incubadas em BOD a $\pm 25^{\circ}\text{C}/15$ dias. O protocolo para obtenção da extração foi adaptado do Kit comercial para extração de leveduras Wizard® Genomic DNA Purification, PROMEGA. O micélio dos fungos foi retirado da placa por meio de um ponteira de 1 mL esterilizada, obtendo-se aproximadamente 6 a 8 discos miceliais (onde retirou-se totalmente o meio de cultura), foram colocados em microtubos de 2 mL contendo 0,2 g de Glass Beads ou Perolas de vidro (106 microns, SIGMA), e macerados com auxílio de pistilos esterilizados; após, foram acrescentados 600 μL de solução de lise celular, e agitação vigorosa em Vortex por 2 minutos. Depois se acrescentou 600 μL de solução de lise nucleica, seguindo-se agitação por 5 minutos em Vortex e 6 ciclos de aquecimento/resfriamento ($95^{\circ}\text{C}/1400$ rpm) em termomix e no gelo, sendo 5 minutos por para 4 ciclos e 10 min para os dois últimos ciclos. Em seguida, acrescentou-se 400 μL da solução de precipitação proteica com agitação em Vortex por 20 segundos, incubação no gelo por 5 minutos e centrifugação por 3 min/13000 rpm. Após a centrifugação, foram transferidos 600 μL do sobrenadante para novo microtubo contendo 600 μL de isopropanol, os quais passaram por uma breve mistura por inversão, e sequente centrifugação por 5 min/13000 rpm. O sobrenadante foi descartado e 600 μL de etanol 70% foram adicionados para lavagem do pellet. O material foi novamente centrifugado por 5 minutos, após o descarte do sobrenadante, foi seco em “Speed vacuum” por 10 minutos e reidratado com 100 μL da solução de reidratação de DNA sendo incubado à $65^{\circ}\text{C}/30$ minutos em termomix. E então quantificadas as amostras no aparelho espectrofotômetro Nanodrop 2000c (Termo Scientific).

3.2.2 PCR

Após a extração, as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C . Para a análise molecular foram realizadas reações de PCR utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990) que amplificam as regiões espaçadoras internas 1 e 2 do DNA ribossomal, além do 5.8S DNA ribossomal (ITS1-5.8-ITS2). Os reagentes usados na preparação do Mix para reações da PCR foram H₂O de PCR, Buffer, MgCl₂ 2,5 mM, dNTP 0,25 mM, BSA, ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG- 3') e ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC- 3') (WHITE *et al.*, 1990). Foram adicionados ao microtubo 23 μL de Mix e 2 μL de cada amostra de DNA, e colocados na máquina de PCR com a seguinte programação: 95°C por 7 min, 35 ciclos; Desnaturação a 94°C por 1 min; Anelamento a 55°C por 1 min; Alongamento a $72^{\circ}\text{C}/1$ min; Final $72^{\circ}\text{C}/10$ min permanecendo a 4°C até a retirada do equipamento. O tamanho do fragmento amplificado e sua qualidade foram determinados com base em cálculos utilizando-se Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) como padrão molecular, após a realização de eletroforese com 2 μL do produto em gel de agarose preparada a 2% utilizando-se 0,2 g de

agarose em 100 mL de tampão TAE (Tris-Acetato EDTA) 1x. Para migração dos fragmentos de DNA, a corrente elétrica foi usada em uma faixa de 90 V com duração de 90 minutos, e visualizados no transluminador de luz UV em géis de agarose 2% corados com Brometo de Etídeo.

3.2.3 Sequenciamento das amostras amplificadas e filogenia

A reação de sequenciamento dos fragmentos amplificados foi realizada a partir de 10 µL de DNA; 1,5 µL de tampão para sequenciamento 5X (Applied Biosystems Cat 4336697); 1 µL de Big Dye Terminator v3. 1 (Applied Biosystems Cat 4336917) e 1 µL de iniciador direto e reverso na concentração de 5M.

As sequências obtidas foram alinhadas e concatenadas através do programa Bionumerics e comparadas com sequencias depositadas no Genbank, através da ferramenta Basic Alignment search Tool – BLAST/ NCBI. A análise filogenética foi realizada no programa MEGA 6.0 (TAMURA *et al.*, 2011), e a construção das árvores foram realizadas através do método “Neighbor-joining” (junção vizinha) com cálculo da distância pelo modelo “Kimura’s 2- parameter” com mil repetições “bootstrap”.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontrados e caracterizadas morfológicamente 20 espécies causando manchas foliares em plantas daninhas e de importância agrônômica, entre os gêneros de cercosporóides, sendo eles: *Camptomeris*: 1 espécie; *Cercospora*: 2 prováveis novas espécies; *Cylindrosporium*: 1 provável nova espécie; *Passalora*: 1 espécie; *Pseudocercospora*: 15 espécies prováveis novas espécies .

4.1 Espécies do gênero *Camptomeris*.

4.1.1 *Camptomeris leucaenae* (F. Stevens & Dalbey) Syd., *Annales Mycologici* 28: 222 (1930) em folhas de *Leucena leucocephala* (*Fabaceae*) (Fig. 3-4)

Synonym. *Exosporium leucaenae* F. Stevens & Dalbey, *Mycologia* 11: 5 (1919).

Descrição: *manchas foliares* ausentes, estruturas hipófilas. *Micélio* interno, marrom claro, *hifas* 2-5 µm de diam. *Esporodóquio* 40-120 µm, irrompentes, composto por células de parede marrom de 3-9 µm de diâmetro. *Conidióforos* 26-70 × 7-10 µm, castanho-claros, retos a sinuosos, cicatrizado, 0-1-septado. *Conídios* 28-65 × 8-12 µm, pálidos a marrom-claros, retos a sinuosos, atenuados na parte superior e cicatrizados na base, 1-5-septados.

Espécime examinado: **Brasil:** Rio de Janeiro, Seropédica. DENT (Departamento de Entomologia e Fitopatologia UFRRJ Em folhas de *Leucaena leucocephala* (*Fabaceae*) "Leucena". 13/12/2017. Col. Jonas dias de Almeida 45 (UFRJ 12622).

Discussão: A espécie mais próxima da encontrada no Estado do Rio de Janeiro é *Camptomeris leucaenae* (F. Stevens & Dalbey) Syd. (1930) (= *Exosporium leucaenae* F. Stevens & Dalbey, 1919), diferindo por formar estromas (esporodóquio) mais estreito e *C. cassiae* Bat., J.L. Bezerra & Poroca descrita por Batista *et al.* (1966) claramente difere da espécie aqui encontrada, nas dimensões de conídio e conidióforos. Sendo este, o primeiro relato deste fungo em *L. leucocephala* no Estado do Rio de Janeiro.

Tabela 3. Características de *Camptomeris* sp. em *Leucaena leucocephala* L. comparadas com espécies descritas no mesmo hospedeiro e da mesma família botânica.

Espécies	Hospedeiro	Local	Lesão (mm)	Hifa (µm)	Esporodóquio (µm)	Conidióforos (µm)	Conídios (µm)	Referências
<i>Camptomeris leucaenae</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>	Porto Rico, Jamaica, San Domingo, Venezuela, Belize, Colômbia, Republica Dominicana, Equador, Índia, Venezuela, Jamaica, México, Filipinas, Taiwan	-	-	-	Fasciculados	30-60 × 8-11 (maioria 3-septos)	Ellis (1971); Sydow (1930) Farr e Rossman (2017).
<i>Camptomeris leucaenae</i>	<i>L. leucocephala</i>	Minas Gerais, Brasil.	Anfígenas	-	87-176	-	40-59 × 9-10 (2-3-septados)	Silva (2016a).
<i>Camptomeris leucaenae</i> = <i>Exosporium</i>	<i>L. glauca</i>	Porto Rico	2-4 Hipófilas	-	110-240	-	58 × 8 (3 ou mais septos)	Stevens e Dalbey (1919)
<i>Camptomeris leucaenae</i>	<i>L. leucocephala</i> <i>L. collinsi</i> , <i>L. diversifolia</i>	Distrito Federal, Minas Gerais, Paraná, Ceará-Brasil.	3-5 Hipófilas	-	-	-	-	Resende <i>et al.</i> (1988).
<i>Camptomeris cassiae</i>	<i>Cassia</i> sp.	Brasilia, Brasil	Anfígenas	-	-	75-90 × 4,5	16,5-37 × 6-7,5	Batista <i>et al.</i> (1966).
<i>Camptomeris</i> sp.	<i>Leucaena leucocephala</i> L.	Rio de Janeiro, Brasil	-	2-5	40-120	26-70 × 7-10	28-65 × 8-12 (1-5-septos)	Este Trabalho

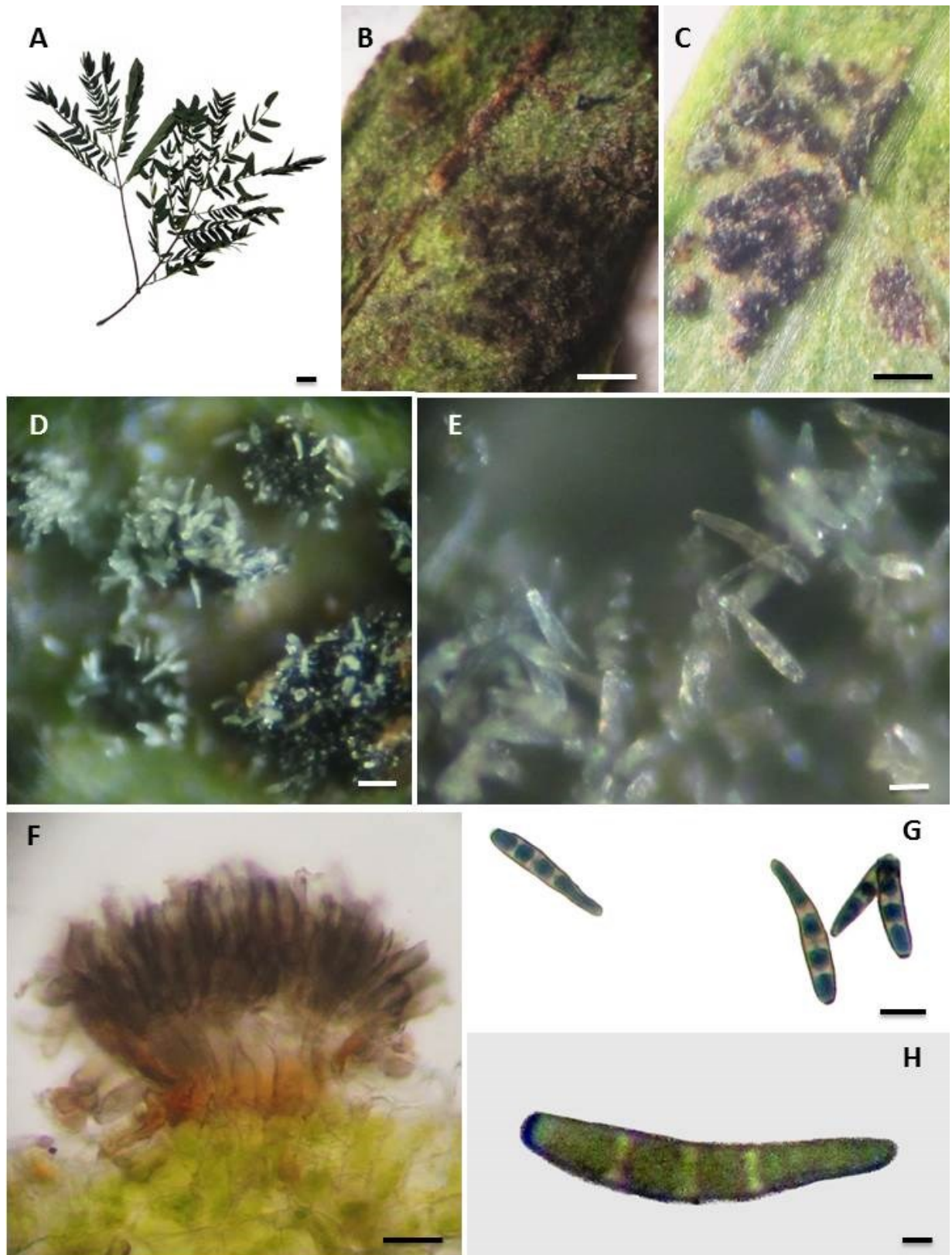


Figura 3. A-H: *Camptomeris leucaenae* em folhas de *Leucaena leucocephala* L. (*Fabaceae*). A-C: Folhas de “leucena” com estruturas do patógeno (Barras = A: 10 μ m; B-C: 1 μ m). D-E: Esporodóquio e conídios vistos ao microscópio óptico no aumento de 10 e 20x (Barras = D: 30 μ m; E: 20 μ m). F: Esporodóquio (Barra = 20 μ m). G: grupo de conídios (Barras = 20 μ m). H: Conídio solitário (Barra = 5 μ m).

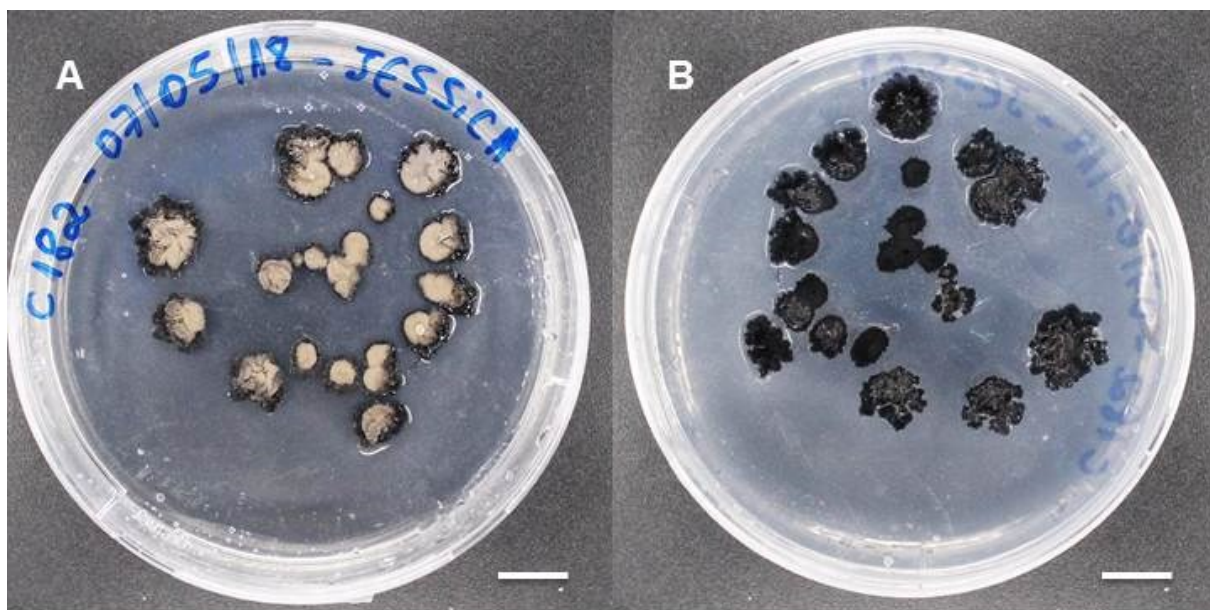


Figura 4. A-B: *Camptomeris leucaenae* em meio de cultura BDA a ± 25 °C/ 15 dias (Barra = 1 cm).

4.2 Espécies do genero *Cercospora*

4.2.1 *Cercospora* sp. em folhas de *Spinacia oleracea* L. (*Amaranthaceae*) (Fig 5-6). Provável espécie nova n° 1.

Descrição: *manchas foliares* presentes, 2-8 mm de diâmetro, estruturas hipófilas. *Micélio* interno, marrom claro, *hifas* 2-6 µm de diam. *Micélio* externo ausente. *Estromas* 15-33 × 25-40 µm, irrompentes, composto por células de parede marrom de 4-9 µm de diâmetro. *Conidióforos* 25-50 × 4-6 µm, castanho-claros, retos a sinuosos, cicatrizados, 0-3-septados. *Células conidiogênicas* proliferando simpodialmente, integradas, terminais, *loci conidiogênico* conspícuos, engrossados e escurecidos, apicais. *Conídios* 20-86 × 3-4 µm, solitários, pálidos a marrom-claros, retos a sinuosos, atenuados na parte superior e cicatrizados na base, cicatrizes inconspícuas, 1-10-septados.

Espécimes examinados: **Brasil:** Rio de Janeiro, Seropédica. Em folhas de *Spinacia oleracea* (*Amaranthaceae*) “Espinafre”. 18/04/2017. Col. Helena Guglielmi Montano 11/ 13 (UFRJ 12445/12447); 22/11/2017. Col. Carlos Antonio Inácio 02 (UFRJ 12588); 09/12/2017. Col. Carlos Antonio Inácio 42 (UFRJ 12617).

Discussão: A espécie em estudo apresenta conídios e lesões menores quando comparadas com *Cercospora beticola* Sacc (1873) (Tabela 4) e seu basiônimo, *Cercosporina tetragoniae* Speg. (1911). Forma conidióforos mais curtos que *C. beticola* (40-50-× 4-5), e um pouco mais largos (4-6). Indicando tratar-se provavelmente de uma nova espécie, a ser relatada no estado do Rio de Janeiro.

Tabela 4. Características de *Cercospora* spp. em folhas de espinafre na América do Sul, com a encontrada em *Spinacia oleracea* L. (Amaranthaceae) no Estado do Rio de Janeiro.

Espécies	Hospedeiro	Local	Lesão (mm)	Estroma (µm)	Conidióforos (µm)	Conídios (µm)	Referências
<i>Cercospora beticola</i>	<i>S. oleracea</i>	Minas Gerais, Brasil	Anfígenas	-	40-50 × 4-5	70-120 × 3	Reifschneider (1983,1985); Mendes e Urben (2018); Saccardo (1876).
<i>C. tetragoniae</i> Vassiljevsky	<i>S. oleracea</i>	RS, Brasil	-	-	-	-	Reifschneider (1983,1985); Mendes e Urben (2018)
= <i>Cercosporina tetragoniae</i>	<i>Tetragonia expansae</i>	La Plata	5-20 Anfígenas	-	20-30 × 4-5	60-85 × 4-5 (3-5-septos)	Spegazzini (1911)
<i>Cercospora</i> sp.	<i>S. oleracea</i>	Rio de Janeiro, Brasil	2-8 Anfígenas	15-33 × 25-40	25-50 × 4-6 (0-3-septos)	20-86 × 3-4 (1-10-septos)	Este Trabalho

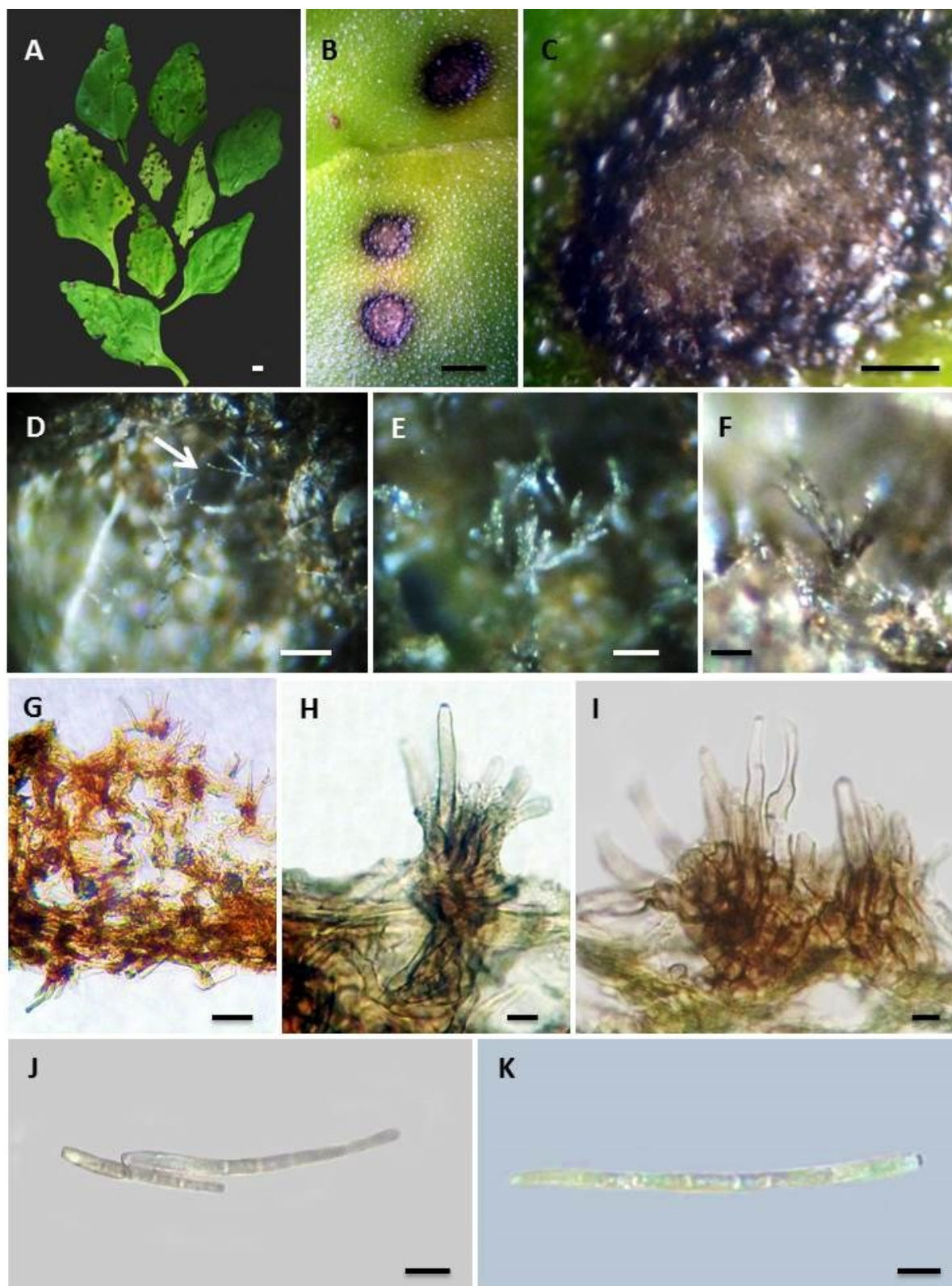


Figura 5. A- H: *Cercospora* sp. em folhas de *Spinacia oleracea* L. (*Amaranthaceae*). **A-C:** Sintomas (Barras = A: 1 cm; B: 5 mm; C: 1 mm). **D-F:** Conidióforos vistos ao microscópio óptico no aumento de 10 e 20x (Barras = D: 50 μ m; E: 30 μ m; F: 20 μ m). **G:** Estruturas anfigenas (Barra = 50 μ m). **H-I:** Estroma, micélio interno e conidióforo cicatrizado (Barras = **H:** 10 μ m; **I:** 1 μ m). **J:** Grupo de conídios (Barra = 10 μ m). **K:** Conídio solitário (Barra = 10 μ m).

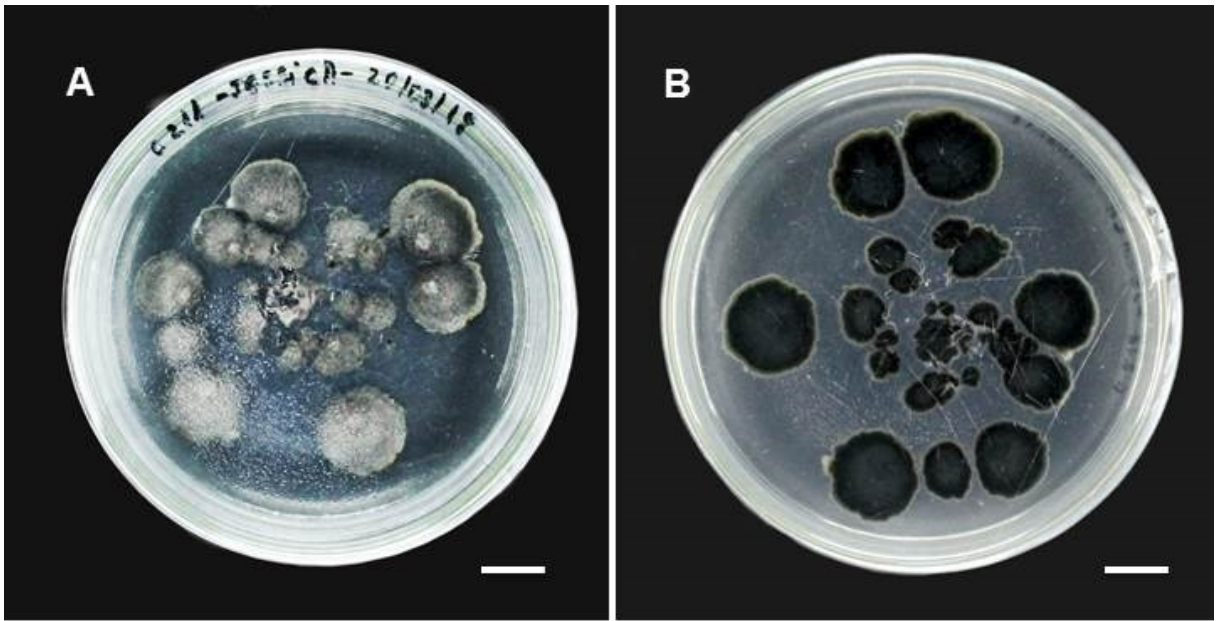


Figura 6. A- B: *Cercospora* sp. em meio de cultura BDA a ± 25 °C/ 15 dias (Barra = 1 cm).

4.2.2 *Cercospora* sp. em folhas de *Solanum betaceum* (Solanaceae) (Fig. 7-8). Provável espécie nova nº 2.

Descrição: *manchas foliares* presentes, 2-5 mm de diâmetro, estruturas hipófilas. *Micélio* interno, marrom claro, *hifas* 2-5 μm de diâmetro. *Micélio externo* ausente. *Estromas* 25-40 \times 35-58 μm , irrompentes, composto por células de parede marrom de 4-9 μm de diâmetro. *Conidióforos* 30-190 \times 4-5 μm , castanho claro, reto a sinuoso, cicatrizado. *Células conidiogênicas* proliferando de simpodialmente, integrada, terminal, com *loci* conidiogênico conspicuo, engrossado e escurecido, apical e lateral. *Conídios* 35-160 \times 4-5 μm , pálidos a marrom-claro, retos a sinuosos, atenuados na parte superior e cicatrizados na base, cicatrizes inconspícuas, 3-17-septos.

Espécimes examinados: **Brasil:** Seropédica. Rio de Janeiro. Em folhas de *Solanum betaceum* Cav “Tomate de árvore”. 15/01/2018. Jucimar Moreira de Oliveira 46 (UFRJ 12639). 26/01/2018. Jucimar Moreira de Oliveira 48 (UFRJ 12643).

Discussão: As espécies de *Cercospora* presentes na família *Solanaceae* que mais se aproximam da espécie em estudo encontrada no hospedeiro *Solanum betaceum* são: *Cercospora canescens* (CHUPP, 1954), descrito em *Solanum laciniatum* e *Phaseolus* sp., formam conidióforos mais curtos e mais largos (20-175 \times 3-6.5 μm) e conídios bem maiores (30-300 \times 2-6 μm) que os encontrados em *S. betaceum*. *Cercospora solani*, (CHUPP, 1954), descrita em *Solanum nigrum*, apresenta lesões epífilas, conidióforos (10-30 \times 4-5.5 μm) e conídios (30-130 \times 2,5-4 μm) menores que em *S. betaceum*. *Cercospora puyana* (CHUPP, 1954) descrita em *Solanum trachycyphum*, apresenta lesões pequenas e anfigenas e o comprimento do estroma (35-60 μm) semelhantes a espécie encontrada em *S. betaceum*, porem apresenta conidióforos (10-85 \times 2,5-4 μm) e conídios (40-115 \times 2-3,5 μm) mais curtos. *Cercospora solanicola* (MENDES *et al.*, 1998) descrita em *Solanum tuberosum*, apresenta conidióforos (40-200 \times 3-5 μm) bem próximos da espécie em estudo, porem apresenta lesões hipófilas e conídios (75-300 \times 3-5 μm) bem mais longos. Este e o primeiro relato deste fungo causando mancha foliar neste hospedeiro dentro da família *Solanaceae* para o Estado do Rio de Janeiro e para o Brasil.

Tabela 5. Características de *Cercospora* sp. em folhas de *Solanum betaceum* comparadas a outras espécies de *Cercospora* relatadas na família *Solanaceae*.

Espécies de <i>Cercospora</i>	Hospedeiro	Local	Lesão (mm)	Estroma (µm)	Conidióforos (µm)	Conídios (µm)	Referências
<i>C. apii</i>	<i>Solanum lycopersicum</i> <i>Apium graveolens</i>	Iran - -	-	Vários	20-300 × 4-6,5/vários	25-315 × 3-6/ pouco septado	Chupp (1954)
<i>C. canescens</i>	<i>S. lanum laciniatum</i> , <i>Phaseolus</i> sp.	Nova Zealandia	3-15 Anfígenas	-	20-175 × 3-6.5	30-300 × 2-6	Chupp (1954)
<i>C. cyperacearum</i>	<i>S. mammosum</i> :	Tailandia	Anfígenas	18-38 × 38-63	18-68 × 4-5	40-90 × 5-6	Nguanhom <i>et al.</i> , (2015)
<i>C. lanugiflori</i>	<i>S. lanugiflorum</i>	Venezuela	Epífilas	-	10-30 × 4-7	25-85 × 5-7,5	Chupp (1954)
<i>C. solani</i>	<i>S. nigrum</i> :	Portugal	Epífilas	Ate 75	10-30 × 4-5.5	30-130 × 2,5-4	Chupp (1954)
<i>C. nigri</i>	<i>S. nigrum</i>	India	4-6 Hipófilas	Ausente ou com poucas células	10-50 × 3-5	15-80 × 2,5-5	Kamal (2010); Tharp (1917)
<i>C. physalidis</i>	<i>S. indicum</i> , <i>S. luteum</i> , <i>S. melongena</i> <i>S. nigrum</i> , <i>S. tuberosum</i> , <i>S.</i> <i>verbascifolium</i>	India, Tailândia, Peru	3-10 Anfígenas	Ausente ou com poucas células	20-250 × 4-6,5	25-220 × 3-5	Kamal (2010); Chupp (1954)
<i>C. puyana</i>	<i>S. trachycyphum</i>	Equador	1-4 Anfígenas	35-60	10-85 × 2,5-4	40-115 × 2-3,5	Chupp (1954)
<i>C. sciadophila</i>	<i>S. violaefolium</i>	Brazil	2-5 Epífilas	6-15	15-45 × 3-4 (1-5- septos)	30-50 × 2-3,5	Crous e Braun (2003)
<i>C. solanacea</i>	<i>Solanum melongena</i> , <i>S. nigrum</i> , <i>S. torvum</i> , <i>S. verbascifolium</i>	Índia Tailândia Australia	1-6 Epífilas	20-60	20-55 × 3,5-5	20-60 × 4-5,5	Chupp (1954)
<i>C. solanicola</i> :	<i>S. tuberosum</i>	Brasil	Ate 10 Hipófilas	Pequeno	40-200 × 3-5	75-300 × 3-5	Mendes <i>et al.</i> (1998)
<i>Cercospora</i> sp.	<i>S. betaceum</i>	Rio de Janeiro, Brasil	2-5 Anfígenas	25-40 × 35-58	30-190 × 4-5	35-160 × 4-5	Este Trabalho

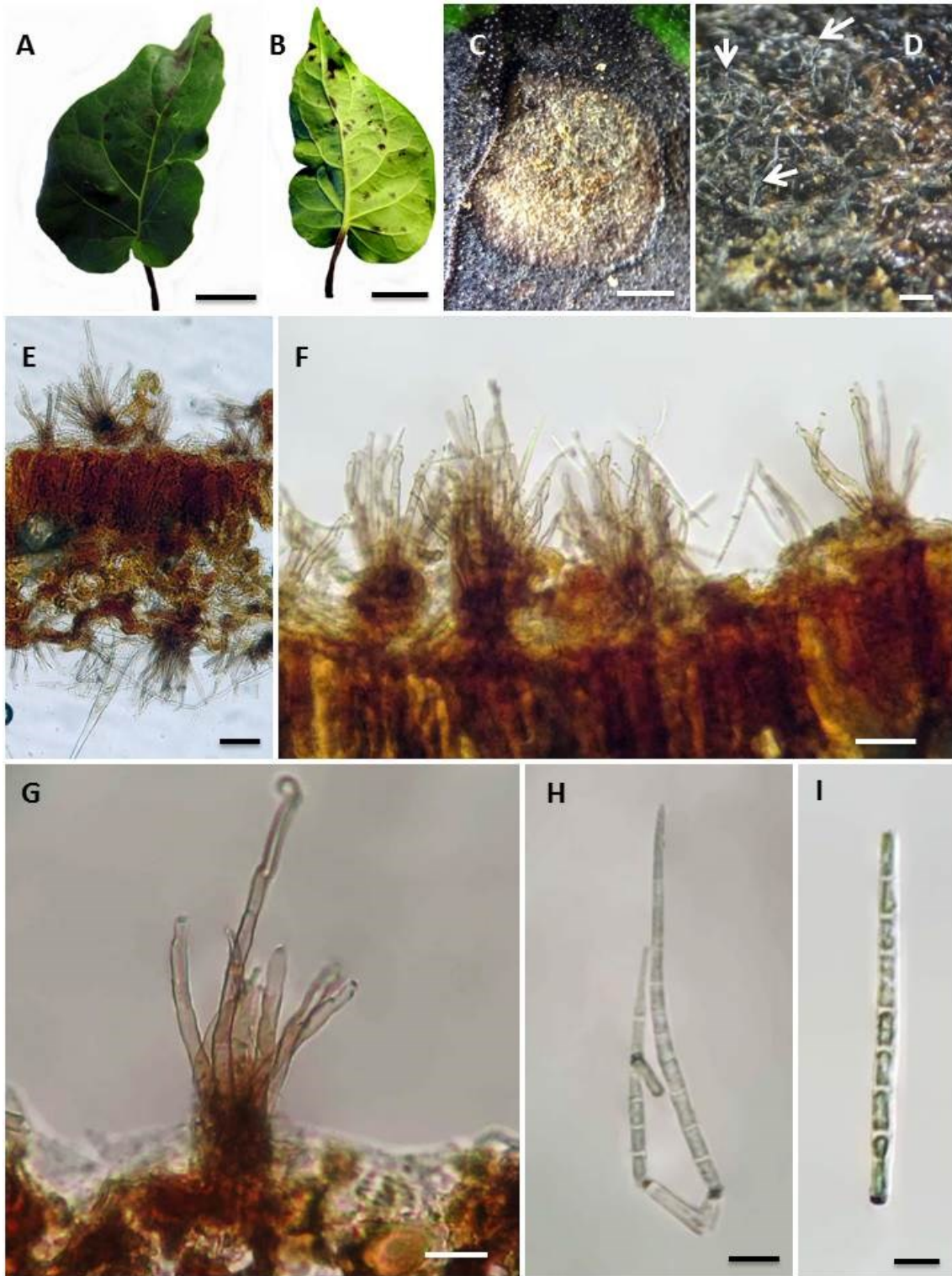


Figura 7. A- H: *Cercospora* sp. em folhas de *Solanum betaceum* (*Solanaceae*). A-D: Sintomas (Barras = A-B: 5 cm; C:1 cm; D: 100 μ m). E: Estruturas anfigenas (Barra = 20 μ m). F-G: Estroma e conidióforos cicatrizados (Barras = F: 50 μ m; G: 30 μ m). H: Conidióforos e conídios (Barra = 10 μ m). I: Conídio solitário (Barra = 5 μ m).

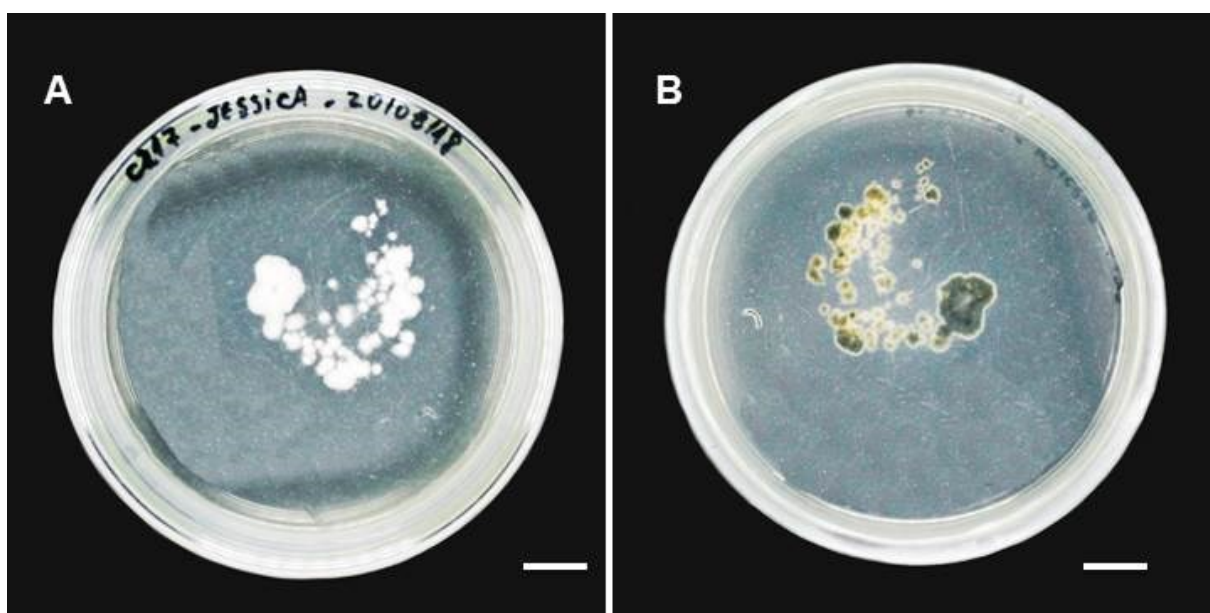


Figura 8. A- B: *Cercospora* sp. em meio de cultura BDA a ± 25 °C/ 15 dias (Barra = 1 cm).

4.3 Espécie do genero *Cylindrosporium*

4.3.1 *Cylindrosporium* sp. em folhas de *Triplaris americana* L. (*Polygonaceae*). (Fig. 9). Provável espécie nova n° 3.

Descrição: *Manchas foliares* presentes, 1-3 mm de diâmetro, estruturas anfigenas. *Esporodóquio* 30-100 µm, irrompentes, composto por células de parede marrom de 3-9 µm de diâmetro. *Conidióforos* 30-60 × 2-5 µm, castanho-claros, retos a sinuosos, não septados. *Conídios* 70-115 × 3-4 µm, hialinos, retos a sinuosos, atenuados na parte superior, 9-14-septos.

Espécimes examinados: Brasil: Rio de Janeiro. Seropédica. Em folhas de *Triplaris americana* L. (*Polygonaceae*) "Pau-formiga". 01/02/2018. Jonas dias de Almeida 49 (UFRJ 12646). 17/04/2018. Col. Jéssica Rembinski 43 (UFRJ 12656).

Discussão: Não há relatos do fungo *Cylindrosporium* em *Triplaris americana* no Brasil e no mundo. Todos os hospedeiros citados na Tabela 6 são de famílias distintas, e apresentam características diferentes das relatadas para a espécie em estudo indicando tratar-se de uma provável espécie nova para o Estado do Rio de Janeiro e para o Brasil.

Tabela 6. Característica de *Cylindrosporium* sp. em folhas de *Triplaris americana* L. (*Polygonaceae*) comparadas as espécies de *Cylindrosporium* descritas na literatura em hospedeiros distintos.

Espécies de <i>Cylindrosporium</i>	Hospedeiro	Local	Lesão (mm)	Esporodóquio (µm)	Conidióforos (µm)	Conídios (µm)	Referências
<i>C. acerinum</i>	<i>Acer glabrum</i>	EUA	-	-	-	30-40 × 1,5-2	Saccardo (1989)
<i>C. aceris-obtusati</i>	<i>Acer obtusatum</i>	Montenegro	2-5	200-250	-	28-45 × 3	Saccardo (1931)
<i>C. acicola</i>	<i>Pinus silvestris</i>	Suíça	-	-	30-45 1	54-70 × 1-1,5	Bressadola (1894)
<i>C. acori</i>	<i>Acorus calamus</i>	EUA	Anfígenas	-	-	16 × 4-8	Lion (1983)
<i>C. cercosporóides</i>	<i>Lilyodendron tulypifera</i>	EUA	Anfígenas	-	-	130-170 × 3-3,5	Ellis e Everhard (1887)
<i>Cylindrosporium</i> sp.	<i>T. americana</i>	Rio de Janeiro, Brasil	2-5 Anfígenas	30-100	30-60 × 2-5	70-115 3-5 (8-14-septos)	Este Trabalho

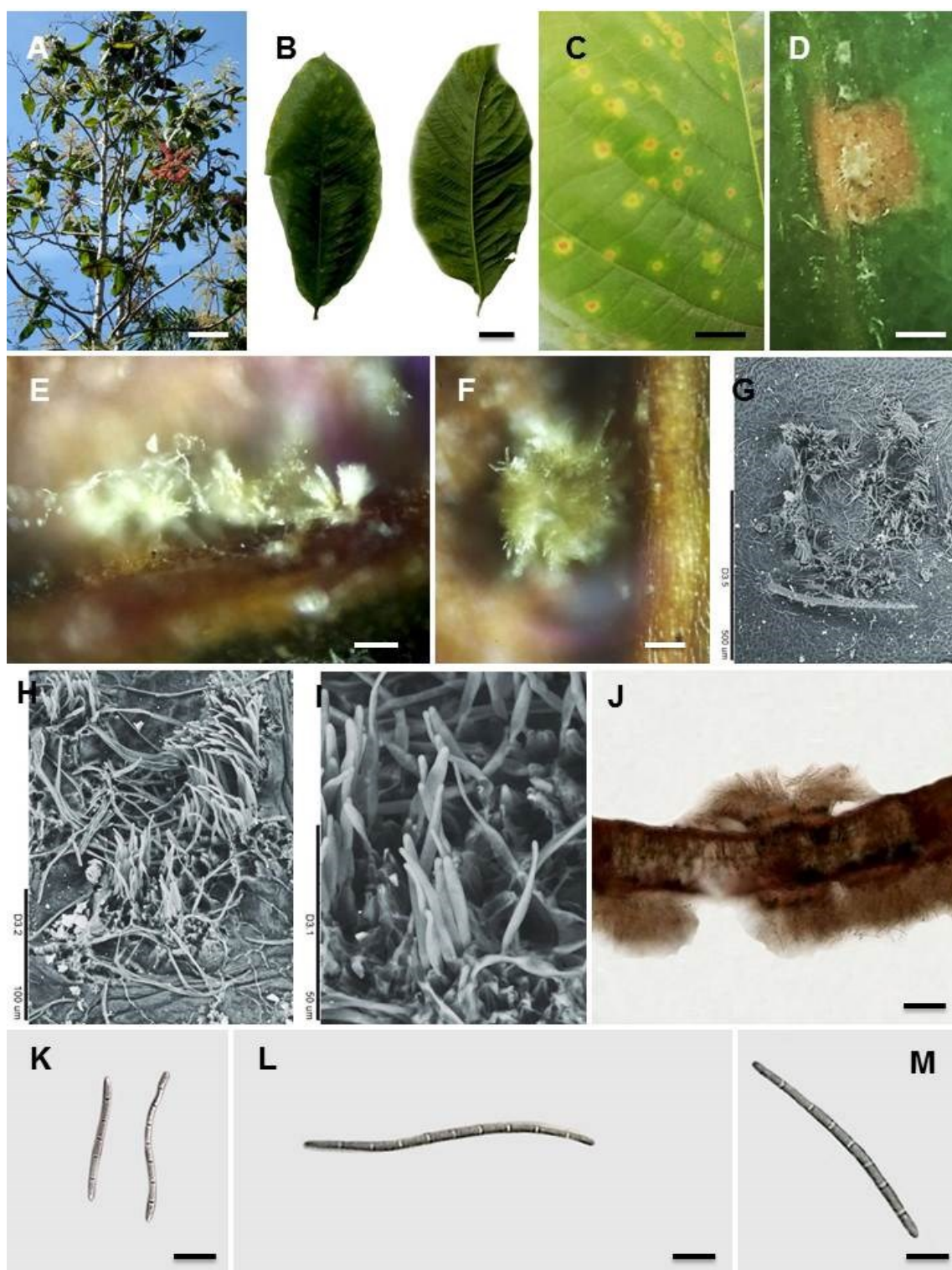


Figura 9. A-M: *Cylindrosporium* sp. em folhas de *Triplaris americana* L. A-D: Sintomas (Barras = A: 30 cm; B: 5 cm; C: 5 mm; D: 1 mm). E-F: Conidióforos e esporodóquio vistos ao microscópio óptico no aumento de 10 e 20x (Barras = E: 50 μ m; F: 20 μ m). G-I: Estruturas irrompentes vistas ao microscópio eletrônico de varredura (Barras = 500 μ m; 100 μ m; 50 μ m). Estruturas anfigenas (Barra = 50 μ m). J: Estruturas anfigenas (Barra = 30 μ m). K: Grupo de conídios (Barra = 15 μ m). L-M: Conídio solitário (Barra = 15 μ m).

4.4 Espécie do gênero *Pluripassalora*

4.4.1 *Pluripassalora* sp. em folhas de *Bougainvillea glabra* L. (*Nyctaginaceae*). (Fig. 10-11). Provável *Pluripassalora bougainvilleae*.

Descrição: *Manchas foliares* de 2 a 4 mm de diâmetro, inicialmente cloróticas, tornando-se marrons à cinza-esbranquiçadas na parte adaxial da folha, com margens castanhas, e castanho-claras à castanho-avermelhadas na parte abaxial. *Micélio* interno, hialino a marrom claro, *hifas* 1-4 μm de diâmetro. *Estromas* 20-40 \times 28-60 μm irrompentes, compostos por células de parede marrom de 2 a 5 μm de diâmetro. *Conidióforos* 18-40 \times 3-6 μm , castanho-claros, retos a sinuosos. *Conídios* 25-65 \times 5-7 μm , pálidos a marrom-claros, retos a sinuosos, atenuados na parte superior e com cicatriz na base, 2-4-septos.

Espécimes examinados: Brasil, Rio de Janeiro, Seropédica, Ecologia. Em folhas de *Bougainvillea glabra* (*Nyctaginaceae*) "Buganvílea", 14/08/2017. Col. Jonas dias de Almeida 02 (UFRJ 12498). 26/09/2017. Col. Jessica Rembinski 30 (UFRJ 12545).

Discussão: A espécie de *Pluripassalora* encontrada no Estado do Rio de Janeiro mostrou-se com estreita proximidade à *P. bougainvilleae*, reportada no gênero *Bougainvillea* (Tab. 7), Sendo a mesma, reclassificada por Videira *et al.* (2017) como sinônimo de *Pluripassalora bougainvilleae*, e portanto foi adotado este novo genero para este trabalho. Cabe mencionar que este é o primeiro relato do gênero em *B. glabra*, e primeiro relato para o Estado do Rio de Janeiro.

Tabela 7. Características de *Pluripassalora* sp. em folhas de *Bougainvillea glabra* L. comparadas com as espécies descritas no genero

Espécies	Hospedeiro	Local	Mancha (mm)	Estroma (µm)	Conidióforos (µm)	Conídios (µm)	Referências
<i>Passalora bougainvilleae</i>	<i>B. spectabilis</i> Willd.	Ceará, Brasil	-	-	-	-	Freire (2005)
<i>P. bougainvilleae</i>	<i>B. spectabilis</i>	Vientiane, Laos	1-5	15-45	12-63 × 4-6 (0-2 septos) 26-57 (39)	6-65 × 4,5-6 (2-4 septos)	Castañeda e Braun (1991)
<i>P. bougainvilleae</i>	<i>B. spectabilis</i>	Roraima, Brasil		26-44 (35) × 26-41 (34)	× 4 (0-2 septos)	32-70(47) × 4-5 (4,5)	Nechet e Halfeld- Vieira (2008)
<i>P. bougainvilleae</i>	<i>B. spectabilis</i>	Uberlândia Brasil	-	-	-	-	Sologuren e Juliatti (2007)
<i>P. bougainvillea</i> = <i>Cercosporidium</i>	<i>Bougainvillea</i> sp.	Espanha	-	-	130 × 4-6	28-80 (3-5 septos)	Sobers e Saymour (1969)
= <i>Pluripassalora bougainvilleae</i>			2-5	25-50	24-62 × 5-6	40-116 × 7-10 (3-10-septos)	Vieira <i>et al.</i> (2017)
<i>Pluripassalora</i> sp.	<i>Bougainvillea Glabra</i>	Rio de Janeiro, Brasil	2-4	20-40 × 28-60	18-40 × 3-6 (0-1-septos)	25-65 × 5-7 (2-4 septos)	Este trabalho

Bougainvillea.

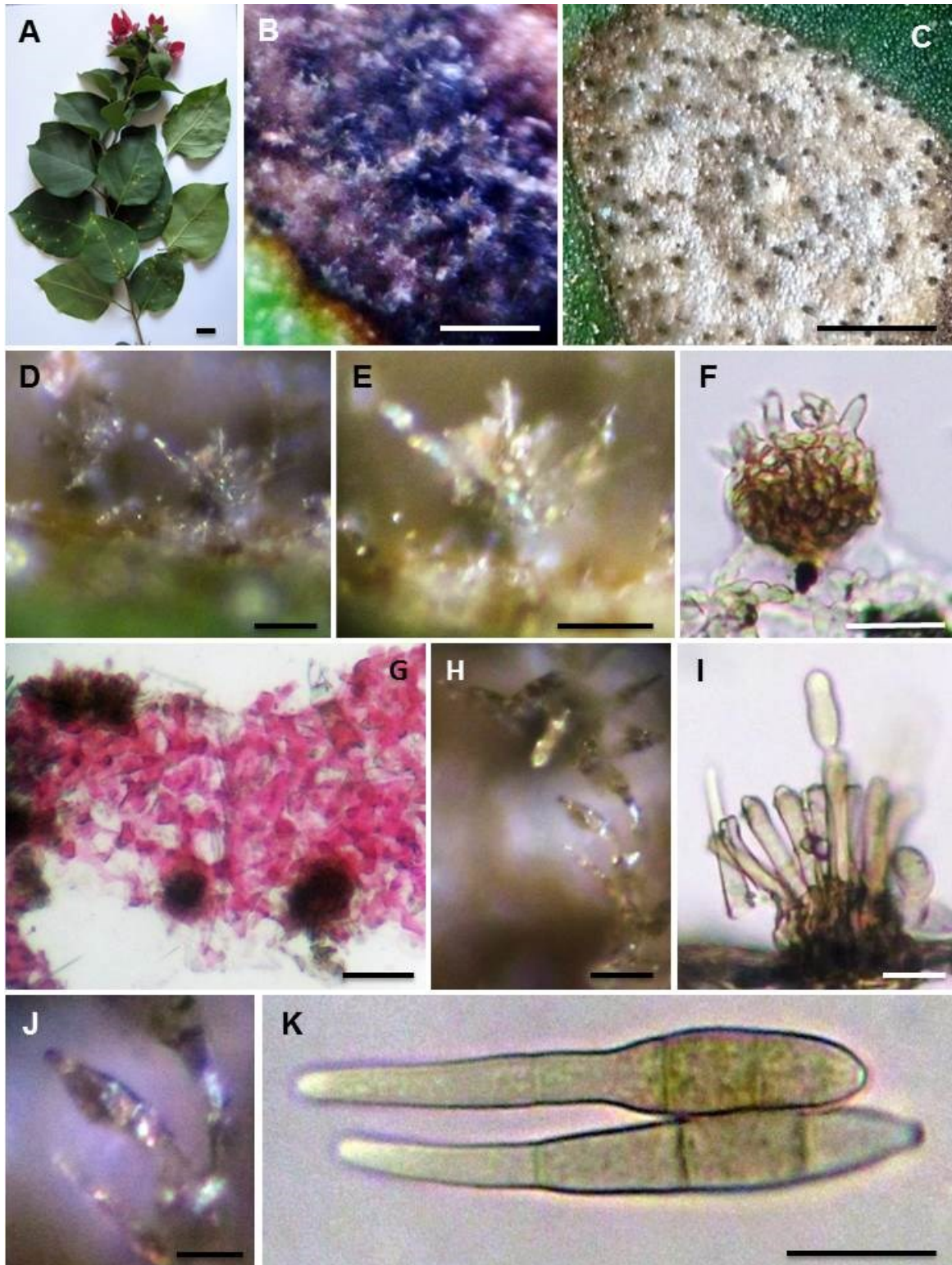


Figura 10. A-M: *Pluripassalora* sp. em folhas de em folhas de *Bougainvillea glabra* L. (*Nyctaginaceae*). A-D: Sintomas (Barras = A: 30 cm; B: 5 cm; C: 5 mm; D: 1 mm). E-F: Conidióforos e esporodóquio vistos ao microscópio óptico no aumento de 10 e 20x (Barras = E: 50 μ m; F: 20 μ m). G-I: Estruturas irrompetes vistas ao microscópio eletrônico de varredura (Barras G = 500 μ m; H = 100 μ m; I = 50 μ m). Estruturas anfigenas (Barra = 50 μ m). J: Estruturas anfigenas (Barra = 30 μ m). k: Grupo de conídios (Barra = 15 μ m). K-M: Conídio solitário (Barra = 15 μ m).

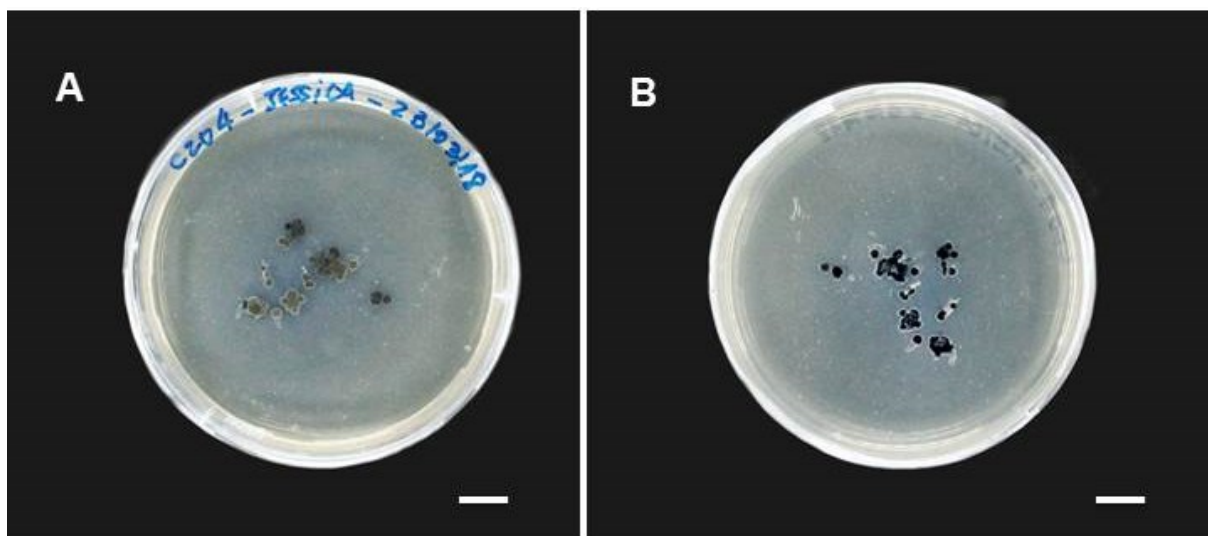


Figura11. A- B: *Pluripassalora* sp. em meio de cultura BDA a $\pm 25^{\circ}\text{C}$ / 15 dias (Barra = 1 cm).

4.5 Espécies do gênero *Pseudocercospora*

4.5.1 *Pseudocercospora* sp. em folhas de *Bixa orellana* L. (*Bixaceae*) (Fig. 12-13). Provável *Pseudocercospora bixae*.

Descrição: *Manchas foliares* 4-25 mm de diâmetro, inicialmente amarelas tornando-se castanho-claras a castanho-avermelhadas, irregulares, anfigenas. *Micélio* interno, hialino a marrom-claro, *hifas* 1-3 µm de diam. *Estromas* 15-35 × 25-48 µm, irrompentes, composto por *textura angularis*, *células* 2-7 µm de largura, marrons. *Conidióforos* 15-40 × 3-4 µm, castanho-claros, retos a sinuosos, 0-1-septos. *Células conidiogênicas* integradas, poliblasticas, maioria monoblasticas e usualmente terminais, simpodiais, geniculadas. *Conídios* 25-82 (100) × 2-4 µm, solitários, hialinos a pálidos, retos a sinuosos, atenuados na ponta e truncados na base, 2-8-septos.

Espécimes examinados: **Brasil:** Rio de Janeiro. Seropédica. Em folhas de *Bixa orellana* L. (*Bixaceae*) "Urucum". 14/09/2017. Col. Pedro Ivo de La Roque Martins 01 (UFRJ 12435). 22/09/2017. Col. Jessica Rembinski 29 (UFRJ 12544).

Discussão: *Cochlospermum vitifolium* (Wild.) Spreng. é uma planta da família *Bixaceae* com ocorrência no bioma Caatinga do Brasil, *Pseudocercospora cochlospermi* (R.E.D. Baker & W.T. Dale) U. Braun & Crous (CHUPP, 1954; BAKER; W.T. DALE, 1951; CROUS; BRAUN, 2003), foi reportada em local distinto e forma conídios maiores (15-110 × 1,5-3), conidióforos mais curtos (10-25 µm), diferindo de *P. bixae*, encontrada no Estado do Rio de Janeiro. A espécie encontrada em *Bixa orellana*, também já foi reportada em outros lugares do Brasil, porém, este é o primeiro relato com descrição para o Estado do Rio de Janeiro.

Tabela 8. Características de *Pseudocercospora* em folhas de *Bixa orellana* L. comparadas com espécies já descritas neste hospedeiro e da família *Bixaceae*.

Espécies	Hospedeiro	Local	Manchas (mm)	Estroma (µm)	Conidióforos (µm)	Conídios (µm)	Referências
<i>Pseudocercospora bixae</i>	<i>Bixa orellana</i>	Brasil	3-15	30 × 60	30-80 × 3-4 (1-3-septos)	30-130 × (2-)3-4 (3-10-septos)	Crous, Alfenas e Barreto (1997)
= <i>Cercospora bixae</i>	<i>B. orellana</i>	Brasil, Venezuela, Porto Rico, Jamaica, Formosa	3-15 Anfígenas	20-40	15-60 × 2,5-3,5	25-130 × 2-4	Chupp (1954)
= <i>Pseudocercospora bixicola</i>	<i>B. orellana</i>	Taiwan	3-15	20-60	15-40 × 2,5-4 (0-3-septos)	30-60 × 2-3 (3-6-septos)	Hsieh e Goh (1990); Guo e Hsieh (1995)
<i>Pseudocercospora cochlospermi</i> (= <i>Cercospora cochlospermi</i>)	<i>Cochlospermum vitifolium</i>	Trinidad, Venezuela	5-25	20-50	10-25 × 2-3,5	15-110 × 1,5-3	Chupp (1954); Baker e Dale (1951); Crous e Braun (2003); Mendes e Urben, (2017); Farr e Rossman (2014);
<i>Pseudocercospora</i> sp.	<i>Bixa orellana</i>	Rio de Janeiro, Brasil	4-25 Anfígenas	15- 35 × 25-48	15-40 × 3-4 (0-1-septos)	40-90 × 2-5 (2-10-septos)	Este trabalho

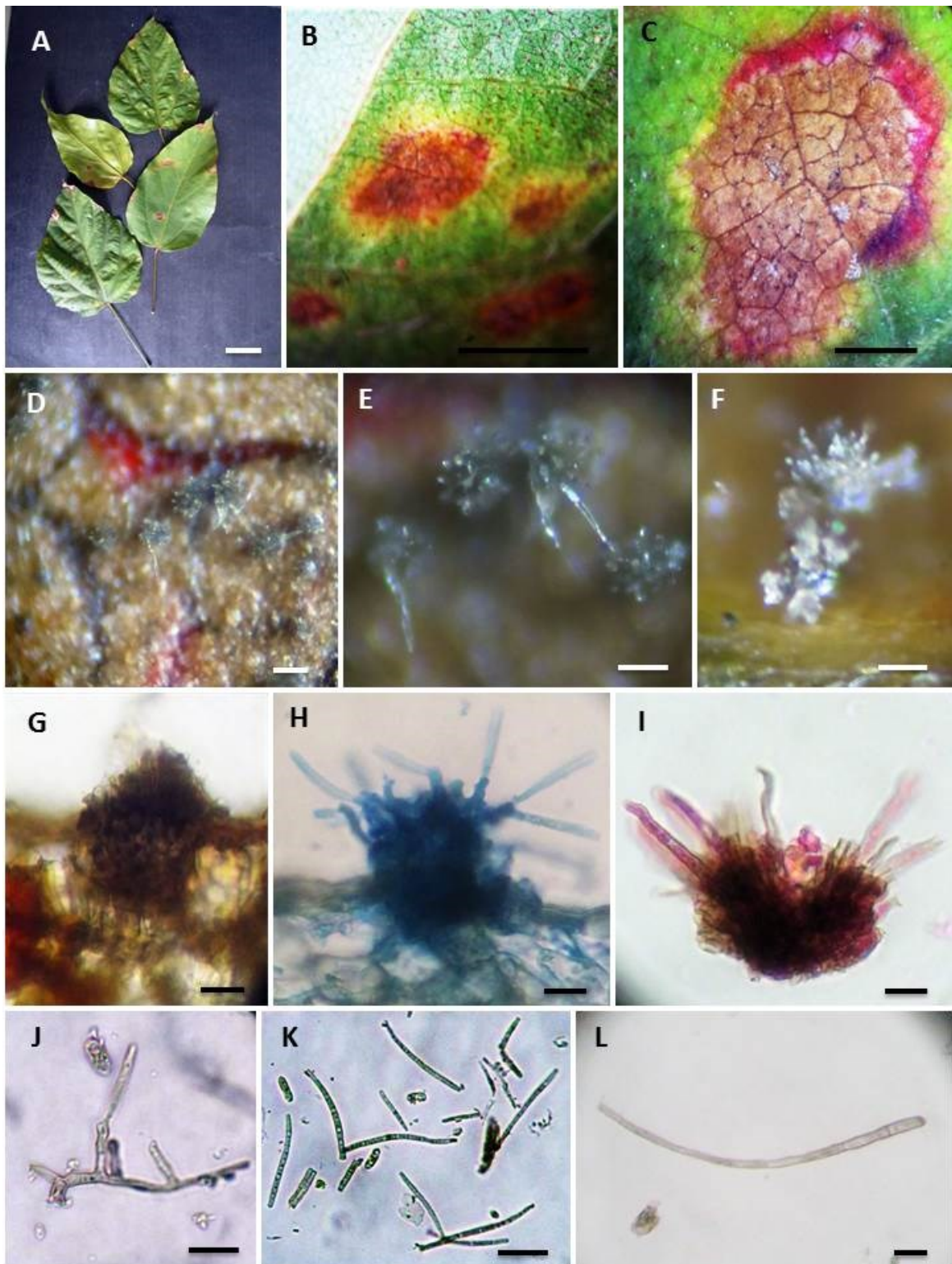


Figura 12. A-L: *Pseudocercospora* em folhas de *Bixa orellana* L (*Bixaceae*). A-C: Sintomas (Barras = A: 5 cm; B: 15 mm; C: 5 mm). D-F: conidióforos e conídios vistos ao microscópio óptico no aumento de 10 e 20 x (Barras = D: 50 μm; E: 10 μm; F: 15 μm). G-I: Estroma e conidióforos (Barra = 15 μm). J: Micélio secundário (Barra = 30 μm). K: Grupo de conídios (Barra = 20 μm). I: Conídio solitário (Barra = 20 μm).

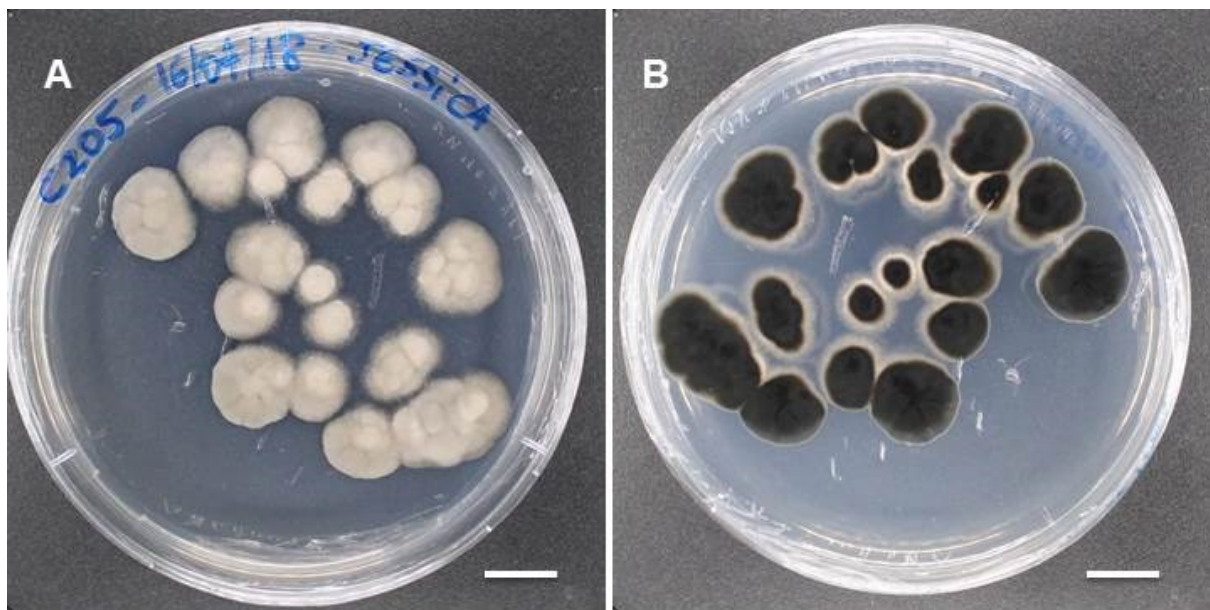


Figura 13. A- B: *Pseudocercospora* sp. em meio de cultura BDA a ± 25 °C/ 15 dias (Barra = 1 cm).

4.5.2 *Pseudocercospora* em folhas de *Canavalia ensiformis* (L.) DC. (*Fabaceae*) (Fig. 14-15). Provável espécie nova n° 4.

Descrição: *Manchas foliares* 5-10 mm de diâmetro, castanho-claras à castanho-avermelhadas, irregulares, anfigenas. *Micélio* interno, hialino a marrom-claro. *Micélio externo* presente. *hifas* 1-5 μm de diam. *Estromas* 10-18 \times 15-30 μm , irrompentos, subepidérmicos, compostos por *textura angularis*, *células* 4-7 μm de largura, marrons. *Conidióforos* 20-75 \times 4 μm , castanho-claros, retos a sinuosos. *Conídios* 43-82 \times 3-4 μm , hialinos a pálidos, retos a sinuosos, atenuados na ponta e truncados na base, 3-6-septos.

Espécime examinado: **Brasil:** Rio de Janeiro, Seropédica Fazendinha agroecológica km 47. Em folhas de *Canavalia ensiformis* (L.) DC "Feijão-de-porco". 13/12/2017. Col. Rafaela Menezes 02 (UFRJ 12620).

Discussão: Na tabela 11 a seguir, verifica-se que a espécie em estudo apresenta-se semelhanças com *Pseudocercospora canavaliigena* Yen & Lim (HSIEH; GOH, 1990; GUO; HSIEH, 1995), descrita no mesmo hospedeiro na China e Taiwan, apresenta conidióforos (20-70 \times 4-5 μm) muito próximos aos encontrados neste estudo, porém apresenta lesões hipófilas, estroma (Até 60 μm) e conídios (25-100 \times 4-5 μm) um pouco maiores. Já *Pseudocercospora cruenta* (Sacc) Deghton (HSIEH; GOH, 1990; GUO; HSIEH, 1995; BRAUN; FREIRE, 2004), apresenta lesões anfigenas e estroma pequeno o que se assemelha a espécie em estudo, porém apresenta conidióforos (10-70 \times 3-6 μm) e conídios (40-150 \times 2,5-5 μm) mais longos e mais largos. Esta espécie é relatada pela primeira vez no Estado e no Brasil.

Tabela 9. Características de *Pseudocercospora* em folhas de *Canavalia ensiformis* (L.) DC. encontrada no Estado do Rio de Janeiro, R.J. comparadas com espécies descritas no gênero *Canavalia*.

Espécie	Hospedeiro	Local	Lesão (mm)	Estroma (µm)	Conidióforos (µm)	Conídios (µm)	Referências
<i>Pseudocercospora canavaliigena</i>	<i>Canavalia ensiformis</i>	China, Taiwan	3-10 Hipófilas	Ate 60 largura	20-70 × 4-5 (1-4-septos)	25-100 × 4-5 (2-7-septos)	Hsieh & Goh (1990); Guo & Hsieh (1995)
<i>P. cruenta</i>	<i>C. glandiana</i> , <i>Canavalia</i> sp.	Brasil, China, Taiean	1-15 Anfígenas	pequeno	10-70 × 3-6 (0-3-septos)	40-150 × 2,5-5 (4-14-septos)	Hsieh & Goh (1990); Guo & Hsieh (1995); Braun e Freire (2004)
<i>Pseudocercospora</i> sp.	<i>Canavalia ensiformis</i>	Rio de Janeiro, Brasil	5-10 Anfígenas	10-18 × 15-30	20-75 × 4 (0-3-septos)	43-82 × 3-4 (3-6-septos)	Este trabalho

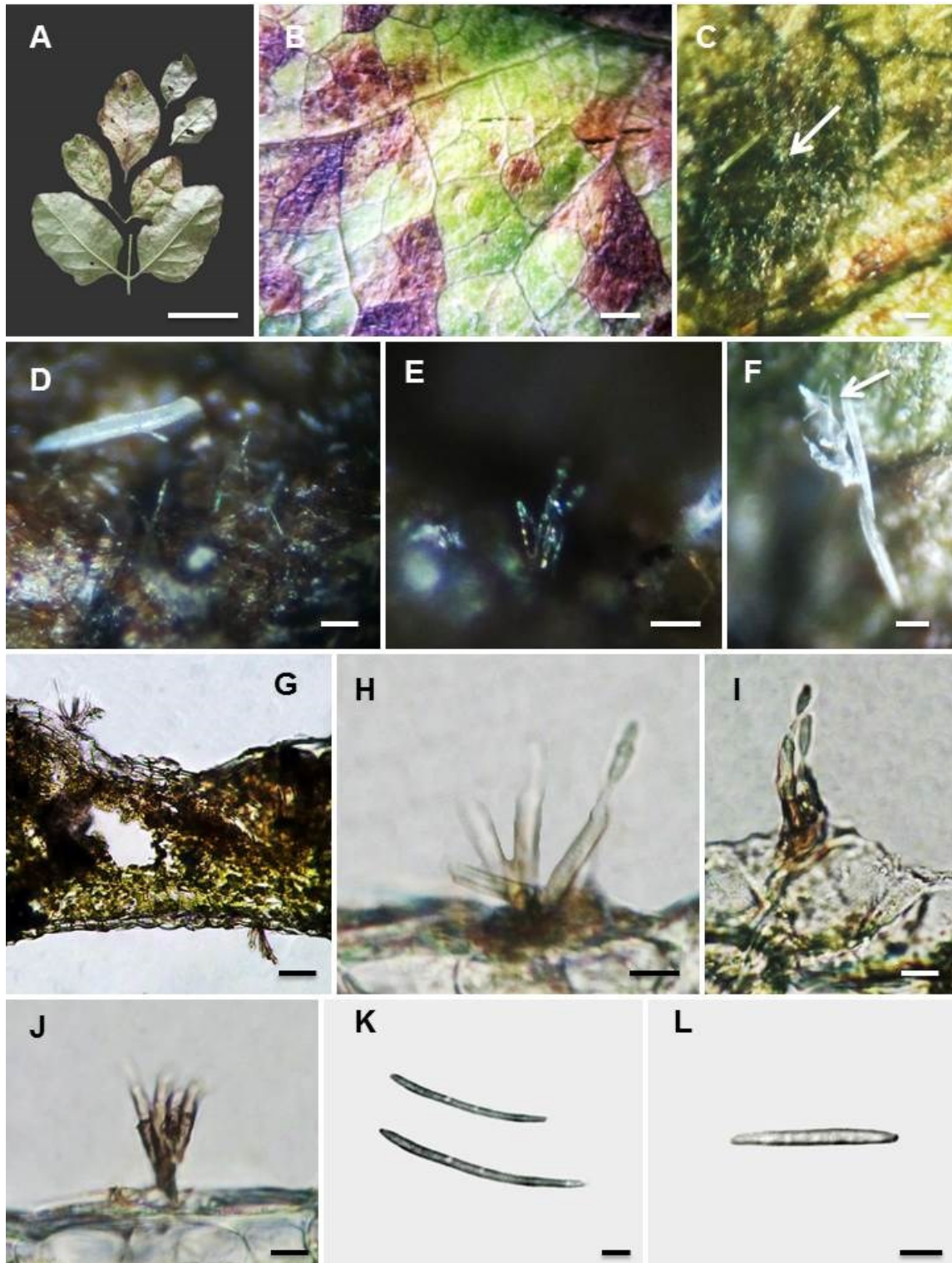


Figura 14. A-L: *Pseudocercospora* em folhas de *Canavalia ensiformis* (L) DC. (*Fabaceae*). A-C: Sintomas (Barras = A: 5 cm; B: 5 mm; C: 1 mm). D-F: Conidióforos e micélio secundário visto ao microscópio óptico no aumento de 10 e 20x (Barras = D-E: 30 μ m; F: 20 μ m). G: Estruturas anfigenas (Barra = 50 μ m). H-J: conidióforos e conídios (Barras = H: 30 μ m; I: 10 μ m; J: 30 μ m). K: Grupo de conídios (Barra = 5 μ m). L: Conídio solitário (20 μ m).

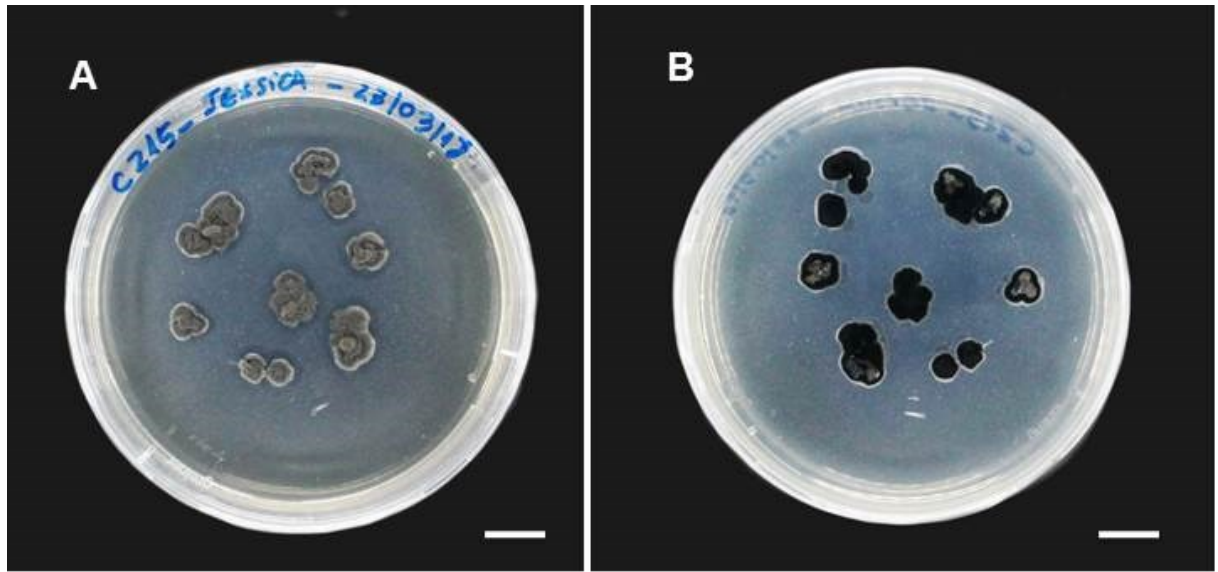


Figura 15. A-B: *Pseudocercospora* sp. em meio de cultura BDA a ± 25 °C/ 15 dias (Barra = 1 cm).

4.5.3 *Pseudocercospora* em folhas de *Centratherum punctatum* Cass. (Asteraceae) (Fig. 16). Provável espécie nova n° 5.

Descrição: *Manchas foliares* 3-15 mm diam, inicialmente como manchas amarelas tornando-se castanho-claras a marrom-avermelhadas, bastante irregulares, anfigenas. *Micélio interno*, incolor a castanho claro, ramificado; *hifas* até 4 mm de diâmetro. *Estromas* 25-45 × 25-65(-70) µm, irrompentes, composto por células de paredes marrons de 3-6 µm de diâmetro. *Conidióforos* 25-60 × 4 mm, castanho-claros, retos a sinuosos, 2-4-septos. *Conídios* 35-75 × 4 µm, incolores a pálidos, retos a sinuosos, atenuados no topo e truncados na base, 2-6-septos.

Espécime examinado: **Brasil:** Rio de Janeiro, Seropédica, DENF- Departamento de Entomologia e Fitopatologia/ UFRRJ. Em folhas de *Centratherum punctatum* Cass. (Asteraceae). 27/03/2017. Col. Jessica Rembinski 09 (UFRJ 12465).

Discussão: A espécie em estudo se aproxima de *Pseudocercospora chrysanthemicola* (DEIGHTON, 1976), em tamanho da lesão e conidióforos; mas apresenta conídios mais longos (30-115 × 3-5 µm). As outras espécies se aproximam dos valores obtidos para este estudo, mas diferem por apresentarem cicatrizes conspícuas caracterizando-as no gênero *Cercospora*. Logo, a espécie aqui estudada trata-se provavelmente de uma nova espécie, sendo relatada pela primeira vez no Estado do Rio de Janeiro.

Tabela 10. Características de *Pseudocercospora* em folhas de *Centratherum punctatum* Cass. encontrada no Estado do Rio de Janeiro comparadas com as espécies descritas no gênero *Centratherum*.

Espécies de Cercosporóides	Hospedeiro	Local	Mancha (mm)	Estroma (µm)	Condióforos (µm)	Conídios (µm)	Referências
<i>Cercospora chrysanthemi</i>	<i>Centratherum anthelminticum</i>	Bangalore, India	Circular a irregular, coalescendo com cada mancha de cor marrom escura.	Poucas células de cor marrom escuro	60-150 × 3-5 (1-4-septos)	33 -130 × 3 - 4,2 (1-20-septos)	Govindu e Thirumalachar (1954)
<i>Cercospora chrysanthemi</i>	<i>Chrysanthemum</i> sp., <i>C. indicum</i> , <i>C. balsamita</i> , <i>C. coronarium</i> , <i>C. maximum</i> , <i>C. segetum</i>	USA, America do sul, Japao, Formosa, Fillippinas, China	3 - 6	pequeno	20-80(200) × 3,5-5	40 -125(200) × 2-4	Chupp (1954)
<i>Cercospora chrysanthemi</i>	<i>Chrysanthemum</i> sp.	Texas, USA	2 - 10	-	40-75 × 4	40 - 120 × 4	Heald e Wolf (1911)
<i>Cercosporina chrysantemi</i>	<i>C. indicum</i>	Rio de Janeiro, Brasil	Maculis rotundato effusis, anphigenis, exaridis, in apicibus lobos foliorum initio	-	80-140 × 4-5 (3-5-septos)	90 -180 × 3 - 4 (10-18-septos)	Saccardo (1931)
<i>Pseudocercospora chrysanthemicola</i>	<i>Chrysanthemum Morifolium</i>	Taiwan, China	4 -15	Ate 35	20-50 × 3-5 (0-4-septos)	30-115 × 3-5	Deighton (1976)
= <i>Cercospora chrysanthemicola</i>	<i>C. sinense</i>	Singapura	4 - 9	27 × 25	22-38 × 2-4	32-107 × 2-5	Yen (1964)
<i>Pseudocercospora</i> sp.	<i>Centratherum punctatum</i>	Rio de Janeiro, Brasil	3 - 15	25 - 45 × 25-65 (-70)	25-60 × 4 (2-4-septos)	35-75 × 4 (2-6-septos)	Este trabalho

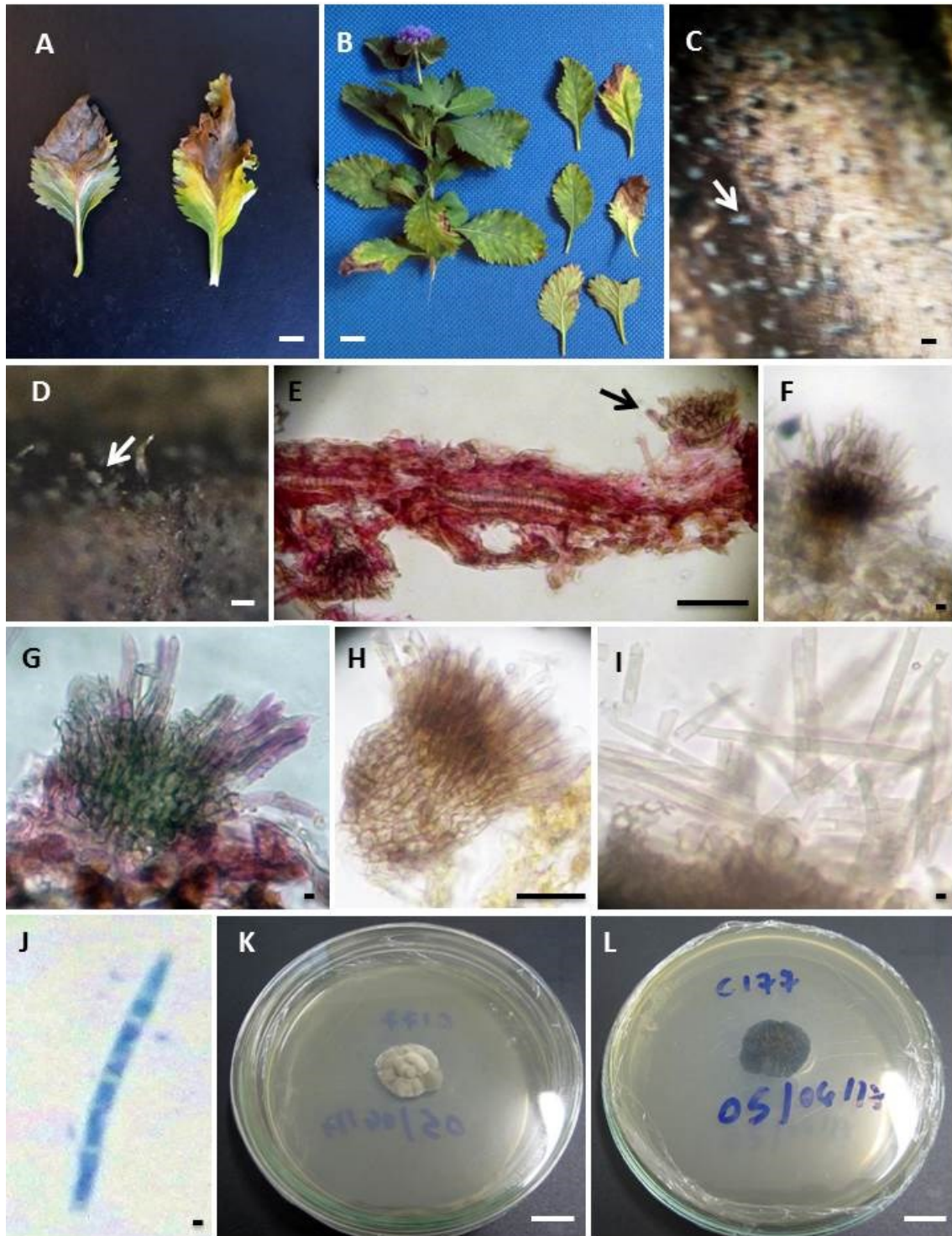


Figura 16. A-L: *Pseudocercospora* em folhas de *Centratherum punctatum* Cass. (*Asteraceae*). A-D: Sintomas e estruturas vistas sob a folha através de microscópio estereoscópico (Barras = Barras = A-B: 1 cm; C:10 mm; D:50 μ m). E: Estruturas anfigenas (Barra = 50 μ m). F-H: Estroma e conidióforos (Barras = F-G: 1 μ m; 30 μ m). I: Grupo de conídios (Barra = 1 μ m). J: Conídio solitário (Barra = 1 μ m). K-L: *Pseudocercospora* em meio de cultura BDA 25 °C/ 15 dias (Barras = 1 cm).

4.5.4 *Pseudocercospora* em folhas de *Crotalaria incana* L. (*Fabaceae*) (Fig. 17-18). Provável espécie nova nº 6.

Descrição: *Manchas foliares* 3-6 mm diâmetro, inicialmente como manchas amarelas tornando-se castanho-claras a acinzentadas, bastante irregulares, epífilas. *Micélio interno*, incolor a castanho claro, ramificado; *hifas* até 2-4 μm de diâmetro. *Estromas* 10-20 \times 10-22 μm , subepidermais, irrompentes, composto por células de paredes marrons de 4-8 μm de diâmetro. *Conidióforos* 24-40 \times 3-4 μm , castanho-claro, direito a sinuoso, 2-4-septos. *Células conidiogênicas* integradas, com *loci* conidiogênico inconspícuos. *Conídios* 42-102 \times 4 μm , solitários, hialinos a pálidos, retos a sinuosos, atenuados no ápice e truncados na base, 1-10-septos.

Espécimes examinados: **Brasil:** Rio de Janeiro. Seropédica. DENF- Departamento de Entomologia e Fitopatologia/ UFRRJ. Em folhas de *Crotalaria incana* L. (*Fabaceae*). 12/10/2017. Col. Pedro Ivo de la Roque Rodrigues Martins 05 (UFRJ 12576); 13/12/2017. Col. Jonas Dias de Almeida 43 (UFRJ 12619).

Discussão: Verifica-se na tabela 13, a comparação morfológica entre as algumas espécies descritas em *crotalaria* e a espécie em estudo. *Pseudocercospora cotizensis* (Mull. & Chupp) Deighton (BRAUN & FREIRE, 2004. HSIEH & GOH, 1990; URTIAGA, 2004), descrita em *Crotalaria incana*, e *Crotalaria pallida*, apresentando estroma presente e pequeno, conidióforos (75 \times 3,5-6 μm) maiores e mais largos e conídios (20-80 \times 3-5 μm) menores e mais finos, apresenta lesões hipófilas. *Pseudocercospora crotalariicola* Yen (GOH; HISIEH, 1990; GUO & HISIEH, 1995) se diferencia da espécie em estudo por não apresentar estroma, possuir lesões anfigenas e por possuir conidióforos secundários. *Pseudocercospora leguminum* (DEIGHTON, 1976; CROUS; BRAUN, 2003; GUO; HISIEH, 1995), apresenta estroma ausente, lesões hipófilas e conidióforos extremamente maiores que a espécie encontrada neste estudo. Os dados morfológicos indicam que a espécie encontrada em *Croton lobatus* trata-se provavelmente uma nova espécie. Sendo o primeiro relato para o Estado do Rio de Janeiro.

Tabela 11. Características de *Pseudocercospora* em folhas *Crotalaria incana* L. (*Fabaceae*) comparada com as espécies já descritas no gênero *Crotalaria*.

<i>Espécies</i>	Hospedeiro	Local	Lesão (mm)	Estroma (µm)	Conidióforos (µm)	Conídios (µm)	Referências
<i>Pseudocercospora cotizensis</i>	<i>Crotalaria incana</i> , <i>C. pallida</i>	Cuba, Brasil, China, Taiwan.	2-7 Hipófilas	Pequeno	75 × 3,5-6 (0-2-septos)	20-80 × 3-5 (3-9-septos)	Braun e Freire (2004); Hsieh e Goh (1990); Urtiaga (2004).
<i>P. crotalariicola</i>	<i>C. mucronata</i>	China, Taiwan	Anfígenas	Ausente	Primário: 36-149 × 4,8-7,8(1-5-septos) Secundário 36-48 × 4,5-7(1-3-septos)	10-134 × 3,5-5 (5-12-septos)	Hsieh e Goh (1990); Guo e Hsieh (1995).
<i>P. leguminum</i>	<i>Crotalaria</i> sp.	China	Hipófilas	ausente	300 × 3,5-5,5	24-44 × 5,5-7	Deighton (1976); Crous e Braun (2003); Guo e Hsieh (1995).
<i>Pseudocercospora</i> sp.	<i>Crotalaria incana</i>	Rio de Janeiro, Brasil	3-6 Epífilas	10-20 × 10-22	24-40 × 3-4 (2-4-septos)	42-102 × 2-4 (1-10-septos)	Este trabalho

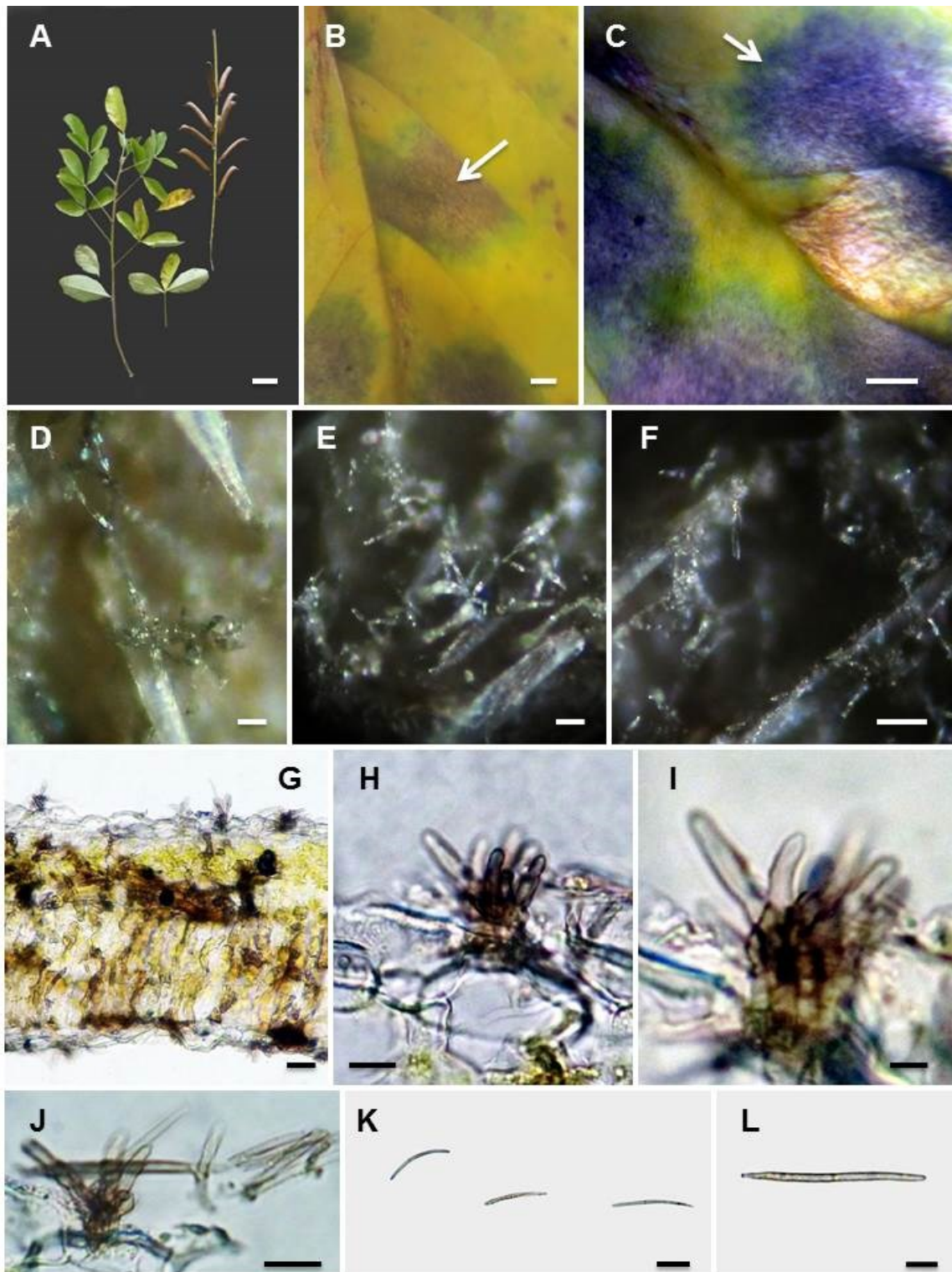


Figura 17. A-L: *Pseudocercospora* em folhas de *Crotalaria incana* L. (*Fabaceae*). A-C: Sintomas (Barras = A: 5 cm; B-C: 1 mm). D-F: Conidióforos, conídios e micélio secundário vistos ao microscópio óptico no aumento de 10 e 20x (Barras = 10 μ m; 20 μ m). G: estruturas epífilas (Barra: 20 μ m). H-J: Conidióforos (Barras = H: 10 μ m; I: 5 μ m; J: 10 μ m). K: Grupo de conídios (Barra = 20 μ m). L: Conídio solitário (Barra = 10 μ m).

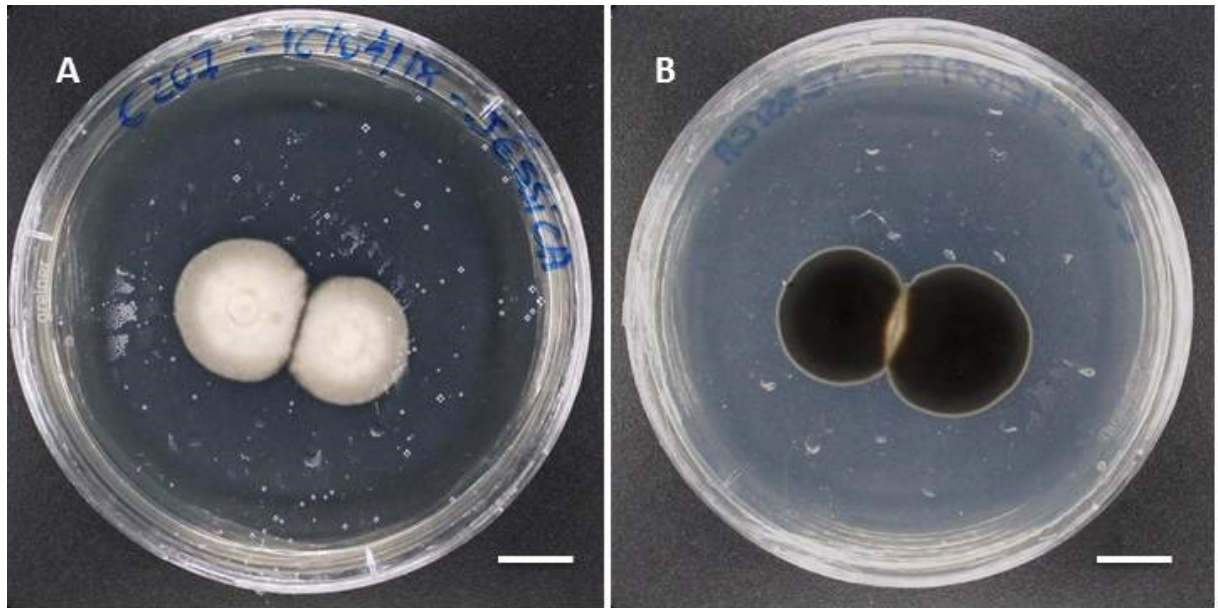


Figura 18. A-B: *Pseudocercospora* sp. em meio de cultura BDA a ± 25 °C/ 15 dias (Barra = 1 cm).

4.5.5 *Pseudocercospora* em folhas de *Croton lobatus* L. var. *lobatus* (*Euphorbiaceae*) (Fig. 19-20). Provável espécie nova n° 7.

Descrição: *Manchas foliares* 2-5 mm diâmetro, inicialmente como manchas amarelas tornando-se castanho-claras a marrom, bastante irregulares, anfigenas. *Micélio* interno, incolor a castanho claro, ramificado; *hifas* 2-5 µm de diâmetro. *Estromas* 10-20 × 10-22 µm, irrompentes, composto por células de paredes marrons de 3-8 µm de diâmetro. *Conidióforos* 21-45 × 4-7 µm, castanho-claro, reto a sinuoso. *Conídios* 35-90 × 4-6 µm, solitários, incolores a pálidos, retos a sinuosos, atenuados no ápice e truncados na base, 2-7-septos.

Espécimes examinados: **Brasil:** Rio de Janeiro, Seropédica, DENF- Departamento de Entomologia e Fitopatologia/ UFRRJ. Em folhas de *Croton lobatus* L. var. *lobatus* (*Euphorbiaceae*) “Café bravo”. 03/11/2017. Col. Jonas Dias de Almeida 31 (UFRJ 12589). 13/12/2017. Col. Jonas Dias de Almeida 44 (UFRJ 12621). 20/03/2018. Jessica Rembinski 40 (UFRJ 12651). 20/03/2018. Jessica Rembinski 42 (UFRJ 12653)

Discussão: Na tabela 16 são demonstradas as comparações entre as espécies presentes neste hospedeiro e no mesmo gênero, sendo apenas uma espécie de *Pseudocercospora* relatada neste hospedeiro e no Brasil no estado do Ceará muito próxima da espécie em estudo, porem apresenta lesões hipófilas: *Pseudocercospora tiglii* (= *Cercospora tiglii*) (BRAUN;FREIRE, 2002; CHUPP, 1954) descritas em *Croton lobatus* L, *Croton glandulosus*, *Croton tiglium*, apresentam lesões hipófilas, apresenta estroma pequeno, conidióforos (10-75 × 3-7 µm) pouco mais longos e mais finos, e conídios (20-110 × (3,5) 2,5 -5 µm) pouco maiores e mais largos. As outras espécies presentes no genero *Croton* são descritas por Chupp (1954) no gênero *Cercospora*, diferenciadas pela presença de cicatriz e por apresentar características morfológicas distintas. Estudos moleculares futuros serão realizados a fim de elucidar as informações aqui prestadas, corroborando para afirmação de que a espécie aqui relatada pela primeira vez no Estado do Rio de Janeiro trata-se de uma nova espécie.

Tabela 12. Características de *Pseudocercospora* em folhas de *Croton lobatus* L. var. *lobatus* comparadas com espécies já descritas no gênero *Croton*.

Espécies	Hospedeiro	Local	Lesão (mm)	Estroma (µm)	Conidióforos (µm)	Conídios (µm)	Referências
<i>Pseudocercospora tiglii</i>	<i>Croton lobatus</i> L.	Ceara Brazil	-	-	-	20-110 × 2,5-5 (2-10-septos)	Braun e Freire (2002)
= <i>Cercospora tiglii</i>	<i>C. lobatus</i> L., <i>C. glandulosus</i> , <i>C. tiglium</i>	Filipinas	2-6 Hipófilas	Pequeno	10-75 × 3-7	20-85 × 3,5-5,5	Chupp (1954)
<i>Cercospora crotonifolia</i>	<i>C. glandulosus</i>	EUA	2-4 Epífilas	Pequeno	7-30 × 3-4,5	15-55 × 2,5-5 (3-8-septos)	Chupp (1954)
<i>Cercospora crotonophila</i>	<i>Croton</i> sp.	Paraguai	1-4 Anfígenas	20-50	15-40 × 3-5	20-100 × 2,5-5 (3-10-septos)	Chupp (1954)
<i>Pseudocercospora</i> sp.	<i>Croton lobatus</i> L.	Rio de Janeiro, Brasil	2-5 Anfígenas	10-20 × 12-35	21-45 × 4-7 (2-4-septos)	35-90 × 4-6 (2-7-septos)	Este Trabalho

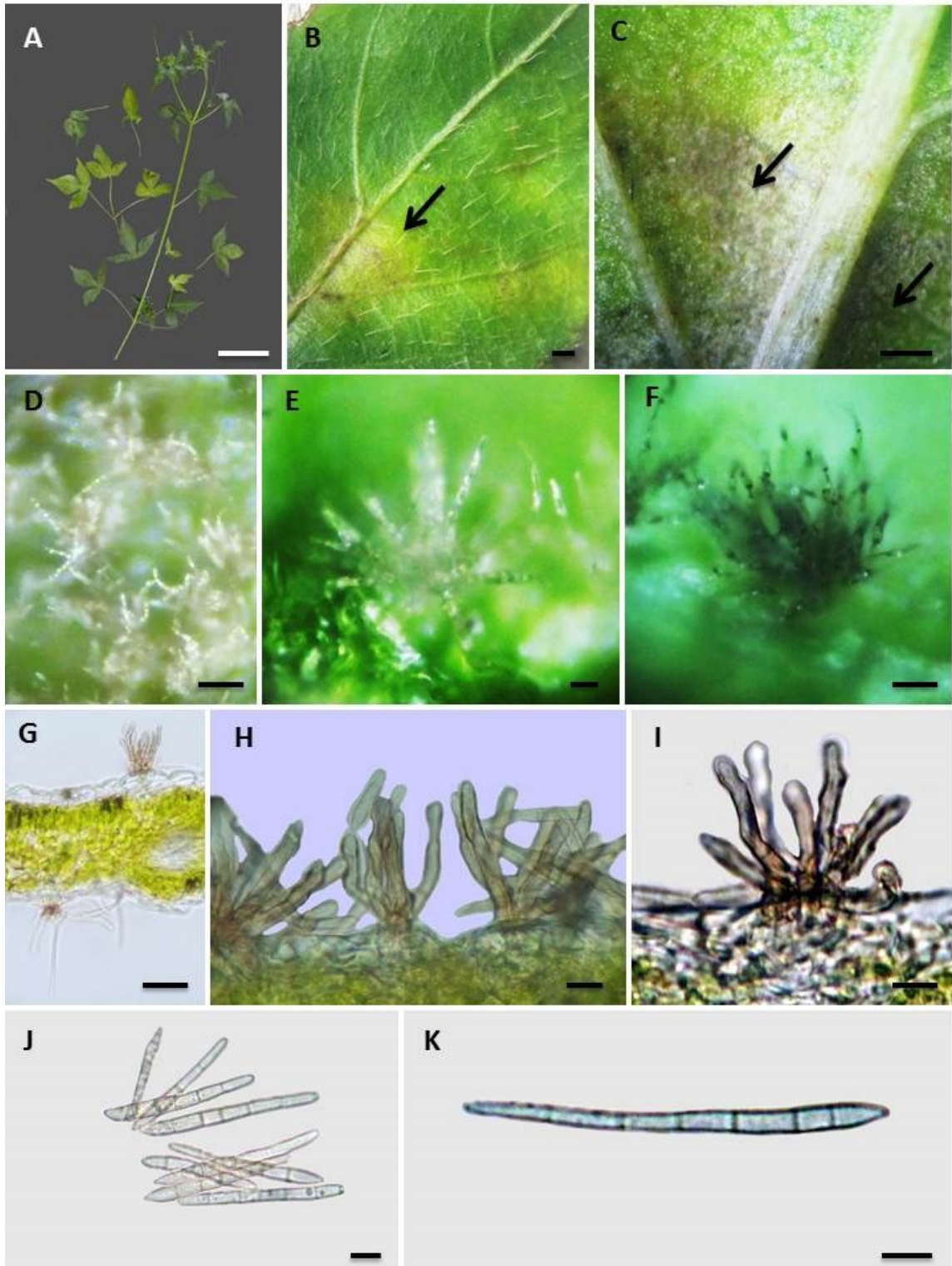


Figura 19. A-K: *Pseudocercospora* em folhas de *Croton lobatus* L. var. *lobatus* (*Euphorbiaceae*). A-C: Sintomas (Barras = A: 5 cm; B: 1 mm). D-F: Conidióforos vistos no microscópio óptico no aumento de 10 e 20x (Barras = D: 10 μ m, E: 10 μ m; F: 50 μ m). G: Estruturas anáfigenas (Barra = 50 μ m). H-I: Conidióforos (Barras = 10 μ m). J: grupo de conídios (Barra = 10 μ m). K: conídio solitário (Barra = 10 μ m).

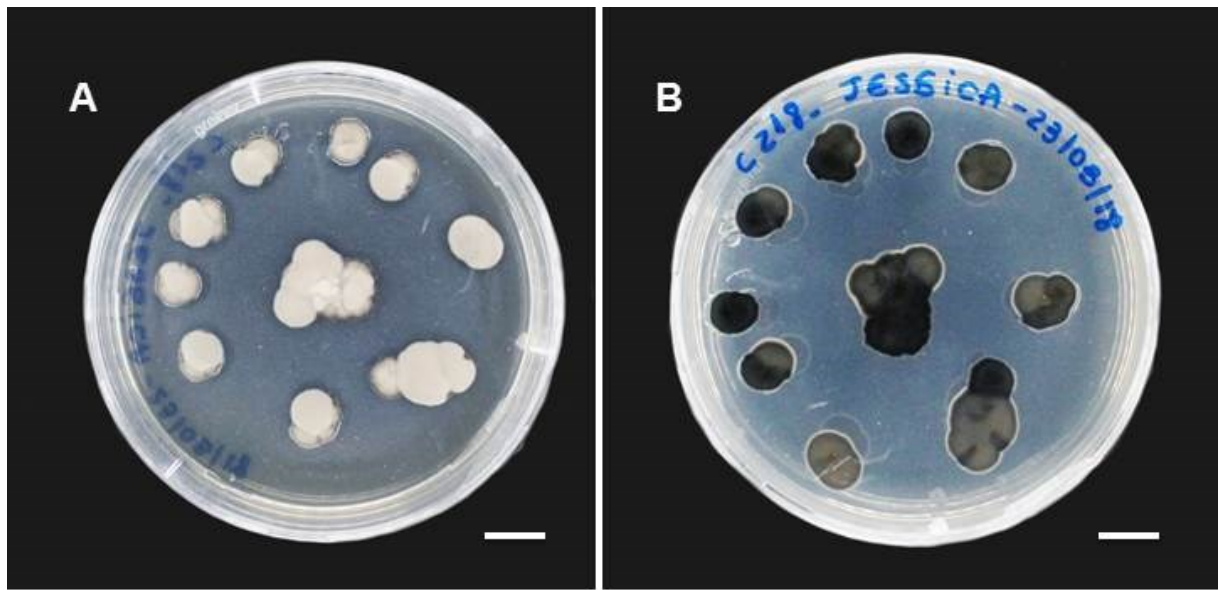


Figura 20. A-B: *Pseudocercospora* sp. em meio de cultura BDA a ± 25 °C/ 15 dias (Barra = 1 cm).

4.5.6 *Pseudocercospora* em folhas de *Eucalyptus grandis* L. (Myrtaceae) (Fig. 21-22). Provável espécie nova nº 8.

Descrição: *Manchas foliares* 2-15 mm diâmetro, manchas pequenas, escuras, marrom escuro a pretas, irregulares, coalescentes, epífilas. *Micélio* interno, incolor a castanho claro, ramificado; *hifas* 1-2 μm de diâmetro. *Estromas* 10-28 \times 15-40 μm , irrompentes, compostos por células de paredes marrons de 3-5 μm de diâmetro. *Conidióforos* 25-60 \times 4 μm , castanho-claro, reto a sinuoso. *Conídios* 30-70 \times 2-3 μm , solitários, incolores a pálidos, retos a sinuosos, atenuados no topo e truncados na base, 3-7-septos.

Espécimes examinados: **Brasil:** Rio de Janeiro, Seropédica. Em folhas de *Eucalyptus grandis* L. (Myrtaceae). 03/12/2017. Col. Yuji Ito Nunes 16 (UFRJ 12609). 17/04/2018. Yuji Ito Nunes 17 (UFRJ 12654). 17/04/2018. Col. Yuji Ito Nunes 18 (UFRJ 12655). 17/04/2018. Yuji Ito Nunes 19 (UFRJ 12657).

Discussão: Algumas espécies de *Pseudocercospora* já descritas foram comparadas com a espécie deste estudo (tabela 17), todas as espécies apresentam lesões anfigenas diferentemente da espécie deste estudo. Sendo 4 delas semelhantes morfologicamente a ela, porem com algumas pequenas diferenças descritas a seguir. *Pseudocercospora eucalyptorum* (BRAUN; DICK, 2002), descrita em *Eucalyptus nitens*, apresenta conidióforos (10–60 \times 2,5–6 μm) e conídios (15–70 \times (2)3–4(4,5) μm) um pouco mais longos e mais largos. *Pseudocercospora pseudobasitruncata* (BRAUN; DICK, 2002) descrita em *Eucalyptus nitens*, apresenta conidióforos (10-70 \times 4–7 μm) e conídios (40–100 \times 4–7 μm) um pouco mais longos e mais largos, e o estroma (10–35 μm) um pouco menor que a espécie em estudo. *Pseudocercospora eucalypti* (GOH; HISIEH, 1990; GUO; HSIEH, 1995) descrita em *Eucalyptus globulus*, apresenta estroma (15-50 μm) muito próximo da espécie em estudo, porem conidióforos (8,5-50 \times 3-4 μm) mais curtos e conídios [30-60(85) \times 2-4 μm] um pouco mais longos e mais largos. *Pseudocercospora eucalyptigena* (BRAUN, 2001) descrita em *Eucalyptus citriodora*, apresenta estroma (10-30 μm) um pouco menor, conidióforo (10-45 \times 2-4 μm) mais curtos e conídios [(40-)60-100(-120) \times 2-3 μm (4)6-10(-12)-septos] maiores porém, de mesma largura. Embora sejam semelhantes possuem características distintas assim como o hospedeiro, corroborando para que a espécie em questão seja provavelmente uma nova espécie.

Tabela 13. Características de *Pseudocercospora* em folhas de *Eucalyptus grandis* L. encontradas no Rio de Janeiro, comparadas com espécies descritas no gênero *Eucalyptus* de outros locais.

Espécies	Hospedeiro	Local	Lesão (mm)	Estroma (µm)	Conidióforos (µm)	Conídios (µm)	Referências
<i>P. acerosa</i>	<i>Eucalyptus baxteri</i> : <i>E. nitens</i>	Nova Zelandia	1-10 anfigenas	10-60	20-220 × 3-8	40-180 × (2,5)3-5,5(6) (4-15-septos)	Braun e Dick (2002)
<i>P. eucalyptorum</i>	<i>E. nitens</i>	Nova Zelandia	0,5-7 Anfigenas	10-200	10-60 × 2,5-6 (0-3-septos)	15-70 × (2)3-4(4,5) (1-8-septos)	Braun e Dick (2002)
<i>P. pseudobasitruncata</i>	<i>E. nitens</i>	Nova Zelandia	1-10 anfigenas	10-35	10-70 × 4-7 (0-4-septos)	40-100 × 4-7 (3-10-septos)	Braun e Dick (2002)
<i>P. Chiangmaiensis</i>	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Tailandia	2-6 anfigenas	25-70 × 30-70	-	(40) 50-60 (100) × (2) 2.5-3 (3.5) [(2)3-5(10)-septos]	Cheewangkoon, <i>et al.</i> (2008)
<i>P. Crispans</i>	<i>Eucalyptus</i> sp.	Africa do Sul	2-15 anfigenas	40-120	(14)17-31(42) × (2)3-4(5) (0-4-septos)	(40)65-96(102) × (2)3(4) (3-9-septos)	Crous <i>et al.</i> (2013).
<i>P. Crousii</i>	<i>Eucalyptus</i> sp.	Nova Zelandia	1-15 anfigenas	10-30	5-100 × 2,5-5,5	(20)35-115(140) × 3-5 (4-10-septos)	Braun e Dick (2002)
<i>P. Eucalypti</i>	<i>E. globulus</i>	China, Taiwan	2-6 Anfigenas	15-50	8,5-50 × 3-4 (0-3-septos)	30-60(85) × 2-4 (3-6-septos)	Goh & Hisieh (1990); Guo & Hsieh (1995)
<i>P. eucalyptigena</i>		Australia	1-4 anfigenas	10-30	10-45 × 2-4 (0-2-septos)	(40)60-100(120) × 2-3 (4)6-10 (12)-septos)	Braun (2001)
<i>P. norchiensis</i>	<i>Eucalyptus</i> sp.	Italia	2-6 Anfigenas	90 × 160	40-70 × 4-7 (3-5-septos)	(50)80-120 (140) × (5) 6 (7) [(0-) 5-9 (12)-septos]	Crous <i>et al.</i> (2007)
<i>Pseudocercospora</i> sp.	<i>Eucalyptus grandis</i> L.	Rio de Janeiro, Brasil	2-15 Epifilas	10-28 × 15-40	11-40 × 2-3 (2-4-septos)	30-70 × 2-3 (3-7-septos)	Este Trabalho

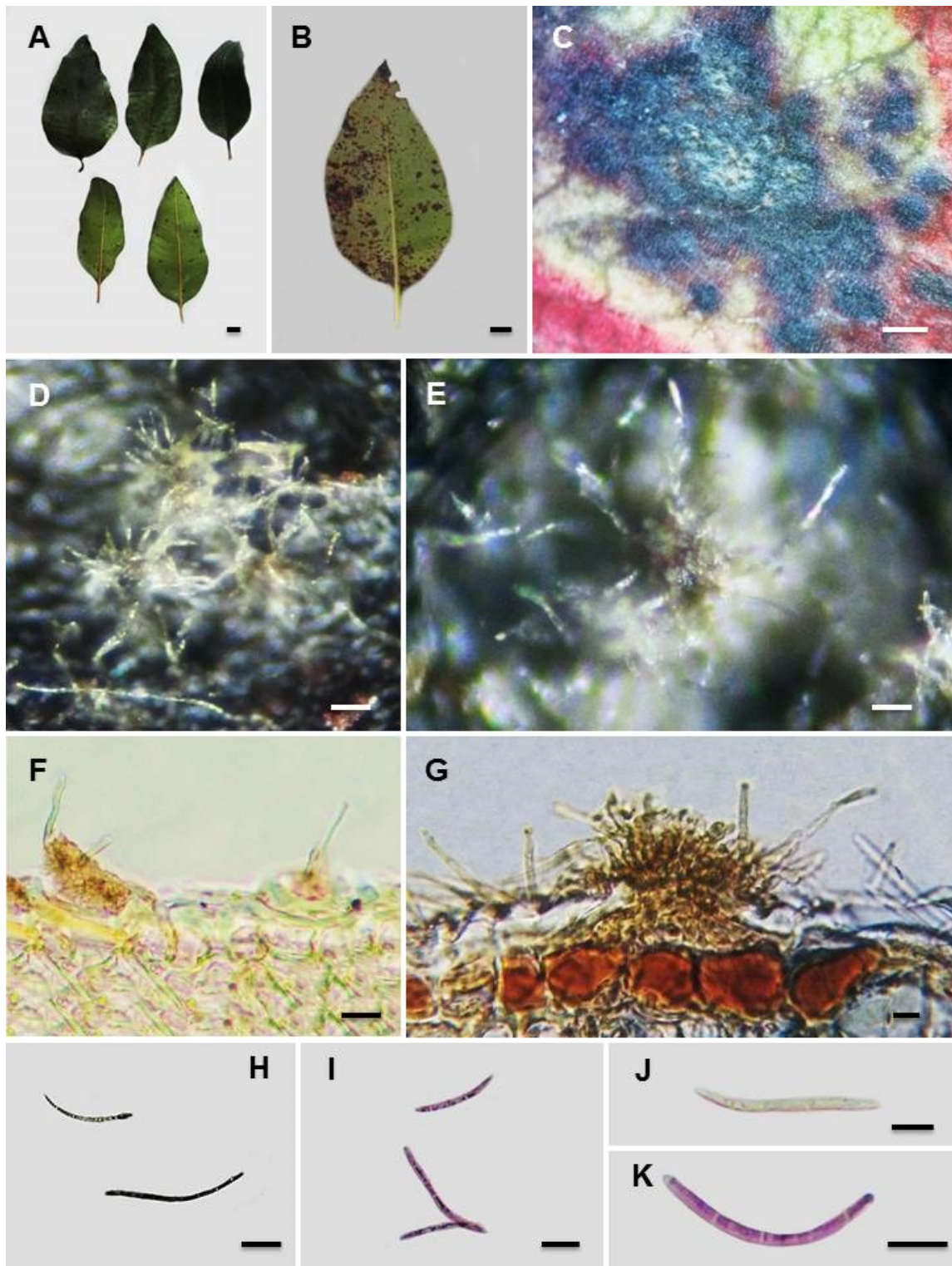


Figura 21. A-K: *Pseudocercospora* em folhas de *Eucalyptus grandis* L. (*Myrtaceae*). A-C: Sintomas (Barras: A-B: 1 cm; C: 1 mm). D-E: Conidióforos e conídios vistos ao microscópio óptico no aumento de 10 E 20x (Barra = 20 μ m). F: Estroma emergindo do estômato da planta (Barra = 15 μ m). G: Estroma e conidióforos (Barra = 5 μ m). H-I: Grupo de conídios (Barras = H 20 μ m; I: 10 μ m). J-K: Conídio solitário (Barra = 10 μ m).

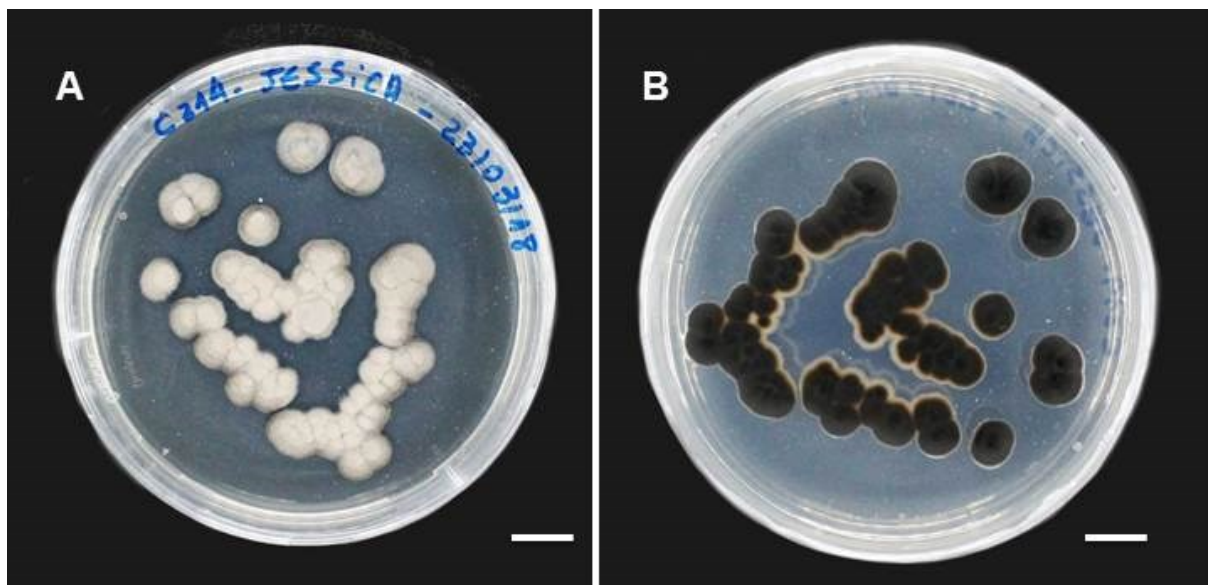


Figura 22. A-B: *Pseudocercospora* sp. em meio de cultura BDA a ± 25 °C/ 15 dias (Barra = 1 cm).

**4.5.7 *Pseudocercospora* em folhas de *Phaseolus vulgaris* L. (*Fabaceae*)(Fig. 23-24).
Provável espécie nova n° 9.**

Descrição: *Manchas foliares* 5-25 mm diâmetro, manchas amarelas tornando-se castanho-claras a marrom-avermelhadas, bastante irregulares, coalescentes, anfígenas. *Micélio* interno, incolor a castanho claro, ramificado; *hifas* 2-4 μm de diâmetro. *Estromas* 25-40 \times 30-65 μm , irrompentes, composto por células de paredes marrons de 4-6 μm de diâmetro. *Conidióforos* 25-95 \times 4-5 μm , não ramificados, castanho-claro, reto a sinuoso, 0-2-septos. *Conídios* 20-100 \times 3-4 (5) μm , solitários, incolores a pálidos, retos a sinuosos, atenuados no topo e truncados na base, 1-9-septos.

Espécime examinado: **Brasil:** Rio de Janeiro, Seropédica, Bairro INCRA. Em folhas de *Phaseolus vulgaris* L. (*Fabaceae*) “Feijão comum”. 29/09/2017. Col. Jucimar Moreira de Oliveira 37 (UFRJ 12549). 02/0/2017. Col. Jucimar Moreira de Oliveira 39 (UFRRJ 12568).

Discussão: Na tabela 18 estão listadas as espécies já reportadas no gênero *Phaseolus*, onde *Pseudocercospora cruenta* é a espécie que mais se aproxima da espécie em estudo: *Pseudocercospora cruenta* (GUO; HISIEH, 1995; MENDES; DA SILVA; DIANESE *et al.* 1998) descrita em *Phaseolus* sp. e *Phaseolus vulgaris*, apresentando lesões anfígenas, conidióforos (10-70 \times 3-6 μm) um pouco mais curtos e conídios (40-150 \times 2,5-5 μm) um pouco mais longos e mais largos, mas com estroma pequeno e pouco desenvolvido diferentemente da espécie em estudo. sendo este o primeiro relato deste fungo para o estado do Rio de Janeiro, tratando-se provavelmente de uma nova espécie.

Tabela 14. Características de *Pseudocercospora* em folhas de *Phaseolus vulgaris* L. comparada com espécies descritas no gênero *Phaseolus*.

Espécies	Hospedeiro	Local	Lesão (mm)	Estroma (µm)	Conidióforos (µm)	Conídios (µm)	Referências
<i>P. cruenta</i>	<i>Phaseolus</i> sp., <i>Phaseolus vulgaris</i>	Brazil, China, Angola, Etiopia, Florida, Hong Kong, Índia, Madagascar, Africa, Taiwan, Uganda	1-15 anfigenas	Pequeno	10-70 × 3-6 (0- 3-septos)	40-150 × 2,5-5 (4-14-septos)	Guo & Hsieh (1995); Mendes, Da Silva, Dianese, <i>et al.</i> (1998)
<i>P. glycines</i>	<i>Phaseolus atropurpureus</i>	China, Taiwan	0,5-1,5 anfigenas	20-60	10-25 × 1,5-3	30-100 × 1,5-2,5 (3-12-septos)	Guo & Hsieh (1995); Hsieh & Goh (1990).
<i>P. griseola</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Iran, Italy, Nicaragua, Panama, South Africa, Tanzania Thailandia	1-8 anfigenas	Ate 70 comprimento	100-500 × 20- 70	20-75(85) × 4- 9 µm, (0)1- 5(6)-septos)	Crous <i>et al.</i> (2006).
<i>Pseudocercospora</i> sp.	<i>Phaseolus</i> <i>vulgaris</i>	Rio de Janeiro, Brasil	5-25 Anfigenas	25-40 × 30-65	25-95 × 4-5 (2-4-septos)	20-100 × 3-4 (1- 9-septos)	Este Trabalho

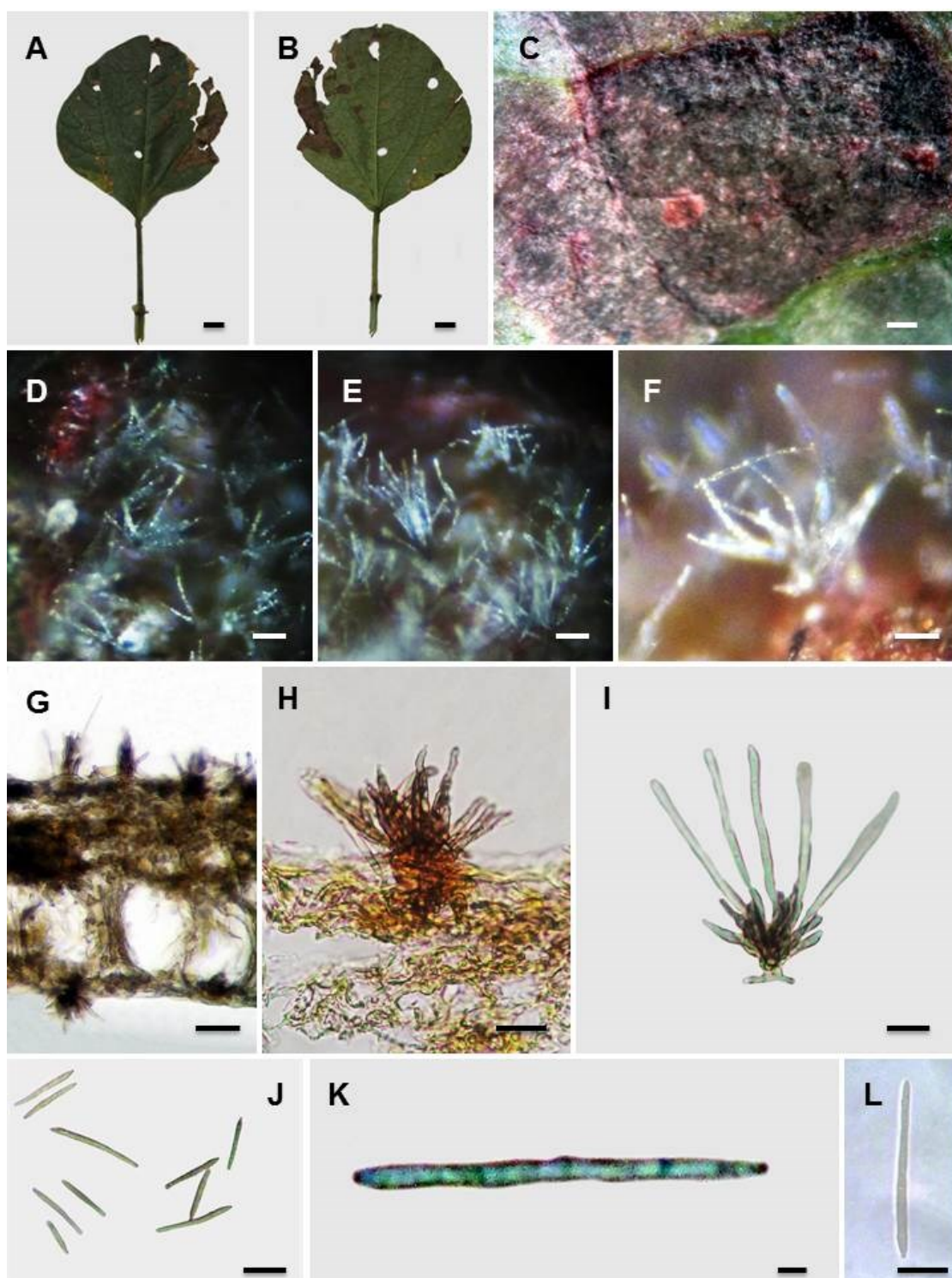


Figura 23. *Pseudocercospora* em folhas de *Phaseolus vulgaris* L. (*Fabaceae*). **A-C:** Sintomas (Barra = A: 5 cm; B: 5 cm; C: mm). **D-F:** Conidióforos vistos ao microscópio óptico no aumento de 10 e 20x (Barras = D-E: 30; F: 20). **G:** Estruturas anfigenas (Barra = 50). **H-I:** Conidióforos e conídios conídios (Barras = H: 30; I: 10). **J:** Grupo de conídios (Barras = 30). **K-L:** Conidio solitário (Barras = K: 5; L: 20).

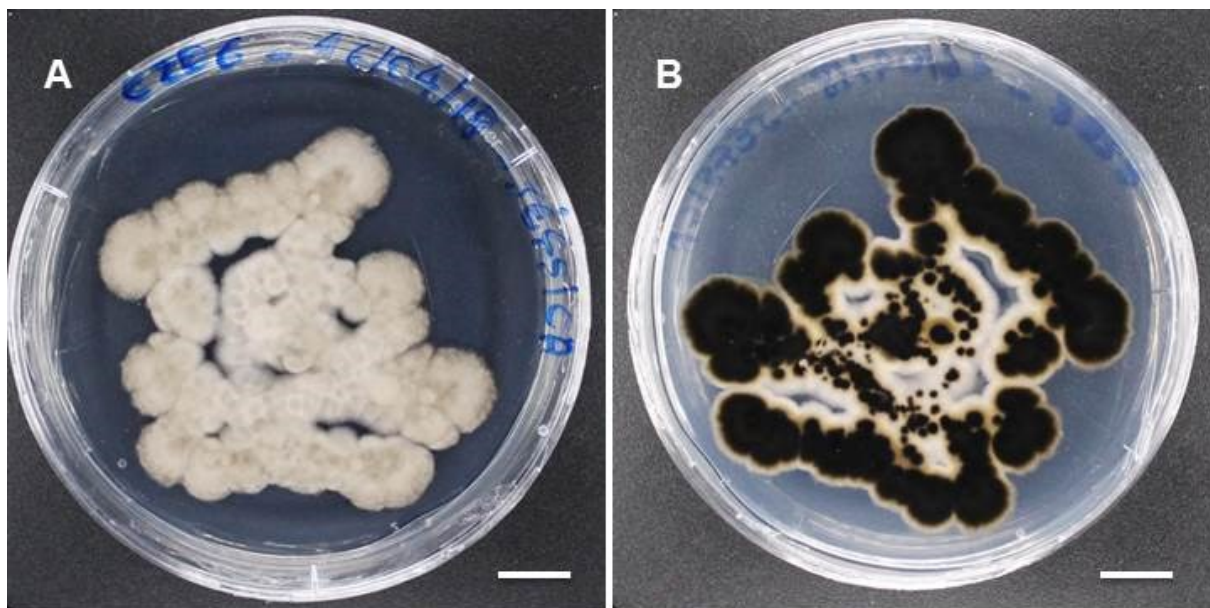


Figura 24. A-B: *Pseudocercospora* sp. em meio de cultura BDA a ± 25 °C/ 15 dias (Barra = 1 cm).

**4.5.8 *Pseudocercospora* em folhas de *Muntingia calabura* L. (*Muntingiaceae*) (Fig. 25-26).
Provável espécie nova nº 10.**

Descrição: *Manchas foliares* 1-4 mm diâmetro, manchas castanho-claras a marrom-avermelhadas, bastante irregulares, epífilas. Micélio interno, incolor a castanho claro, ramificado; hifas até 1-3 μm de diâmetro. *Estromas* 15-30 \times 30-55 μm , irrompentes, composto por células de paredes marrons de 4-8 μm de diâmetro. *Conidióforos* 15-35 \times 3-5 μm , não ramificados, castanho-claros, retos a sinuosos, 0-1-septos. *Células conidiogênicas* terminais, integradas, com *loci* conidiogênico inconspícuos. *Conídios* 20-90 \times 4-6 μm , solitários, incolores a pálidos, retos a sinuosos, atenuados no topo e truncados na base, 3-7-septos.

Espécimes examinados: **Brasil:** Rio de Janeiro, Seropédica. Em folhas de *Muntingia calabura* L. (*Muntingiaceae*) “calabura, cereja-da-jamaica”. 03/12/2017. Col. Yuji Ito Nunes 15 (UFRJ 12608). 20/03/2018. Col. Jessica Rembinski 38 (UFRJ 12649).

Discussão: Analisando-se a tabela 19, verifica-se que as duas espécies de *Pseudocercospora* descritas em *M. calabura* apresentam semelhanças com a espécie aqui estudada. *Pseudocercospora muntingiae* (PARREIRA, 2009; FARR; ROSSMAN, 2018), descrita em *M. calabura* no Brasil em 2009, em folhas provenientes do estado do Espírito Santo, apresentando lesões epífilas, estroma (12.5–32.5 \times 22,5–45.0 μm) um pouco menor em profundidade e largura, conidióforos (20–50 \times 3,5–4 μm) maiores e mais finos, e conídios (25–74 \times 2,5–5 μm) um pouco mais curtos e mais finos. *Pseudocercospora muntingiicola* (HSIEH; GOH, 1990; GUO; HISIEH, 1995) ainda não foi descrita no Brasil, apresentando lesões epífilas, estroma (15-30 μm) curto, conidióforos (10-55 \times 3-5 μm) mais longos e conídios (22-55 \times 3-5 μm) pouco mais curtos e mais finos. A espécie encontrada trata-se provavelmente de *Pseudocercospora muntingiae*, entretanto, estudos adicionais serão efetuados para elucidar a informação prestada neste estudo, pois as espécies apresentam pequenas diferenças na morfologia apesar de serem muito próximos os valores obtidos. Este é o primeiro relato deste fungo causando mancha foliar para o Estado do Rio de Janeiro.

Tabela 15. Características de *Pseudocercospora* em folhas *Muntingia calabura* L. (*Muntingiaceae*) de diferentes locais comparadas com a encontrada no Estado do Rio de Janeiro.

Espécies	Local	Lesão (mm)	Estroma (μm)	Conidióforos (μm)	Conídios (μm)	Referencias
<i>Pseudocercospora muntingiae</i>	Brazil, Cambodia Republica Dominican, Florida, Guam, Indonesia, Malasia, Singapura, Ilhas Salomao	0,2–2,5 Epífilas	12.5–32.5 × 22,5–45.0	20–50 × 3,5–4	25–74 × 2,5–5 (1– 8 septos)	Parreira (2009); Farr e Rossman (2018)
<i>P. muntingicola</i>	China, Taiwan	0,5-1,5 Epífilas	15-30	10-55 × 3-5 (1-3- septos)	22-55 × 3-5 (2-8- septos)	Hsieh e Goh (1990); Guo e Hisieh (1995)
<i>Pseudocercospora</i> sp.	Rio de Janeiro, Brasil	1-4 Epífilas	15-30 × 30-55	15-35 × 3-5 (0-1-septos)	20-90 × 4-6 (3-7- septos)	Este Trabalho

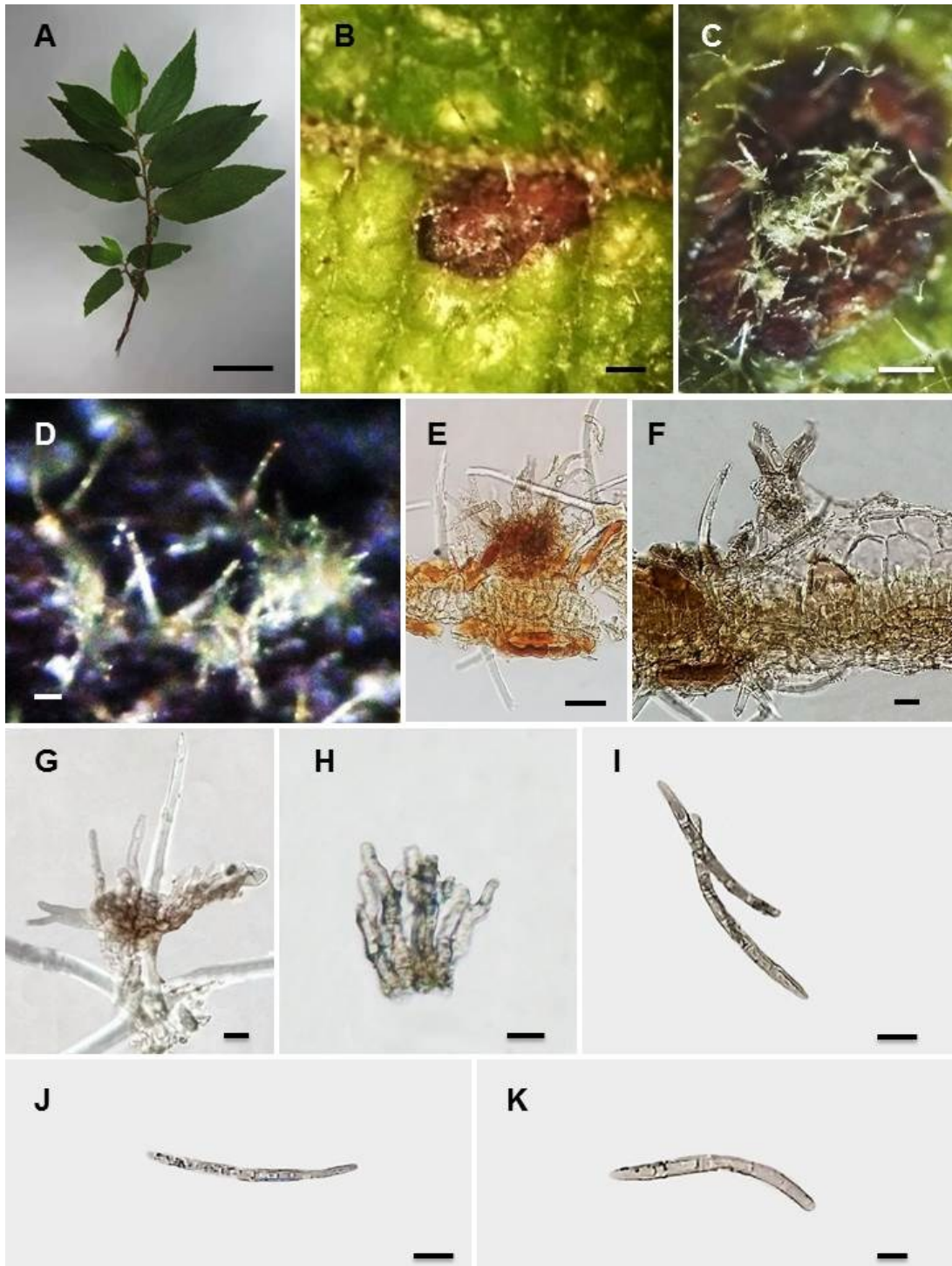


Figura 25. A-K: *Pseudocercospora* em folhas *Muntingia calabura* L. (*Muntingiaceae*). A-D: Sintomas e estruturas vistas ao microscópio estereoscópico e óptico no aumento de 10 e 20x (Barras = A: 5 cm; B-C: 1 mm; D: 10 μ m). E-H: Conidióforos (Barras = E: 30 μ m; F-H: 10 μ m). I: Grupo de conídios (Barra = 20 μ m). J-K: Conídio solitário (Barras = J: 20 μ m; K: 10 μ m).

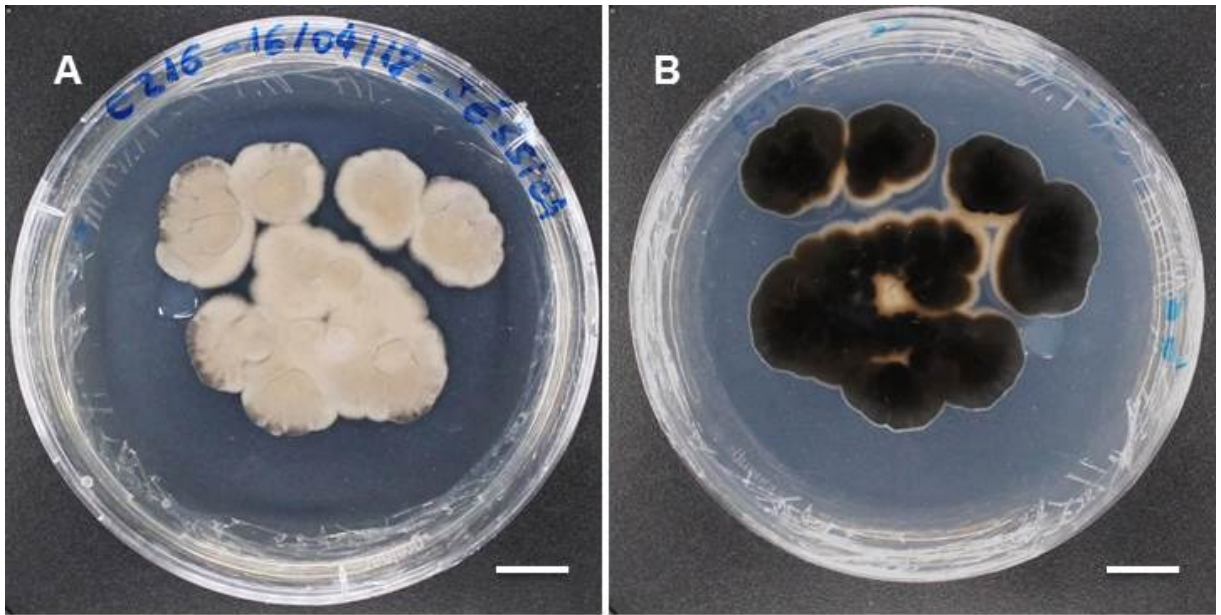


Figura 26. A-B: *Pseudocercospora* sp. em meio de cultura BDA a ± 25 °C/ 15 dias (Barra = 1 cm).

4.5.9 *Pseudocercospora* em folhas de em *Solanum americanum* Mill. (*Solanaceae*) (Fig. 27-28). Provável espécie nova n° 11.

Descrição: *Manchas foliares* 2-5 mm de diâmetro, inicialmente amarelas tornando-se castanho-claras à marrons ou marrom-acinzentadas, circulares a irregulares, anfigenas. *Micélio* interno, incolor a marrom-claro, ramificado; *hifas* 1-3 µm de diâmetro. *Estromas* 10-40 × 15-58 µm, irrompentes, composto por *textura angularis*, *células* parede marrom de 3-6 µm de diâmetro. *Conidióforos* 14-50 × 3-4 µm, castanho-claros, retos a sinuosos, 0-1-septados. *Conídios* 40-90 × 2-5 µm, hialinos a pálidos, retos a sinuosos, atenuados na ponta e truncados na base, 2-10-septados.

Espécimes examinados: Brasil: Rio de Janeiro, Seropédica, Bairro INCRA. Em folhas de *Solanum americanum* Mill. (*Solanaceae*) "Maria Pretinha". 17/08/2017. Col. Jessica Rembinski (UFRJ 12502). 26/08/2017. Col. Jessica Rembinski (UFRJ 12556) 30/09/2017. Col. Jessica Rembinski (UFRJ 12563). 01/11/2017. Col. Jessica Rembinski (UFRJ 12556) . 01/11/2017. Col. Jessica Rembinski (UFRJ 12583). 01/11/2017. Col. Jessica Rembinski (UFRJ 12565). 01/11/2017. Col. Jessica Rembinski (UFRJ 12638).

Discussão: As espécies *P. atromarginalis* (G.F. Atk.) Deighton e *P. fuligena* (Roldan) Deighton, mostraram-se semelhantes a espécie encontrada neste trabalho, porém ao ser observado as características morfológicas de ambas, nota-se que, *P. fuligena* se aproxima mais da espécie aqui estudada, devido à forma e disposição dos conidióforos e por apresentar estroma bem definido e subcuticular. *Pseudocercospora atromarginalis* (G.F. Atk.) Deighton tem sido descrita em 6 espécies de *Solanum* na América do Norte e América do Sul, Ilhas do Pacífico, Nova Zelândia e Ásia; esta mesma espécie foi reportada em *S. americanum* na nova Zelândia e na Coréia. Já *Pseudocercospora fuligena* (Roldan) Deighton foi reportada em *Solanum lycopersicum* em Taiwan e este é o primeiro relato de *Pseudocercospora* neste hospedeiro no Estado do Rio de Janeiro.

Tabela 16. Características de *Pseudocercospora* sp. em *Solanum americanum* encontrada no Estado do Rio de Janeiro comparadas com as espécies já descritas na família *Solanaceae*.

Espécies	Hospedeiro	Local	Mancha (mm)	Estroma (um)	Conidióforos (um)	Conídios (um)	Referências
<i>Pseudocercospora atromarginalis</i>	<i>Solanum americanum</i>	Coreia	Anfigenas	-	26-60 × 3,5-5,5 (0-3-septos)	32-96 × 3-5 (3-10-septos)	Choi <i>et al.</i> (2015)
<i>P. atromarginalis</i>	<i>S. alatum</i> , <i>S. biflorum</i> , <i>S. nigrum</i> , <i>S. nigrum</i> var. <i>pauciflorum</i> , <i>S.</i> <i>photeinocarpum</i> , <i>S. nigrum</i>	China	2-10 Anfigenas	Ausente ou somente poucas células marrons	15-65 × 3-5(0-4-septos)	20-95 × 3,5-5 (3-11-septos)	Guo e Hsieh (1995)
<i>Cercospora atromarginalis</i>	<i>S. nigrum</i>	Carolina do Norte	4-6 Anfigenas	-	10-30 × 4-4,5	10-70 × 4-5 (1-10-septos)	Guo e Hsieh (1995)
<i>Pseudocercospora fuligena</i>	<i>Lycopersicum esculentum</i> = <i>S. lycopersicum</i>	Taiwan	2-8 Anfigenas	Ate 45	15-60 × 3-6 (0-3-septos)	20-100 × 3-6 (3-10-septos)	Guo e Hsieh (1995)
<i>P. solani-melangenicola</i>	<i>S. melongena</i>	Taiwan	2-4	Ate 30	30-60(120) × 3,5-4,5(1-3- septos)	30-100 × 3,5-5 (3-12-septos)	Guo e Hsieh (1995)
<i>P. solani-torvicula</i>	<i>S. torvum</i>	Taiwan	1-4 Anfigenas	Ate 30	Primário: 35-60 × 4,5-6 (1-3-septos) Secundário: 10-25 × 4-5 (0-1-septos)	20-115 × 4,5-6 (1-11-septos)	Guo e Hsieh (1995)
<i>P. trichophila</i>	<i>S. aculeatissimum</i> , <i>S.</i> <i>verbascifolium</i>	Taiwan	1-5 Anfigenas	Ate 35	4-50 × 2,5-5 (0-3-septos)	15-90 × 4-5(1-12- septos)	Guo e Hsieh (1995)
<i>Pseudocercospora</i> sp.	<i>S. americanum</i>	Rio de Janeiro Brasil	2-5 Anfigenas	10-40 × 15-58	14-50 × 3-4 (0-1-septos)	40-90 × 2-5 (2-10- septos)	Este trabalho



Figura 27. A-J: *Pseudocercospora* em folhas de *Solanum americanum* Mill. (*Solanaceae*). A-C: Sintomas (Barras = A: 5 cm; B-C: 1 mm). D-E: Conidióforos vistos ao microscópio óptico no aumento de 10 e 20x (Barra = 30 μ m). F: Estruturas anfigenas (Barra = 30 μ m). G-H: Estroma e Conidióforos (Barra = 30 μ m). I: Grupo de conídios (Barra = 20 μ m). J: Conídio solitário (Barra = 20 μ m).

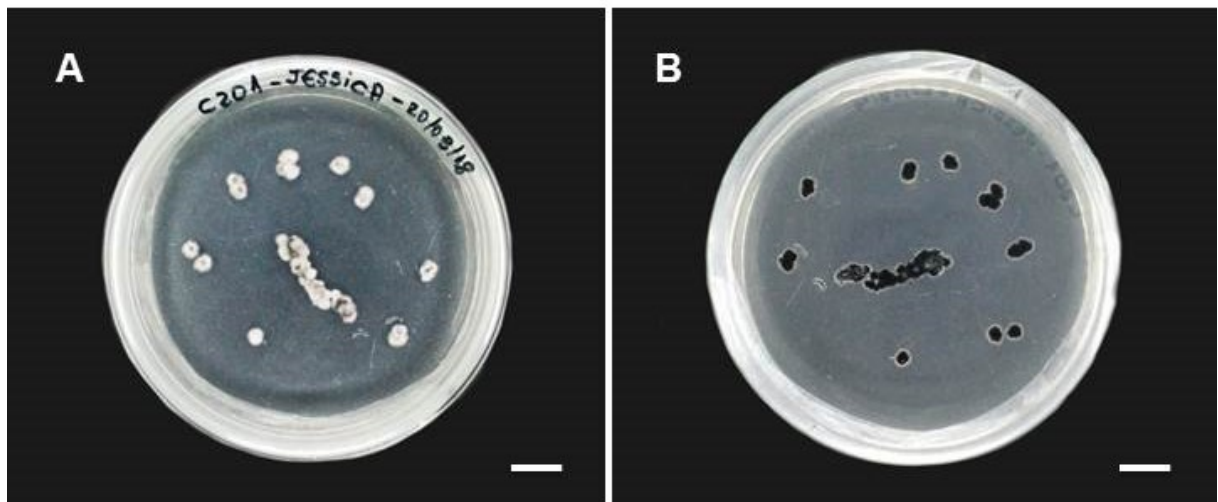


Figura 28. A-B: *Pseudocercospora* sp. em meio de cultura BDA a ± 25 °C/ 15 dias (Barra = 1 cm).

**4.5.10 *Pseudocercospora* em folhas de *Solanum cernum* Vell (*Solanaceae*) (Fig. 29-30).
Provável espécie nova nº 12.**

Descrição: *Manchas foliares* 4-25 mm de diâmetro, inicialmente amarelas, formando bordas castanho-claras à marrons, com centro amarelado, circulares a irregulares, coalescentes, epífilas. *Micélio* interno, incolor a marrom-claro, ramificado; *hifas* 2-4 µm de diâmetro. *Estromas* 25-55 × 50-90 µm, semiepidermais, irrompentes, composto por *textura angularis*, *células* de parede marrom de 5-10 µm de diâmetro. *Conidióforos* 20-40 × 4 µm, castanho-claros, retos a sinuosos, 0-1-septos. *Célula conidiogênica* integrada, com *loci* conidiogênico inconspícuo. *Conídios* 35-145 × 3-5 (5-12-septos) µm, hialinos a pálidos, retos a sinuosos, atenuados na ponta e truncados na base, 2-10-septos.

Espécimes examinados: Brasil: Rio de Janeiro, Seropédica. Em folhas de *Solanum cernum* Vell (*Solanaceae*) “Panaceia”. 17/08/2017. Col. Jucimar Moreira de Oliveira (UFRJ 12281). 26/08/2017. Col. Jucimar Moreira de Oliveira 14 (UFRJ 12300) 30/09/2017. Col. Carlos Antonio Inacio 166 (UFRJ 12519). 01/11/2017. Col. Carlos Antonio Inacio 197 (UFRJ 12523). 01/11/2017. Col. Carlos Antonio Inacio 170 (UFRJ 12563). 01/11/2017. Col. Jucimar Moreira de Oliveira 45 (UFRJ 12638).

Discussão: Na tabela 21 são descritas as espécies de *Pseudocercospora* encontradas na família *Solanaceae*, visto que não há relatos deste hospedeiro na literatura. E a espécie que mais se aproxima da espécie em estudo é *Pseudocercospora carolinensis* (BRAUN; CROUS, 2003), descrita em *Solanum carolinense*, a qual apresenta lesões epífilas, estromas (15–75) pouco maiores, conidióforos (10–35 × 3,5–6) pouco mais curtos e conídios (30–)40–90(–130) × 2.5–5) um pouco mais curtos porém muito próximos. As demais espécies de *Pseudocercospora* apresentam lesões anfigenas, distinguindo-se da espécie em estudo. Assim os presentes dados corroboram para que a espécie em estudo se trate de uma provável nova espécie, sendo este o primeiro relato do fungo *Pseudocercospora* causando mancha foliar em *S. cernum* no estado do Rio de Janeiro e no Brasil.

Tabela 17. Características de *Pseudocercospora* sp. em folhas de em *Solanum cernum* Vell comparadas com as espécies já descritas em hospedeiros da família *Solanaceae*. (Continuação)

Espécies	Hospedeiro	Local	Mancha (mm)	Estroma (um)	Conidióforos (um)	Conídios (um)	Referências
<i>P. atromarginalis</i>	<i>Solanum americanum</i>	Coreia	Anfígenas	-	26-60 × 3,5-5,5 (0-3-septos)	32-96 × 3-5 (3-10-septos)	Choi <i>et al</i> (2015)
<i>P. atromarginalis</i>	<i>Solanum m alatum</i> , <i>S. biflorum</i> , <i>S. nigrum</i> , <i>S. nigrum</i> var. <i>pauciflorum</i> , <i>Solanum photeinocarpum</i> ,	China	2-10 Anfígenas	Ausente ou somente poucas células marrons	15-65 × 3-5 (0-4-septos)	20-95 × 3,5-5 (3-11-septos)	Guo e Hsieh (1995)
= <i>Cercospora atromarginalis</i>	<i>Solanum nigrum</i>	Carolina do Norte	4-6 Anfígenas	-	10-30 × 4-4,5	10-70 × 4-5 (1-10-septos)	Guo e Hsieh (1995)
<i>P. fuligena</i>	<i>Lycopersicum esculentum</i> = <i>Solanum lycopersicum</i>	Taiwan	2-8 Anfígenas	Até 45	15-60 × 3-6 (0-3-septos)	20-100 × 3-6 (3-10-septos)	Guo e Hsieh (1995)
<i>P. solani-melangenicola</i>	<i>Solanum melongena</i>	Taiwan	2-4	Até 30	30-60(120) × 3,5-4,5 (1-3-septos)	30-100 × 3,5-5 (3-12-septos)	Guo e Hsieh (1995)
<i>P. solani-torvícula</i>	<i>Solanum torvum</i>	Taiwan	1-4 Anfígenas	Até 30	Primário: 35-60 × 4,5-6 (1-3-septos) Secundário: 10-25 × 4-5 (0-1-septos)	20-115 × 4,5-6 (1-11-septos)	Guo e Hsieh (1995)
<i>P. trichophila</i>	<i>Solanum aculeatissimu</i> , <i>Solanum verbascifolium</i>	Taiwan	1-5 Anfígenas	Ate 35	4-50 × 2,5-5 (0-3-septos)	15-90 × 4-5 (1-12-septos)	Guo e Hsieh (1995)
<i>P. solanacea</i>	<i>Solanum nigrum</i>	Índia	1-10 Anfígenas	20-80	5-40 × 2-5,5 (1-2-septos)	(30)40-60(75) × 2,5-5,5 (3-9-septos)	Braun (2017)

Tabela 17. Continuação.

<i>P. carolinensis</i>	<i>Solanum carolinense</i>	USA	2-5 Epífilas	15-75	10-35 × 3.5-6 0-1-(septos)	(30-)40-90(- 130) × 2.5-5 (3-10(12)- septos) 15-110 × 2-3.5 μm, ((1)3-11- septos)	Braun e Crous (2003)
<i>P. marcelliana</i>	<i>Solanum nudum</i> , <i>S. torvum</i> var. <i>hartwegianum</i>	Venezuela,	1-12 Anfígenas	15-75	5-30 × 1.5-3.5(4) (1-2-septos)	20-100 × 2-4 μm, (2-10- septos)	Braun e Crous (2003)
<i>P. rugosi</i>	<i>Solanum rugosum</i>	Republica Dominicana	1-4 Anfígenas	10-20	5-150 × 3-5	(10)20-90(110) × (2.5)3-5(6) ((1)2-10(12)- septos)	Braun e Crous (2003)
<i>P. trichophila</i> var. <i>punctata</i>	<i>Solanum hirtum</i> ,	Venezuela	1-8 Anfígenas	10-60	(10-70 × 3-7 (0-4-septos)	(15)30-65 × 3- 5 μm, (3- 6-septos)	Braun e Urtiaga (2012)
<i>P. venezuelae</i>	<i>Solanum</i> sp., <i>Solanum</i> “ <i>aculeatum</i> ”, <i>S. aethiopicum</i> (= <i>S. gilo</i>), <i>S. argenteum</i>	Venezuela, America do sul	Anfígenas	15-40	10-70 × 2-4 (0-1 (2)- septos)	Chupp (1954); Deighton (1976); Braun e Freire (2003, 2006); Crous e Braun (2003).	
<i>Pseudocercospora</i> sp.	<i>Solanum cernum</i>	Rio de Janeiro, Brasil	4-25 Epífilas	25-55 × 50-90	27-45 × 4	35-145 × 3-5 (5-12-septos)	Este trabalho

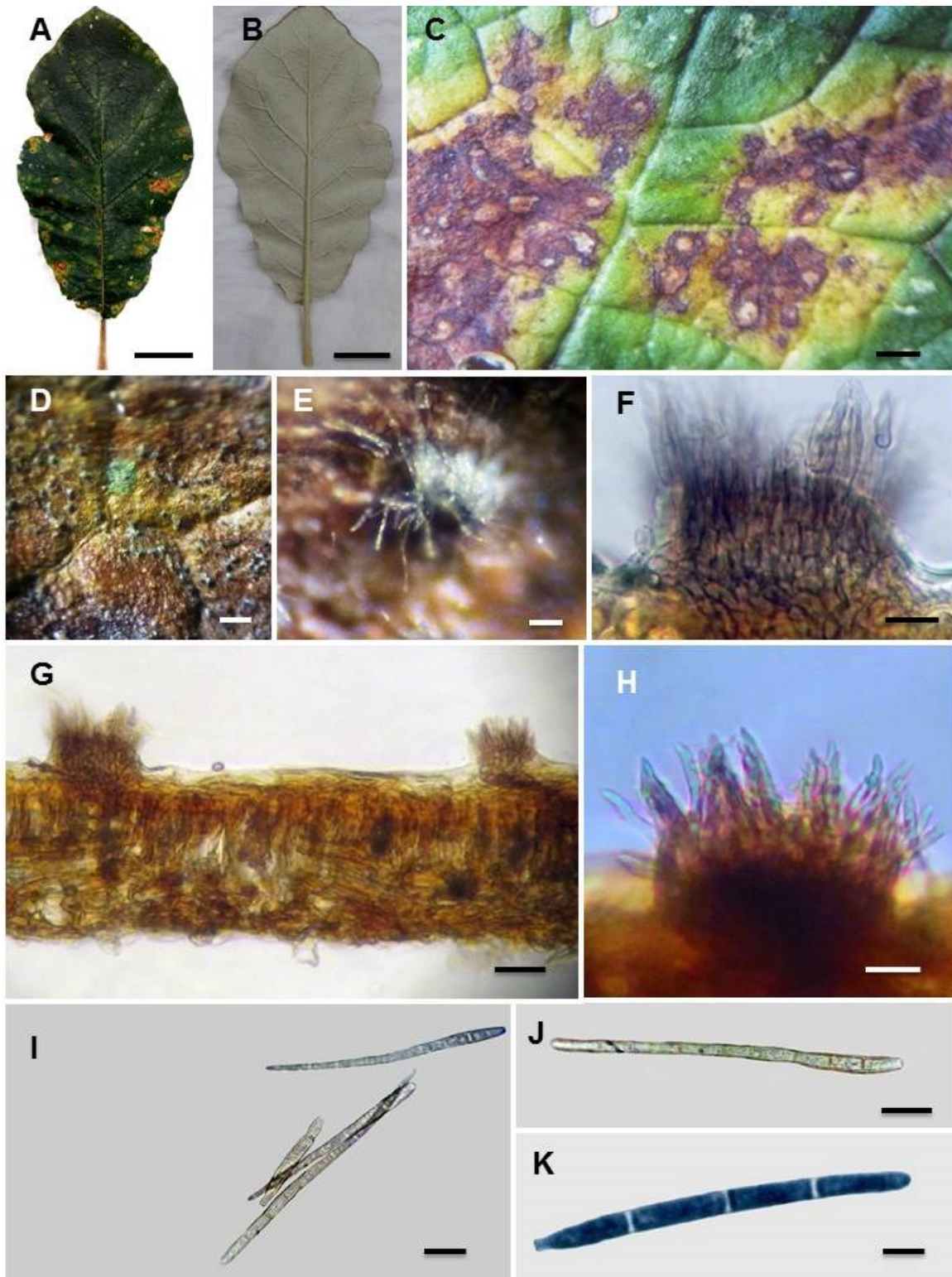


Figura 29. A-K: *Pseudocercospora* sp. em folhas de *Solanum cernuum* Vell (*Solanaceae*). A-D: Sintomas (Barras = A-B: 5 cm; C: 1 mm; D: 5 mm). E: Conidióforos vistos ao microscópio óptico no aumento de 20x (Barra = 20 μ m). F: Estroma (Barra = 20 μ m). G: Estruturas epífilas (Barra = 50 μ m). H: Conidióforos emergindo do estroma (Barra = 5 μ m). I: Grupo de conídios (Barra = 10 μ m). J-K: Conídio solitário (Barras = J: 10 μ m; K: 5 μ m).

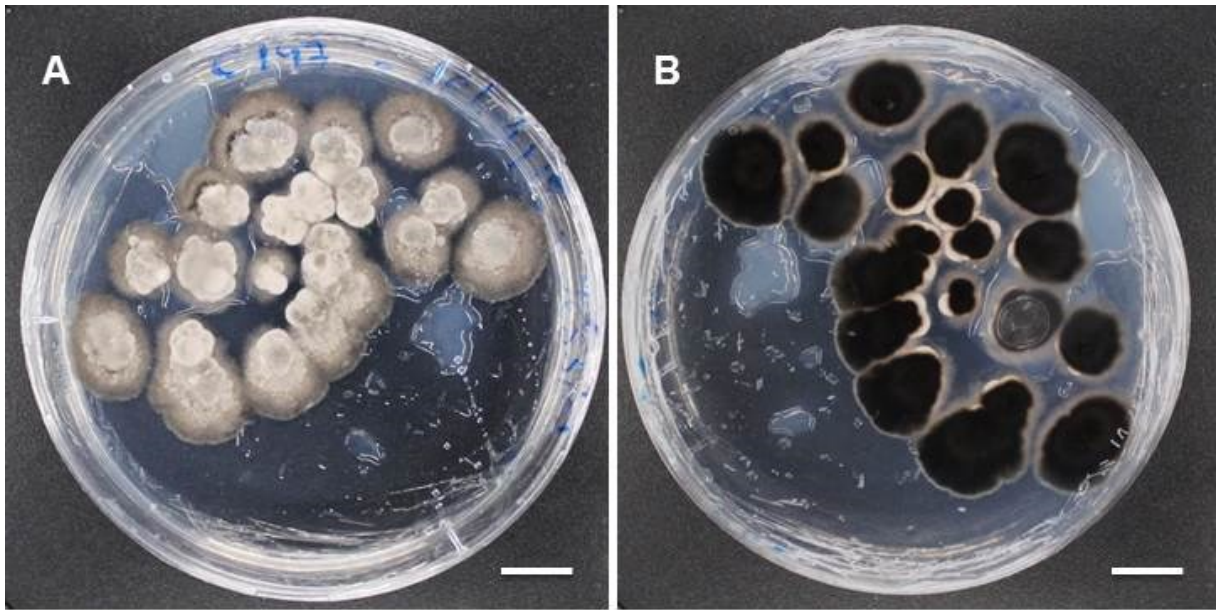


Figura 30. A-B: *Pseudocercospora* sp. em meio de cultura BDA a $\pm 25^{\circ}\text{C}$ /15 dias (Barra = 1 cm).

4.5.11 *Pseudocercospora* em folhas *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos (*Bignoniaceae*) (Fig. 31-32). Provável espécie nova n° 13.

Descrição: *Manchas foliares* 3-9 mm de diâmetro, inicialmente manchas amarelas tornando-se castanho-claras à marrons ou marrom-acinzentadas, circulares a irregulares, anfígenas. *Micélio* interno e externo, hialino a marrom-claro, ramificado; *hifas* 1-2 µm de diâm. *Estromas* 25-50 × 20-50 µm, irrompentes, composto por *textura angularis*, *células* 3-10 µm, parede marrom. *Conidióforos* 15-50 × 3-5 µm, solitários, castanho-claros, retos a sinuosos, cilíndricos, 2-4-septos. *Célula conidiogênica* terminal, cilíndrica, proliferando simpodialmente, castanho claro, suave. *Conídios* 26-115(130) × 3-5 µm, solitários, hialinos a pálidos, retos a sinuosos, atenuados na parte superior e truncados na base, 4-10-septos.

Espécimes examinados: **Brasil:** Rio de Janeiro, Seropédica. Em folhas de *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Standl "Ipê roxo" (*Bignoniaceae*) (*Handroanthus impetignus*). 18/09/2017. Gustavo Correiro do Amaral 02 (UFRJ 12562). 22/11/2017. Gustavo Correiro do Amaral 07 (UFRJ 12605).

Discussão: *Handroanthus impetiginosus* é uma espécie nativa da família *Bignoniaceae*, com uso paisagístico e ornamental, sendo este o primeiro relato de *Pseudocercospora* sp. neste hospedeiro. Nota-se que, *Cercospora-tabebuiae-impetiginosae* Inácio e Dianese (1998) mostrou-se próxima da encontrada no Estado do Rio de Janeiro, porém distingue-se claramente pelas cicatrizes conspícuas no conidióforo e conídios, bem como não forma micélio secundário. Corroborando assim, para que a espécie em estudo seja uma nova espécie de *Pseudocercospora*, sendo relatada pela primeira vez no estado do Rio de Janeiro e no Brasil.

Tabela 18. Características de *Pseudocercospora* em folhas de *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Standl comparadas com espécies descritas em diferentes hospedeiros da família *Bignoniaceae*.

Espécies	Hospedeiro	Local	Mancha (mm)	Estroma (μ m)	Conidióforos (μ m)	Conídios (μ m)	Referências
<i>Pseudocercospora tabebuiae-roseo-albae</i>	<i>Tabebuia roseo-albae</i> (Ridl.) Sandwith	Brasília, Brasil	13	23-77 × 26-65	18-58 × 2-5 (1-5-septos)	12-57 × 2-5 (1-8-septos)	Inácio e Dianese (1998)
<i>P. cybistacis</i>	<i>Catalpa</i> sp.	China	1-6	15-70	8-30 × 2,5-4 (0-3-septos)	30-90 × 2-4 (1-6-septos)	Guo e Hsieh (1995)
<i>P. sordida</i>	<i>Campsis grandiflora</i> (Thunb.) K.Schum	China	1-7	-	20-90 × 3,5-5(6,5) (1-4-septos)	20-165 × 3-5,5 (3-15-septos)	Guo e Hsieh (1995)
<i>P. tabebuiae-caaribae</i>	<i>Tabebuia caraiba</i> (Mart.) Bureau	Goiás, Brasil	Até 30	18-55 × 23-60	(13)20-52 × 4-6 (0-1-septos)	35-98 × 3-5 (3-8-septos)	Inácio e Dianese (2006)
<i>Cercospora tabuiaie-impetiginosae</i>	<i>Handroanthus impetiginosus</i>	Distrito Federal, Brasil	3-30	27×107	24-58 × 2-4 (1-8-septos)	25-135 × 2-4 (1-10-septos)	Inácio e Dianese (1998)
<i>Pseudocercospora norchiensis</i>	<i>Eucalyptus</i> sp.	Italia	2-6 Anfigenas	90 × 160	40-70 × 4-7 (3-5-septates)	(50)80-120(140) × (5-) 6 (-7) ((0-)5-9(-12)-septos)	Crous <i>et al.</i> (2007)
<i>Pseudocercospora</i> sp.	<i>Handroanthus impetiginosus</i>	Rio de Janeiro, Brasil	3-9 Anfigenas	20-50 × 20-50	15-50 × 3-5 (2-4-septos)	26-115 (130) × 3-5 (4-13-septos)	Este Trabalho

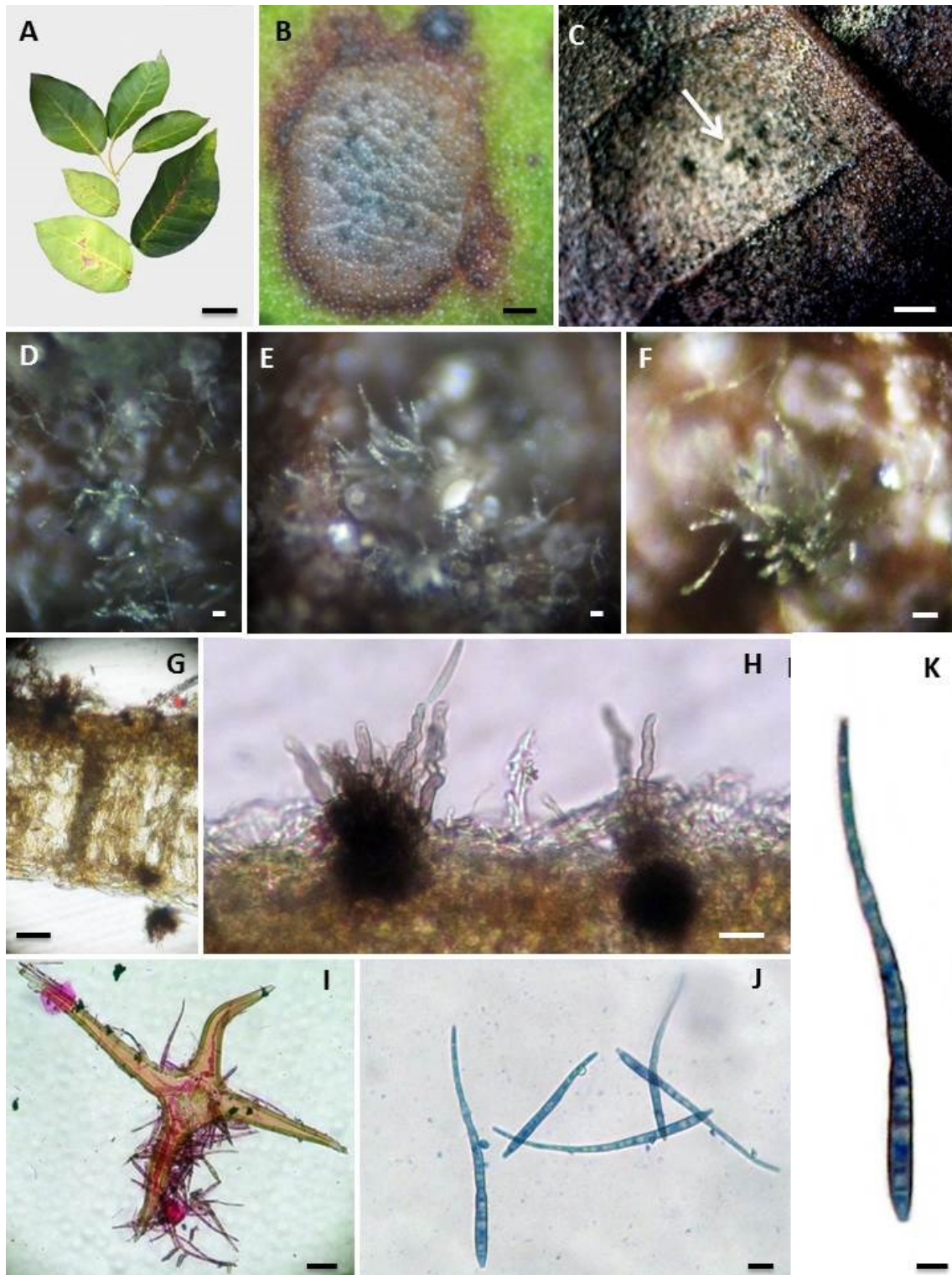


Figura 31. A-K: *Pseudocercospora* sp. en folhas de *Handroanthus impetiginosus* (*Bignoniaceae*). A-C: Sintomas (Barras = A: 5 cm; B: 5 mm; C: 1 mm). D-F: Conidióforos vistos ao microscópio óptico (Barras = D: 20 μ m; E: 30 μ m; F: 50 μ m). G: Estruturas anfigenas (Barra = 30 μ m). H: Estroma e conidióforos (Barra = 10 μ m). I: Micélio secundário (Barras = 50 μ m). J: Grupo de conídios (Barra = 20 μ m). K: Conídio solitário (Barra = 10 μ m).

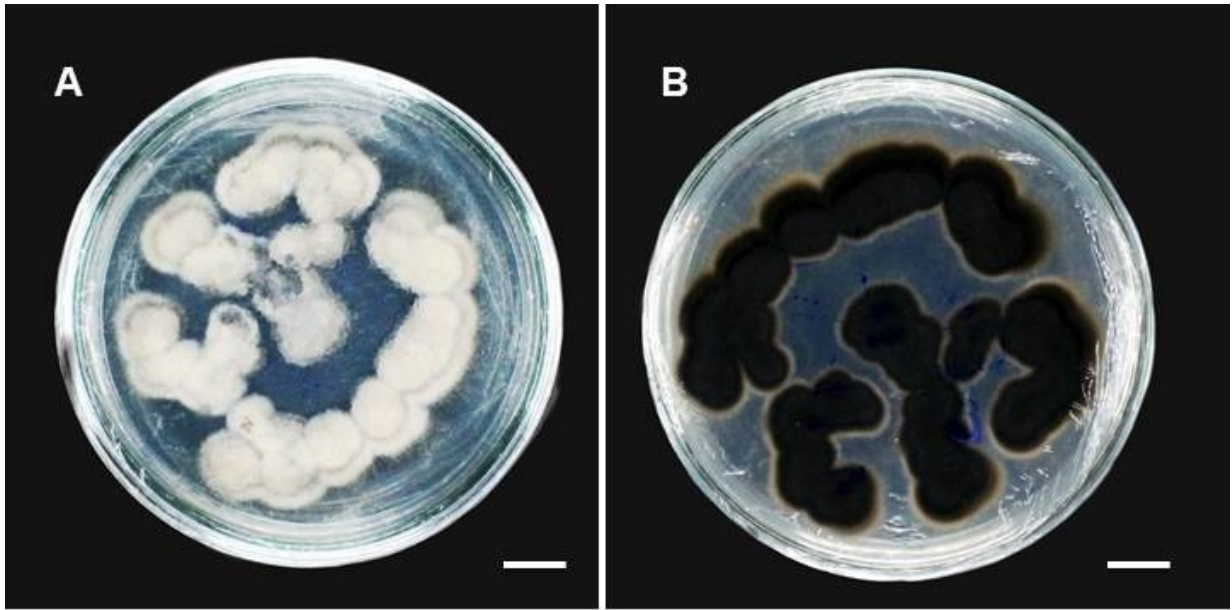


Figura 32. A-B: *Pseudocercospora* sp. em meio de cultura BDA a ± 25 °C/ 15 dias (Barra = 1 cm).

4.5.12 Características de *Pseudocercospora* em folhas de *Turnera ulmifolia* L. (*Turneraceae*) (Fig. 33). Provável espécie nova nº 14.

Descrição: *Manchas foliares* 3-9 mm de diâmetro, inicialmente *manchas* amarelas tornando-se castanho-claras à marrons ou marrom-acinzentadas, circulares a irregulares, anfigenas. *Micélio* interno e externo, hialino a marrom-claro, ramificado; *hifas* 1-2 μm de diâmetro. *Estromas* 25-50 \times 20-50 μm , irrompentes, composto por *textura angularis*, *células* 3-10 μm , parede marrom. *Conidióforos* 15-50 \times 3-5 μm , solitários, castanho-claros, retos a sinuosos, cilíndricos, 2-4-septos. *Célula conidiogênica* terminal, cilíndrica, proliferando simpodialmente, castanho claro, suave. *Loci* conidiogênico ligeiramente conspícuos, levemente engrossados, não escurecidos. *Conídios* 26-115(130) \times 3-5 μm , solitários, hialinos a pálidos, retos a sinuosos, atenuados na parte superior e truncados na base, 4-10-septos.

Espécimes examinados: **Brasil:** Rio de Janeiro, Seropédica, DENF- Departamento de Entomologia e Fitopatologia/UFRRJ. Em folhas de *Turnera ulmifolia* L. (*Turneraceae*) “Chanana”. 27/03/2017. Col.Col. Karen de Souza Tinoco (UFRJ 12431). 15/10/2017. Col.Col. Jessica Rembinski (UFRJ 12466). 20/03/2018. Col. Jessica Rembinski (UFRRJ 12652).

Discussão: Verifica-se na Tabela 19 que, a espécie em estudo possui conidióforos menores e conídios maiores que as espécies reportadas por alguns autores (BRAUN, 2002; SYDOW; SYDOW, 1916; SACCARDO, 1902). A espécie que mais se aproxima da espécie em estudo é *Pseudocercospora pilicola* Braun (2001) (= *Cercospora pilicola* Petrak & Ciferri, 1932) apresentando conidióforos (5-50 \times 2-6 μm) um pouco maiores e conídios (18-50(-72) \times 4-6,5 μm) com comprimento menor e a largura maior. Tratando-se assim de uma provável espécie nova, sendo relatada pela primeira vez no estado do Rio de Janeiro em *Turnera ulmifolia* L.

Tabela 19. Características de *Pseudocercospora* em folhas de *Turnera ulmifolia* L. (*Turneraceae*) comparadas com outras reportadas na mesma família de diferentes locais.

Espécies	Hospedeiro	Local	Mancha (mm)	Estroma (µm)	Condióforos (µm)	Conídios (µm)	Referências
<i>Pseudocercospora turnericola</i>	<i>Turnera pumila</i>	Brasília, Brazil	-	-	20 - 80 × 4 - 6 (Pluriseptados)	70-85 × 4-6 (3-8-septos)	Braun (2002)
= <i>Cercospora turnericola</i>	<i>T. pumilae</i>	Brasília, Brazil	-	-	20 - 70 × 4 - 5 (Parcialmente septado)	50-65 × 4-5 (4-6-septos)	Sydow e Sydow (1916)
= <i>Cercospora turnerae</i>	<i>T. ulmifolia</i>	Bahamas	3-4	-	60-90 × 4	60-90 × 3-4 (1-3-septos)	Saccardo (1902)
<i>Pseudocercospora pilicola</i>	= <i>Piriqueta ovata</i>	Santiago, República Dominicana	-	-	Solitários, 5-50 × 2-6 (0-3-septos)	20-70 × 4-7 [1-6(-8)-septos]	Braun (2001)
= <i>Cercospora pilicola</i>	= <i>P. ovata</i>	Santiago, República Dominicana	-	-	5-28 × 3 - 4,5(5)	18-50(-72) × 4-6,5 (1-3(-4)-septos)	Petrak e Ciferri, (1932)
<i>Pseudocercospora</i> sp.	<i>Turnera ulmifolia</i>	Rio de Janeiro, Brazil	2-5	25 - 40 × 40 - 65(-70)	10-30(40) × 3-5 (2-5-septos)	35-100(-110) × 3-4 (2-8-septos)	Este Trabalho

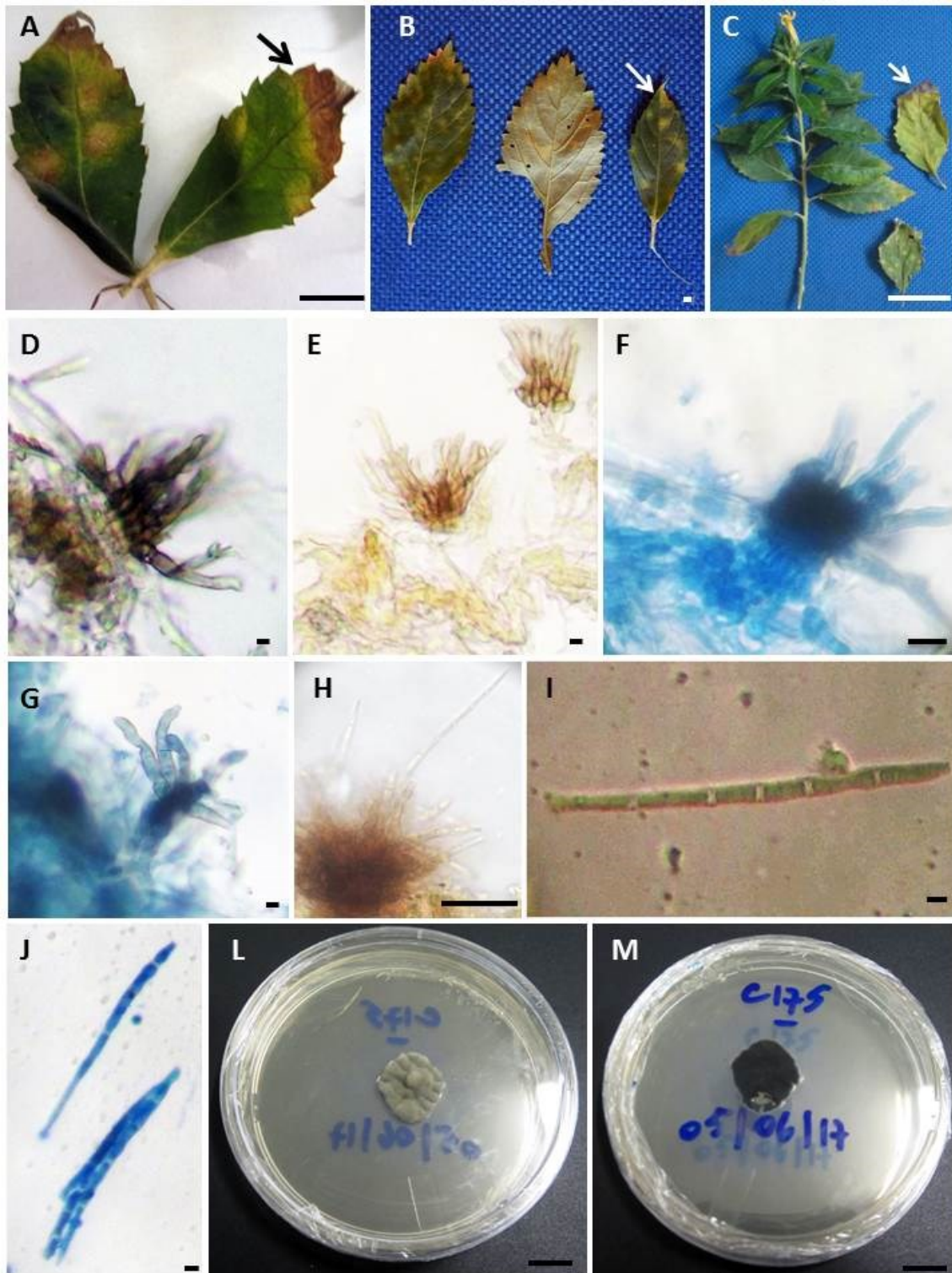


Figura 33. A-M: *Pseudocercospora* em folhas de *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae). A-C: Sintomas (Barras = 5 mm; 1 mm; 5 mm). D-H: Estroma e conidióforos (Barras = D-E: 5 μ m; F: 30 μ m; G: 5 μ m; H: 50 μ m). I: Conídio solitário (Barra = 5). J: Grupo de conídios (Barra = 5). L-M: Colônia de *Pseudocercospora* em meio de cultura BDA $\pm 25^{\circ}\text{C}$ /15 dias (Barra = 1 cm).

4.5.13 *Pseudocercospora* em folhas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (*Fabaceae*) (Fig. 34-35). Provável espécie nova n° 14.

Descrição: *Manchas foliares* até 10-25 mm de diâmetro, anfigenas, esparsas, às vezes confluentes, circulares ou irregulares, amareladas tornando-se marrom-avermelhados, centro marrom-claros tornando-se necrosados de coloração marrom-escuros e centros acinzentados. *Micélio interno*, pálido para marrom-claro. *Hifas* 2-5 µm de largura, pálidas para marrom-pálido, septadas, ramificadas. *Estromas* (10) 20-60 × (15) 25-100 µm de largura, marrons, subepidermais, irrompentes, composto por *textura angularis*, *células* 4-7 µm. *Conidióforos* 25-42 × 3-5 µm, retos a sinuosos, às vezes curtos. *Conídios* 39- 120 × 3-5 µm, 3-17-septos, sinuosos para curvados, raramente retos, subcilíndrico para obclavados, lisos, hialinos a pálidos, atenuados no ápice, truncados na base, não cicatrizados.

Espécime examinado: **Brasil:** Rio de Janeiro, Seropédica, UFRRJ. Em folhas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (*Fabaceae*). 13/11/2017. Col. Jonas Dias de Almeida 35 (UFRJ 12593).

Discussão: Verificou-se na tabela 24 que a espécie encontrada em *Vigna unguiculata* mostrou-se próxima das espécies *Pseudocercospora mucunae-ferrugineae* (W. Yamam) Deighton, 1976 (= *Cercospora mucunae-ferrugineae* W. Yamam). *Pseudocercospora pouzolziae* (Syd.) Y.L. Guo & X.J. Liu (GUO & LIU, 1992) e *Pseudocercospora* sp. (ANDRADE, 2016). *P. mucunae-ferruginea* forma conídios mais curtos 25–130 µm e conidióforos (10–40 µm) um pouco mais curtos e difere principalmente por ser deprovido de estromas, para a espécie reportada por CHUPP (1954) no gênero *Cercospora*, *C. mucunae-ferrugineae* forma conídios (35–80 µm) e conidióforos (10 – 40 µm), mais curtos e estromas menores; *P. pouzolziae* forma conídios (30-110 µm) mais curtos e conidióforos (20-55 µm) pouco mais longos e estroma menor (15-45 µm) e foi reportada em hospedeiro distinto; *Pseudocercospora* sp. foi descrita em *Vigna unguiculata* no Estado do Rio de Janeiro, apresenta lesões anfigenas menores, *estromas* (17-52 × 22-96) menores, conidióforos (20-45 × 3-5) pouco mais curtos e conídios (40-150 × 2-5) mais longos e pouco mais finos. Conclui-se que a espécie encontrada, trata-se provavelmente de uma nova espécie de *Pseudocercospora* em *Vigna unguiculata* no Estado do Rio de Janeiro.

Tabela 20. Características de *Pseudocercospora* em folhas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. comparadas com espécies de *Pseudocercospora* já descritas em hospedeiros da família *Fabaceae*.

Espécies	Hospedeiro	Local	Mancha (mm)	Estroma (µm)	Conidióforo/ Septação (µm)	Conídio/ Septação (µm)	Referências
<i>Pseudocercospora stizolobii</i>	<i>Mucuna</i> sp.	Filipinas	-	Ausente	-	35-60 × 3,5 – 5 (3-7)	Sydow e Sydow, (1913)
<i>Cercospora stizolobii</i>	<i>Mucuna</i> sp., <i>M. capitata</i> , <i>M. ferruginea</i>	California, Filipinas	2-5	Até 40	10-40 × 3-4	35-80 × 3,5 – 5 (1-7(3)-septos)	Chupp (1954)
<i>Pseudocercospora mucunae-ferruginea</i>	<i>M. ferruginea</i> <i>M. macrocarpa</i>	Taiwan	-	Ausente	10-40 × 3-4	25-130 × 3–4,5/ (3-7-septos)	Guo e Hsieh (1995)
<i>Cercospora mucunae-ferruginea</i>	<i>Mucuna</i> sp., <i>M. capitata</i> , <i>M. ferruginea</i>	California, Filipinas	-	Até 40	10–40 × 3–4	35–80 × 3,5-5 (1- (3)7-septos)	Chupp (1954)
<i>P. purpurea</i>	<i>Persea americana</i>	Brasil	-	Ausente	-	-	Cooke (1878); Deighton (1976); Braun e Freire (2006);
<i>P. pouzolziae</i>	<i>Gonostagia hirta</i>	Taiwan	1-5	15-45	20-55 × 3-4/0-4	30-110 × 3-4 (5) (3-12-septos)	Guo e Hsieh (1995)
<i>Pseudocercospora</i> sp.	<i>Vigna unguiculata</i>	Brasil	7-10	22-96 × 17-52	20-45 × 3-5 (2-6-septos)	40-150 × 2-5 (2-13-septos)	Andrade (2016)
<i>Pseudocercospora</i> sp.	<i>Vigna unguiculata</i>	Rio de Janeiro, Brasil	10-25 Anfigenas	(10) 20-60 × (15) 25-100	25-42 × 3-5	39-120 × 3-5 (3-17-septos)	Este trabalho

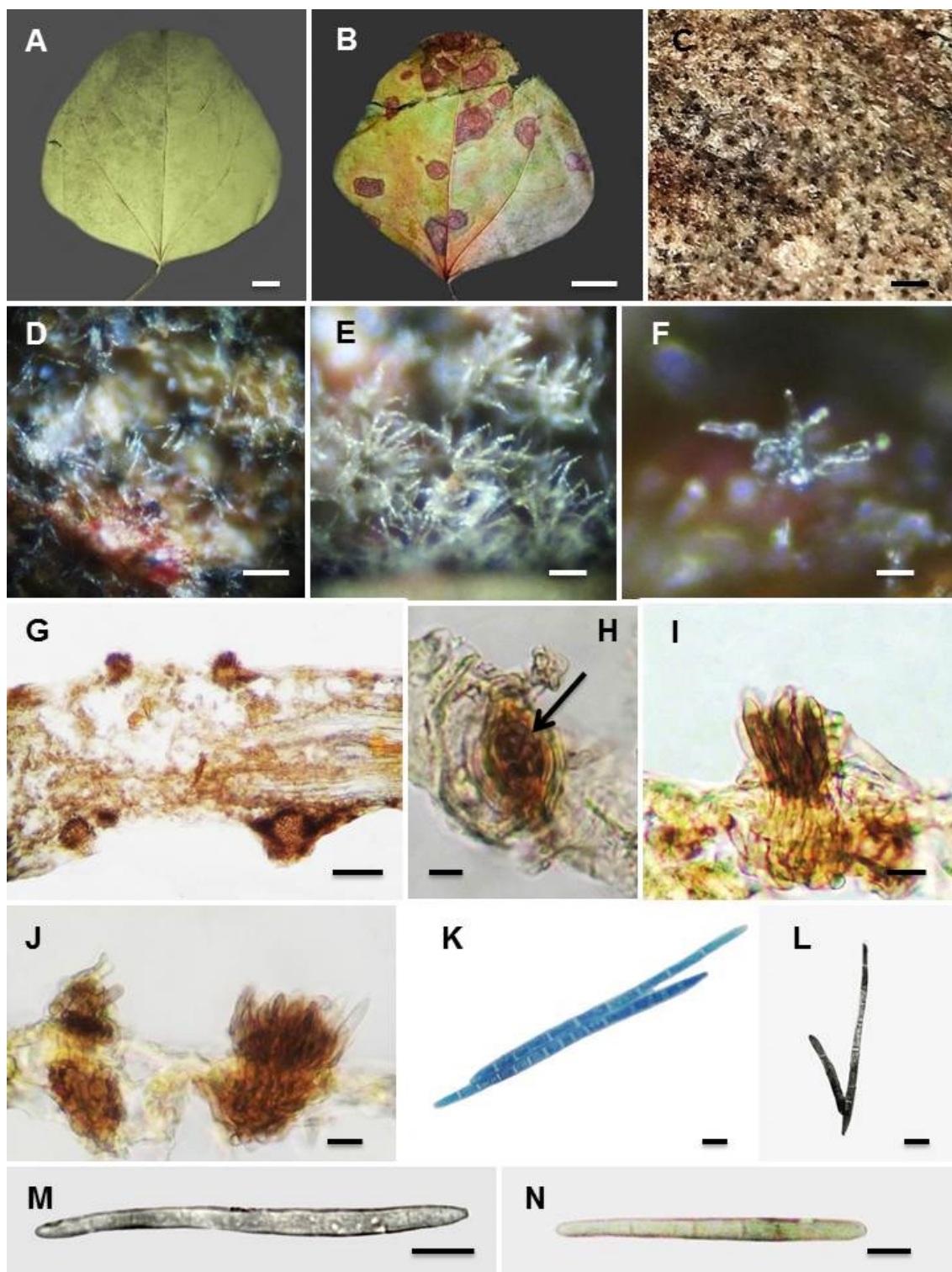


Figura 34. A-N: *Pseudocercospora* em folhas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (*Fabaceae*). A-C: Sintomas e estruturas vistas ao microscópio estereoscópico (Barras = A: 1 cm; B: 2 cm; 200 μ m). **D-F:** Estroma e conidióforos vistos ao microscópio óptico no aumento de 10 e 20x (Barras = D: 100 μ m; E: 30 μ m; F: 10 μ m). **G:** Estruturas anfigenas (Barra = 50 μ m). **H:** Estroma e conidióforo emergindo do estômato do hospedeiro (Barra = 30 μ m). **I-J:** Estroma e conidióforos (Barra = 20 μ m). **K-L:** Grupo de conídios (Barra = 10 μ m). **M-N:** Conídio solitário (Barra = 10 μ m).

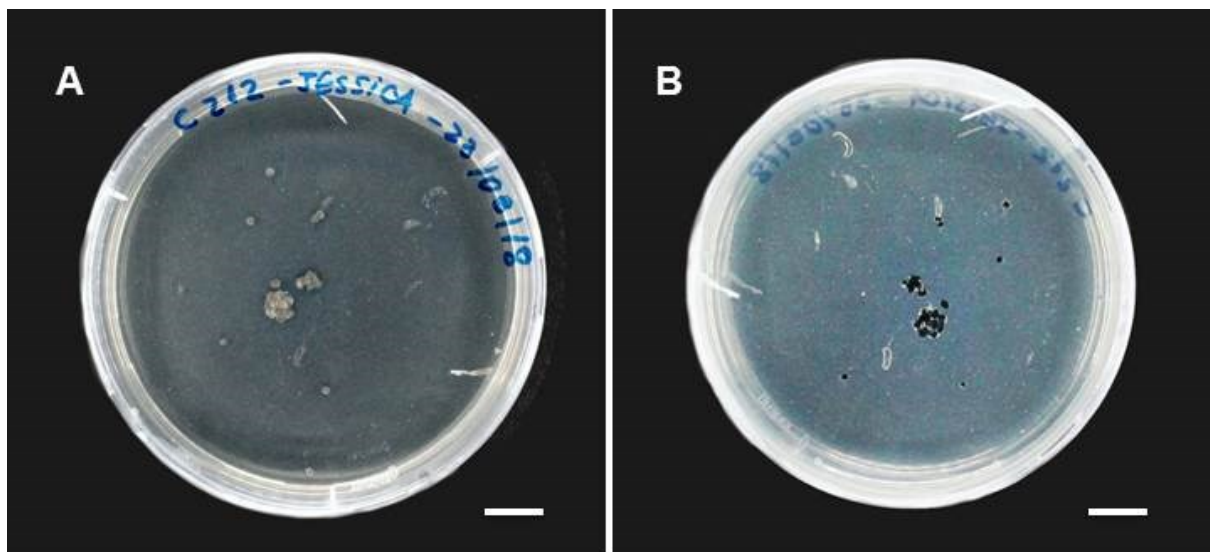


Figura 35. A-B: *Pseudocercospora* sp. em meio de cultura BDA a ± 25 °C/ 15 dias (Barra = 1 cm).

4.5.14 *Pseudocercospora* sp. em folhas de *Macroptillum lathyroides* (L.) Urb. (*Fabaceae*) (Fig. 36). Provável espécie nova n° 16.

Descrição: *manchas* 3-10 mm de diâmetro, acinzentadas à escuras, necróticas, irregulares a arredondadas na parte, epífilas; *Micélio* anfigeno denso, colonizando tricomas; *hifas* internas evidentes e numerosas com 3-5 µm de diam. *Estromas* densos com 10-77 × 14-67 µm, com células variando entre 3-8 µm de diâmetro; *Conidióforos* 14-43 × 3-5 µm, não ramificados, hialinos, pequenos, 1-5 septos. *Célula conidiogênica* integrada, com *loci* conidiogênicos incospicuos. *Conídios* 29-91 × 2-4 µm, solitários, hialinos, 2-7-septos.

Espécime examinado: **Brasil:** Rio de Janeiro. Seropedica. Em folhas de *Macroptillum lathyroides* (*Fabaceae*) "Feijão-de-Pombinha". 29/09/2017. Col. Jonas Dias de Almeida 20 (UFRJ 12555).

Discussão: Estão listados na Tabela 1 vários cercosporóides reportados em *Macroptillum* (Benth.) Urb. e outras *Fabaceae* comparados com o encontrado no Estado do Rio de Janeiro onde, pode-se verificar que todos mostraram-se com diferenças no tamanho e forma dos conídios, conidióforos e estromas quando comparadas com a espécie aqui estudada.

Tabela 21. Características de *Pseudocercospora* sp. em folhas de *Macroptilium lathyroides* comparadas com espécies já descritas em diferentes hospedeiros da família *Fabaceae*.

Fungo	Hospedeiro	Local	Manchas (mm)	Estroma (µm)	Conidióforos (µm)	Conídios (µm)	Referencis
<i>Pseudocercospora Cruenta</i>	<i>Canavalia</i> sp; <i>Phaseolus lunatus</i> ; <i>P. mungo</i> ; <i>Vigna sinensis</i> ; <i>V. sesquipedalis</i>	China	1-15	Pequeno	10-70 × 3-6 (0-3-septos)	40-150 × 2,5-5 (4-14-septos)	Guo e Hsieh (1995)
<i>Cercospora Cruenta</i>	<i>Glycine max</i> ; <i>P. (acotiniifolius, adenanthus, lunatus, vulgaris, semierectus, lathyroides)</i> , <i>Vigna (antillana, catjang, sinensis)</i>	EUA Filipinas	1-10	-	10-75 × 2,5-5 (0-2-septos)	25-150 × 2-5 Multisaptado	Chupp (1954)
<i>P. cruenta</i>	<i>Vigna unguiculata</i>	Brasil		40-60 × 30-50	10-35 × 3-4	27-150 × 2-5	Batista <i>et al.</i> (1960)
<i>Pseudocercospora nigricans</i>	<i>Cassia occidentalis</i> ; <i>C. torosa</i>	Taiwan	-	Ausente	30-125 × 3-5 (3-6-septos)	30-80 × 3 (3-5(10)-septos)	Guo e Hsieh (1995)
<i>P. nigricans</i>	<i>Cassia (acutifolia, Auriculata, Fasciculata; Fistula, Grandis, Renigera, Torosa)</i> , <i>Chamaecrista nictitans</i> ; <i>Macroptilium lathyroides</i> ; <i>Senna (alata, marilandica Obtusifolia, occidentalis, sophera, Tora)</i>	África, Ásia; EUA Índia Oceania, América do Sul	2-6	10-40	15-69 × 3-5 (0-6-septos)	10-53 × 2,5-4 (0-5-septos)	Phengsintham <i>et al.</i> (2013)
<i>P. stizolobii</i>	<i>Mucuna (aterrima, capitata, deeringiana, ferrugínea, Nivea, pruriens, prurita)</i>	África, Ásia, EUA, Índia	1-6	20-50	50-118 × 3-4 (3-7-septos)	17-64 × 4-5 (1-7-septos)	Phengsintham <i>et al.</i> (2013)
<i>P. mucunae-ferrugineae</i>	<i>M. ferrugínea</i> <i>M. macrocarpa</i>	Taiwan		Ausente	10 - 40 × 3 - 4	25 - 130 × 3 - 4,5	Guo e Hsieh (1995)
<i>Cercospora stizolobii</i>	<i>Mucuna</i> sp., <i>M. capitata</i> , <i>M. ferrugínea</i> ,	EUA, Filipinas	2-5	Até 40	10 - 40 × 3 - 4	35 - 80 × 3,5 - 5 (1-7(3)-septos)	Chupp (1954)
<i>Pseudocercospora</i> sp.	<i>Macroptilium lathyroides</i>	Rio de Janeiro, Brasil	3-10	10-77 × 14-67	14-45 × 3-5 (1-3-septos)	29-91 × 2-4 (2-7-septos)	Este trabalho

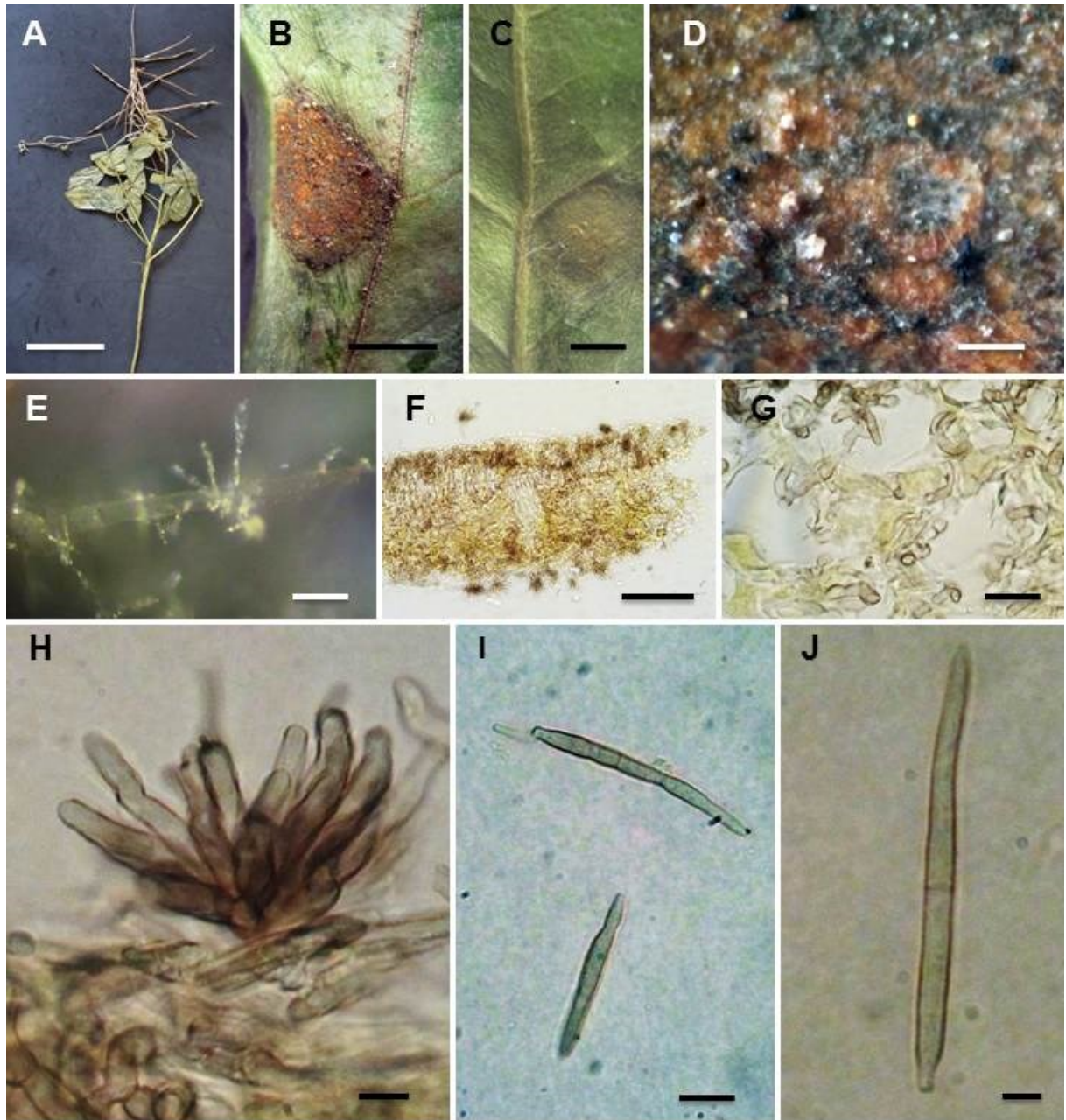


Figura 36. A-J: *Pseudocercospora* sp. em folhas de *Macropitillum lathyroides* (L.) Urb. (*Fabaceae*). A-D: Sintomas (Barra = A: 8 mm; B: 2mm; C: 2 mm; D: 200 μ m). E: Micélio colonizando o tricoma foliar visto ao microscópio ótico no aumento de 20x (Barra = 40 μ m). F: Estruturas anfigenas (Barra = 200 μ m). G: Micélio interno (Barra = 20 μ m). H: Conidióforos (Barra = 10 μ m). I: Grupo de conídios (Barra = 15 μ m), J: Conídio solitário (Barra = 5 μ m).

**4.5.15 *Pseudocercospora* sp. em folhas de *Hibiscus sabdariffa* L. (*Malvaceae*) (Fig. 37).
Provável espécie nova n° 17.**

Descrição: *manchas foliares* 2-5 mm diâmetro, circulares, pequenas, na parte adaxial com centro escuro necrótico e halo avermelhado; *Micélio* anfigeno, mais facilmente encontrado na parte adaxial. *Estromas* 3-16 × 7-16 µm, escuros, com células 3-8 µm, pouco visíveis; *Conidióforos* 62-101 × 3-5 µm, 0-4-septos, pálidos a castanho claro, longos; *Conídios* 24-72×3-5 µm, solitários, hialinos, reto a sinuosos, com ausência de cicatriz, 2-7-septos.

Espécime examinado: **Brasil:** Rio de Janeiro. Seropedica. *Em folhas de Hibiscus sabdariffa* (*Malvaceae*) “caruru-azedo”. 10/06/2017. Col. Jucimar Moreira de Oliveira 31 (UFRJ 12483).

Discussão: O fungo encontrado em *H. sabdariffa* trata-se de uma *Pseudocercospora* Speg. Vários *cercosporóides* já foram relatados no gênero *Hibiscus* L. e família *Malvaceae* Juss. (Tabela 2), onde verifica-se que todos diferem da espécie encontrada no Estado do Rio de Janeiro, com exceção de *Pseudocercospora minuta* todos apresentam micélio anfigeno. *P. brachypoda* (Speg.) U. Braun, encontrada em *Hibiscus* sp. se aproxima em tamanhos de conídios, mas difere muito nos tamanhos de conidióforos. Assim podendo ser uma nova espécie de *Pseudocercospora* encontrada neste hospedeiro.

Tabela 22. Características de *Pseudocercospora* sp. em folhas de *Hibiscus sabdariffa* comparadas com espécies de *Cercospora* e *Pseudocercospora* já descritas em hospedeiros da família *Malvaceae*.

Fungo	Hospedeiro	Local	Manchas (mm)	Estroma (µm)	Conidióforos (µm)	Conídios (µm)	Referências
<i>Cercospora malayensis</i>	<i>Hibiscus esculentus</i>	Los banos, Provincia de Laguna, Filipinas	Anfigenas		25-260 × 3-5 (1-8-septos)	50-270 × 2,5-4	Solheim e Stevens (1931)
<i>Cercospora malayensis</i>	<i>H. abelmoschus</i>	EUA, Jamaica, Brasil, Salvador, África do Sul, Venezuela.	3-30	Até 50	25-260 × 3-5,5	25-150 (270) × 2-5	Chupp (1954)
<i>Pseudocercospora abelmoschi</i>	<i>H. cannabinus</i>	China	3-6 Anfigenas	15-50	10-35 × 3-5 (0-3-septos)	20-87,5 × 3-5 (3-7-septos)	Guo e Hsieh (1995)
<i>Cercospora abelmoschi</i>	<i>H. cannabinus</i> ; <i>H. esculentus</i> ; <i>H. manihot</i> ; <i>H. sabdariffa</i>	EUA, Puerto Rico, Santo Domingo, Jamaica, Trindade, Japão.	Indistinto	-	20-90 × 3 (1-8-septos)	20-140 × 3,5-5	Chupp, 1954
<i>P. hibiscina</i>	<i>H. macrophyllus</i>	China	3-10	2-3	Até 930 × 4-5	20-70 × 4-5 (1-4-septos)	Guo e Hsieh (1995)
<i>P. hibisci-mutabilis</i>	<i>H. cannabinus</i>	Taiwan			7-31.5 × 3.5-4 (0-1-setos)	24-56 × 2,5-4 (2-6-septos)	Hsieh e Goh (1990)
<i>P. hibisci-cannabini</i>	<i>H. cannabinus</i> ; <i>H. rosa-senensis</i> ; <i>H. syriacus</i>	Taiwan	1-5 Anfigenas		9-45 × 3-4:0-3	25-120 × 3-4 (2-13-septos)	Guo e Hsieh (1995)
<i>P. minuta</i>	<i>Campanula aparinoides</i>	Estados Unidos	3-20 Hipófilos	15-40	5-10 × 1-2		Chupp (1954)
<i>P. hibiscigena</i>	<i>Hibiscus</i> sp.	Nepal	Anfigenas	7-13	14-26 × 1,5-4.0 (1-2-septos)	24-63,5 × 1,5-3,5(2-5-septos)	Parasnath <i>et al.</i> (1996)
<i>P. brachypoda</i>	<i>Hibiscus</i> sp.	Porto Rico, Argentina, EUA	2-20	presente	20-200 × 4-5,5 (1-2-septos)	25-65 × 2-3,5 (2-4-septos)	Chupp (1954); Braun (2000)
<i>Pseudocercospora</i> sp.	<i>Hibiscus sabdariffa</i>	Rio de Janeiro, Brasil	2-5 Anfigenas	3-16 × 7-16	62-101 × 3-5	24-72 × 3-5 (2-7-septos)	Este trabalho

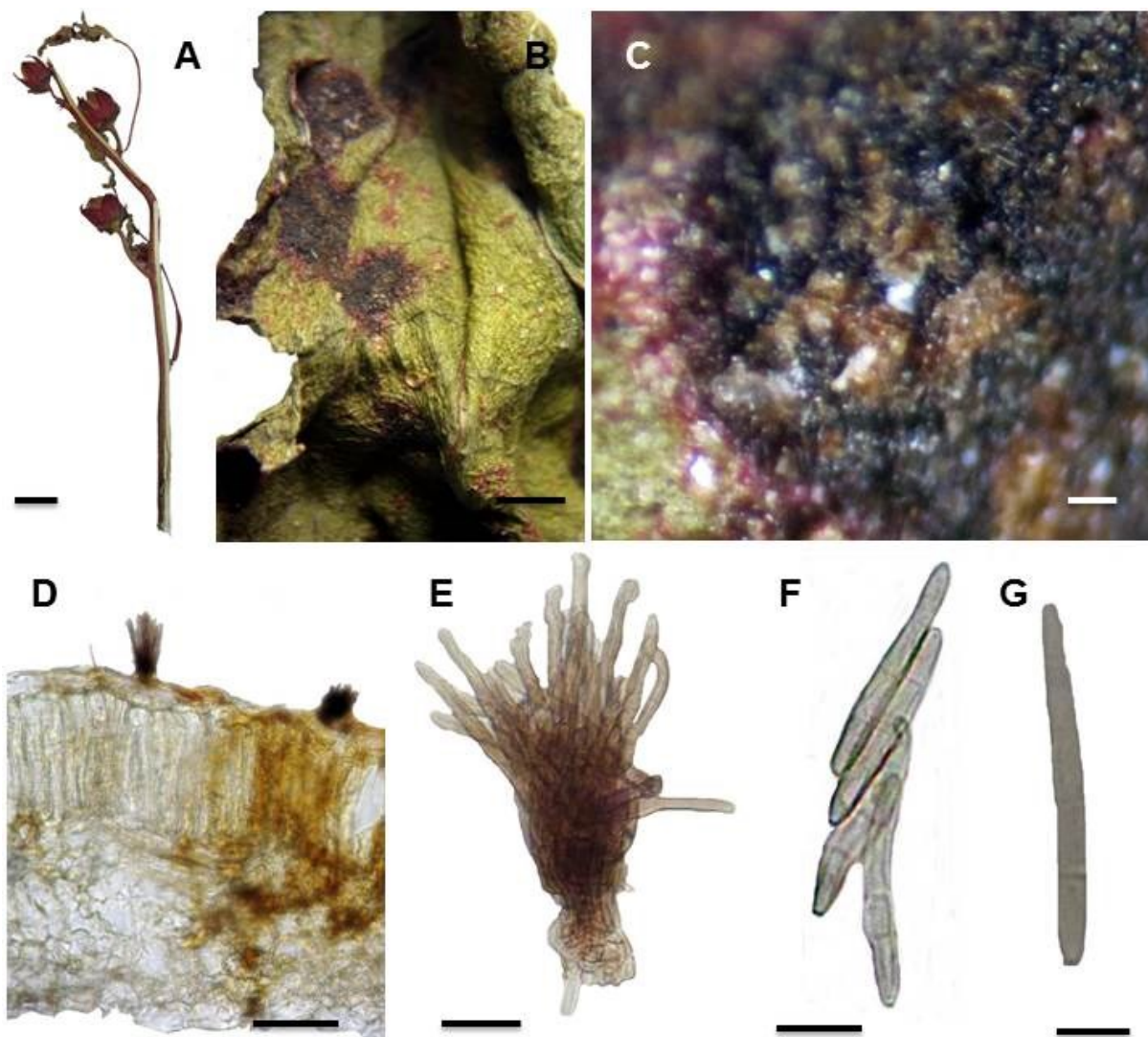


Figura 37. A-G: *Pseudocercospora* sp. em folhas de *Hibiscus sabdariffa* (*Malvaceae*). A-C: Sintomas (Barra = A: 20 mm; 2 mm; 10 μ m). D: Estruturas epífilas (Barra = 50 μ m). E: Conidióforos (Barra = 20 μ m). F: Grupo de conídios (Barra = 20 μ m). G: Conídio solitário (Barra = 10 μ m).

4.6 Análise das sequências genéticas encontradas em 15 espécies

As sequências genéticas foram obtidas através da extração, amplificação por PCR e sequenciamento, através dos iniciadores ITS1 E ITS4, que amplificam a região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal (considerada uma região extremamente conservada) dos seguintes isolados: C175, C177, C197, C201, C205, C206, C207, C209, C211, C212, C214, C215, C216, C217, C218. Para as espécies dos hospedeiros *Bougavillea glabra*, *Triplaris americana*, *Leucaena leucocephala*, *Macroptillum lathyroides* e *Hibiscus sabdariffa*, não foi possível o isolamento do fungo devido ao seu lento crescimento e contaminação por fungos saprófitos, e portanto não se obteve sequências genéticas para estas espécies descritas morfologicamente.

As sequências obtidas foram comparadas com espécies de material-tipo presentes no GenBank através da análise Blast/NCBI, comprovando-se que as espécies isoladas pertencem ao grupo dos cercosporóides. Entretanto a região ITS não foi suficiente para delimitar cada sequência dentro de espécies dentro do material tipo para cada sequência. As sequências obtidas foram idênticas a várias espécies de material tipo presentes no Genbank, apresentando 99-100% de similaridade. Onde algumas delas estão representadas na árvore filogenética sendo demonstradas na figura 38 com seus respectivos códigos de acesso no GenBank (com sequências de *Pseudocercospora* presentes em Silva (2016) e *Cercospora* presentes em Nguanhom *et al.* (2016) e Groenewald *et al* (2005) e com o outgroup presente em Goodwin *et al.* (2011)).

A árvore filogenética discutida foi gerada pelo programa Mega 6, baseando-se na região ITS do DNA ribossomal utilizando-se das sequências obtidas neste estudo, as quais foram agrupadas em 7 grupos distintos entre os gêneros de *Pseudocercospora* e *Cercospora* com mais de 99 % de similaridade. Sendo cada espécie referente a um hospedeiro distinto, como segue na figura 39.

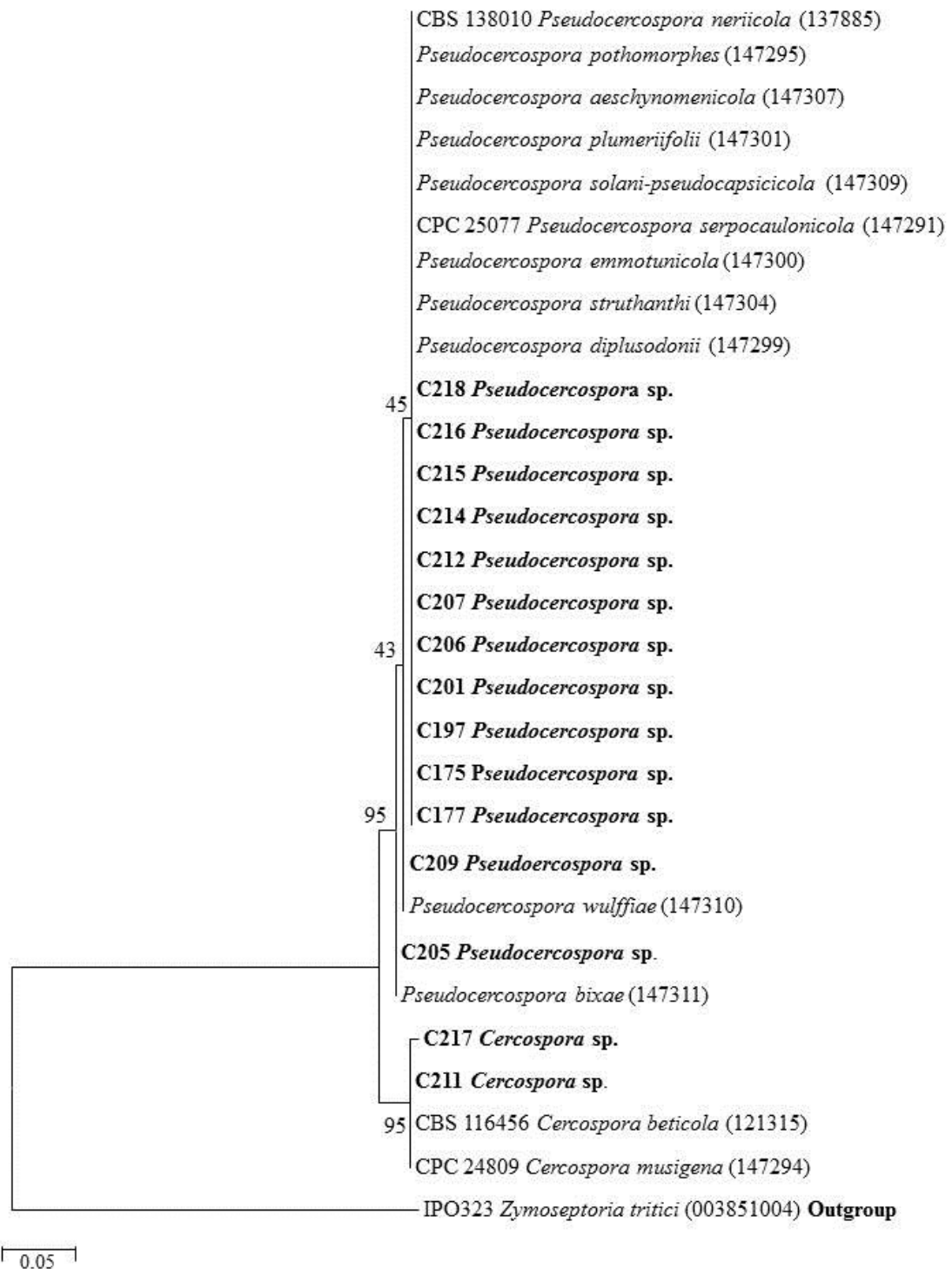


Figura 38. Árvore filogenética baseada na região IT1-5.8S-ITS2 mostrando a relação dos novos isolados agrupados nos generos de *Pseudocercospora* e *Cercospora* com similaridade com outras espécies dos gêneros presentes em Silva (2016b), Nguanhom et al. (2016), Groenewald et al (2005) e Goodwin et al. (2011). A significância de cada ramo é indicada pelo valor de Bootstrap (maior que 50%) calculado com 1000 repetições. Barra indica 5 substituição a cada 100 nucleotídeos.

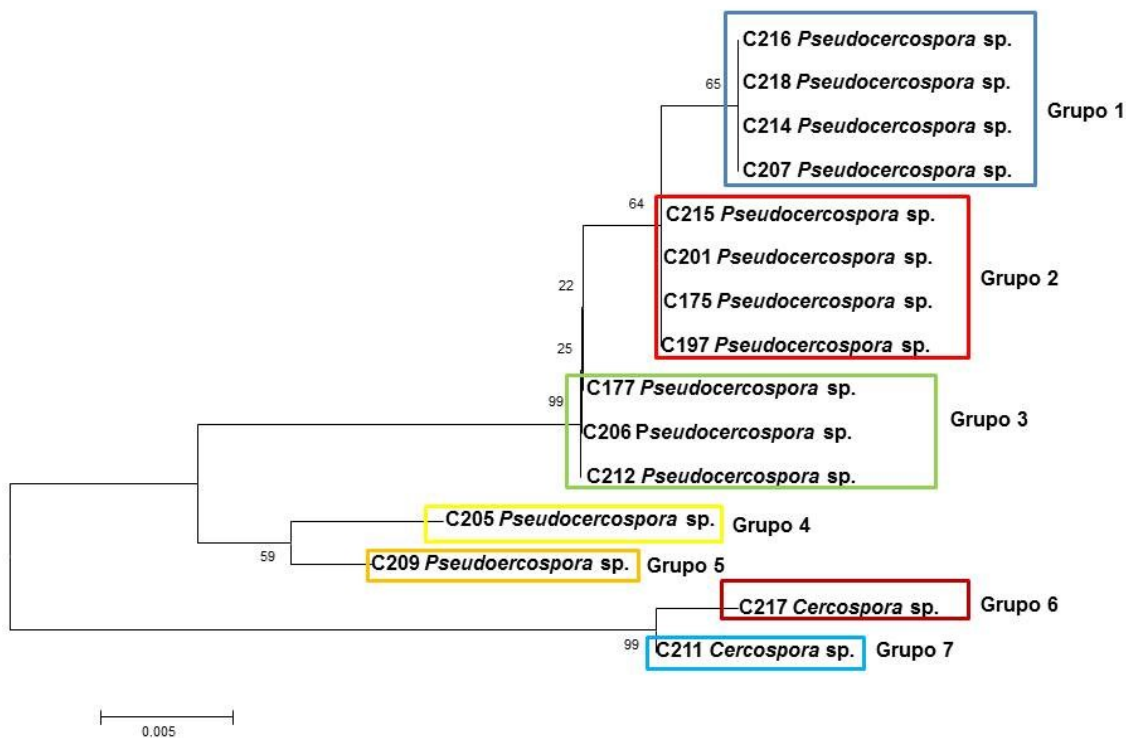


Figura 39. Árvore filogenética baseada na região IT1-5.8S-ITS2 mostrando a relação dos novos isolados agrupados nos generos de *Pseudocercospora* e *Cercospora*. A significância de cada ramo é indicada pelo valor de Bootstrap (maior que 50%) calculado com 1000 repetições. Barra indica uma substituição a cada 5 nucleotídeos.

Em relação às espécies presentes em cada grupo, foi observado que, apesar de apresentarem mais de 99% de similaridade genética, as mesmas apresentam características morfológicas distintas. No grupo 1 estão descritas 4 espécies do gênero *Pseudocercospora* nos hospedeiros *Crotalaria incana*, *Croton lobatus*, *Muntingia calabura* e *Eucalyptus grandis*. A espécie descrita em *Crotalaria incana* apresenta característica de estroma similar ao isolado C218 descrita em *Cróton lobatus*, porém apresenta manchas epífilas com conidióforos (21-45 × 4-7) mais largos e conídios (35-90 × 4-6) menores e mais largos. C218 por sua vez, apresenta manchas epífilas como apresentado nos isolados C216 e C214 encontrados nos hospedeiros *Muntingia calabura* e *Eucalyptus grandis* respectivamente, apresentam características de estroma maiores, conidióforos menores e conídios bem próximos aos de C218, sendo o isolado C214 apresentando conídios (30-70 × 2-3) um pouco mais curtos e mais finos.

No grupo 2 estão presentes 4 espécies do gênero *Pseudocercospora* nos hospedeiros *Turnera ulmifolia*, *Canavalia ensiformis*, *Solanum americanum*, *Solanum cernuum*, apresentando lesões foliares anfigenas com escasso do isolado C197 que apresentou lesões epífilas. C197 e C201 são isolados pertencentes à família *Solanaceae*, mas possuem características morfológicas distintas como a presença de estromas (25-55 × 50-90) e conídios

(35-145 × 3-5) maiores e conidióforos (27-45 × 4) menores em *Solanum cernuum* que os observados em *Solanum americanum*. C215 apresenta estroma bem reduzido em altura e comprimento, e conidióforos bem mais curtos quando comparado aos demais isolados presentes neste grupo, apresentando conídios maiores que os observados nos isolados C201 e C215, entretanto um pouco menores comparados a C197 que apresenta lesões epífilas.

No grupo 3, estão presentes 3 espécies do gênero *Pseudocercopora* nos hospedeiros *Phaseolus vulgaris*, *Centraterum punctatum* e *Vigna unguiculata*, aos quais todos os isolados presentes apresentam lesões foliares anfigenas. Sendo os hospedeiros *P.vulgaris* e *V. unguiculata* pertencentes à mesma família botânica (*Fabaceae*), porém suas características morfológicas diferem em tamanho de estroma e conídios apresentando-se um pouco menores em *P. vulgaris* quando comparados aos dados presentes em *V. unguiculata*, que por sua vez apresenta conídios (39-120 × 3-5) maiores e mais largos.

Os grupos 4 e 5 apresentaram-se 2 espécies do gênero *Pseudocercospora*, distantes dos demais isolados na árvore filogenética com 59 % de similaridade, demonstrando-se que possuem características moleculares distintas dos demais e entre si. Bem como mostra suas características morfológicas na tabela de comparação. O grupo 4 esta representado pelo isolado c205 descrito em *Bixa orellana*, com características de estroma e conídios um pouco maiores que os apresentados pelo isolado c209 descrito em *Handroanthus impetiginosus*, o qual apresenta por sua vez conídios bem maiores (26-115 (130) × 3-5).

Nos grupos 6 e 7, estão presentes 2 espécies do gênero *Cercopora* apresentando 99% de similaridade na árvore filogenética mas com distanciamento evidente, que os distingue molecularmente e classifica-os em dois grupos distintos, bem como pertencentes a outro gênero fúngico, como grupo externo ao gênero de *Pseudocercopora* presentes em maior numero na árvore filogenética. Além de se distanciarem molecularmente, também apresentam bem distintos morfológicamente, pois o isolado C217 descrito em *Solanum betaceum* apresenta valores de estroma (25-40 × 35-58 μm), conidióforos (30-190 × 4-5 μm) e conídios (35-160 × 4-5 μm) muito maiores que aqueles descritos em *Spinacea oleraceae*.

Crous *et al.* (2007) descrevendo a espécie *Pseudocercospora norchiensis*, salientou que a região ITS para amplificação do DNA fúngico de espécies de cercosporóides seria uma região conservada, que apresenta similaridade com diversas espécies presentes no GenBank, quando comparadas com sua sequência e que também foi demonstrada identidade genética igual a *Pseudocercospora nogalesii* descrita por Braun *et al.*, (2003), ambos em *Eucalyptus* sp., e o autor concluiu que apesar de apresentarem-se idênticas molecularmente, apresentam características morfológicas únicas que as distinguem das demais, podendo assim classificá-las com novas espécies a serem descritas. E assim, podemos considerar as espécies aqui descritas, como sendo novos táxons baseando-se na identidade do gene ITS, associado às características morfológicas presentes nas espécies encontradas em hospedeiro distintos.

E após essas informações fornecidas por Crous *et al.* (2007), vários outros estudos subsequentes baseados na combinação de informação morfológica e advindas de sequências de DNA confirmaram o reconhecimento de gêneros segregados de *Cercospora* (MINNIS *et al.* 2011; BRAUN *et al.* 2013, 2014, 2015; CROUS *et al.* 2013; GROENEWALD *et al.* 2013; QUAEDVLIEG *et al.* 2014; BAKHSHI *et al.* 2015).

Tabela 21. Patógenos e hospedeiros identificados em 7 grupos distintos pela análise filogenética e comparados morfológicamente.

Grupo molecular	Gênero	Isolado	Manchas	Estroma	Conidióforos	Conídios	Hospedeiro
1	<i>Pseudocercospora</i>	C207	3-6/ Epífilas	10-20 × 10-22	24-40 × 3-4 (2-4-septos)	42-102 × 2-4 (1-10-septos)	<i>Crotalaria incana</i>
	<i>Pseudocercospora</i>	C218	2-5/ Anfígenas	10-20 × 12-35	21-45 × 4-7 (2-4-septos)	35-90 × 4-6 (2-7-septos)	<i>Croton lobatus</i>
	<i>Pseudocercospora</i>	C216	1-4/ Epífilas	15-30 × 30-55	15-35 × 3-5 (0-1-septos)	20-90 × 4-6 (3-7-septos)	<i>Muntingia calabura</i>
	<i>Pseudocercospora</i>	C214	2-15/ Epífilas	10-28 × 15-40	11-40 × 2-3 (2-4-septos)	30-70 × 2-3 (3-7-septos)	<i>Eucalyptus grandis</i>
2	<i>Pseudocercospora</i>	C175	2-5/ Anfígenas	25-40 × 40-65(-70)	10-30(40) × 3-5 (2-5-septos)	35-100(-110) × 3-4 (2-8-septos)	<i>Turnera ulmifolia</i>
	<i>Pseudocercospora</i>	C215	5-10/ Anfígenas	10-18 × 15-30	20-75 × 4 (0-3-septos)	43-82 × 3-4 (3-6-septos)	<i>Canavalia ensiformis</i>
	<i>Pseudocercospora</i>	C201	2-5/ Anfígenas	10-40 × 15-58	14-50 × 3-4 (0-1-septos)	40-90 × 2-5 (2-10-septos)	<i>Solanum americanum</i>
	<i>Pseudocercospora</i>	C197	4-25/ Epífilas	25-55 × 50-90	27-45 × 4	35-145 × 3-5 (5-12-septos)	<i>Solanum cernuum</i>
3	<i>Pseudocercospora</i>	C206	5-25/ Anfígenas	25-40 × 30-65	25-95 × 4-5 (2-4-septos)	20-100 × 3-4 (1-9-septos)	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	<i>Pseudocercospora</i>	C177	3-15/ Anfígenas	25 - 45 × 25-65(-70)	25-60 × 4 (2-4-septos)	35-75 × 4 (2-6-septos)	<i>Centraterum punctatum</i>
	<i>Pseudocercospora</i>	C212	10-25/ Anfígenas	(10) 20-60 × (15) 25-100	25-42 × 3-5	39-120 × 3-5 (3-17-septos)	<i>Vigna unguiculata</i>
4	<i>Pseudocercospora</i>	C205	4-25/ Anfígenas	15- 35 × 25-48	15-40 × 3-4 (0-1-septos)	40-90 × 2-5 (2-10-septos)	<i>Bixa orellana</i>
5	<i>Pseudocercospora</i>	C209	3-9/ Anfígenas	20-50 × 20-50	15-50 × 3-5 (2-4- septos)	26-115 (130) × 3-5 (4-13-septos)	<i>Handroanthus impetiginosus</i>
6	<i>Cercospora</i>	C217	2-5/ Anfígenas	25-40 × 35-58	30-190 × 4-5	35-160 × 4-5 (3-17-septos)	<i>Solanum betaceum</i>
7	<i>Cercospora</i>	C211	2-8/ Anfígenas	15-33 × 25-40	25-50 × 4-6 (0-3-septos)	20-86 × 3-4 (1-10-septos)	<i>Spinacea oleraceae</i>

5 CONCLUSÃO

Foram encontradas 20 espécies de cercosporoides as quais foram identificadas e caracterizadas morfologicamente dentro dos gêneros de *Camptomeris*, *Cercospora*, *Cylindrosporium*, *Pluripassalora* e *Pseudocercospora*.

As espécies aqui descritas dentro do gênero de *Cercospora* e *Pseudocercospora*, podem ser consideradas como sendo novos táxons baseando-se na identidade do gene ITS, associado às características morfológicas presentes nas espécies encontradas em hospedeiros distintos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, K. M. **Caracterização de fungos cercosporóides associados à vegetação de Mata Atlântica e cercanias no Estado do Rio de Janeiro**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada. Rio de Janeiro. 136 f. 2016.
- BAKER, R.E.D.; DALE, W.T. Fungi of Trinidad & Tobago. **Mycological Papers**, v. 33, 123 p. 1951.
- BARR, D. J. S.. An outline for the reclassification of the *Chytridiales*, and for a new order, the Spizellomycetales. **Canadian Journal of Botany**. v. 58. 22 ed. p. 2380-2394. 1980. Disponível em: <http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?TableKey=14682616000000061&Rec=4566&Fields=All>. Acesso em 10 jul 2018.
- BATISTA, A. C.; BEZERRA, J. L.; POROCA, D. J. M. Espécies novas de *Sphaeropsidaceae* e *Tuberculariaceae* de Brasília, D.F. e de Minas Gerais. Instituto de Micologia, Universidade do Recife. Publicação 480. **Atas do Instituto de Micologia. Universidade Federal de Pernambuco** – Recife, v.3. p. 150-167. 1966. Disponível em: <http://batista.fungibrasil.net/articles>. Acesso em 08 nov 2017.
- BATISTA, A. C.; SOUZA, R. G.; PERES, G. E. P. Alguns *Cercospora* estudados no IMUR. **Atas do Instituto de Micologia, Universidade do Recife**, v. 262, 1960.
- BRAUN, U. **Taxonomy of cercosporoid fungi**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, Brasília. Anais... Brasília: Sociedade Brasileira de Micologia, p. 154–158. 2005.
- BRAUN, U. . Taxonomic notes on some s of the *Cercospora* complex (VII). **Fungal Diversity**, v. 8, p. 41-71, 2001.
- BRAUN, U.; CROUS, P.W. Additions and corrections to names published in *Cercospora* and *Passalora*. **Mycotaxon**, v. 92, p. 395-416, 2005.
- BRAUN, U.; DAVID, J.; FREIRE, F.C.O. Some cercosporoid hyphomycetes from Brazil. **Cryptogamie Mycologie**, v. 20, n. 02, p. 95–106, 1999.
- BRAUN, U.; DICK, M. A. Leaf spot diseases of eucalypts in New Zealand caused by *Pseudocercospora* species. **New Zealand Journal of Forest Sciences**, v. 32, n. 02, p. 221-234, 2002.
- BRAUN, U.; FREIRE, F. C. O. Some cercosporoid *hyphomycetes* from Brazil - III. **Cryptogamie Mycologie**, v. 25, p. 221-244, 2004.
- BRAUN, U.; FREIRE, F. C. O. Some cercosporoid hyphomycetes from Brazil - II. **Cryptogamie Mycologie**, v. 23, n.04, p. 295 – 328, 2002.

BRAUN, U.; FREIRE, F. C. O. Some cercosporoid hyphomycetes from Brazil - III. **Cryptogamie Mycologie**, v. 25, n.03, p. 221 – 244, 2004.

BRAUN, U.; FREIRE, F. C. O. Some cercosporoid hyphomycetes from Brazil - IV. **Cryptogamie Mycologie**, v. 27, n.03, p. 231 – 248, 2006.

BRAUN, U.; HILL, C. F.; DICK, M. New cercosporoid leaf spot diseases from New Zealand. **Australasian Plant Pathology**, v. 32, n. 1, p. 87-97. 2003.

BRAUN, U.; NAKASHIMA, C.; CROUS, P. W. Cercosporoid fungi (*Mycosphaerellaceae*) species on other fungi, *Pteridophyta* and *Gymnospermae*. **IMA Fungus**, v. 4, n.02, p. 265-345, 2013.

BRESSADOLA, J. Fungi aliquoti saxonici novi vel critici a. cl. W. Krieger lecti. *Cylindrosporium acicola* Bres., **Hedwigia**, v. 33, p. 208, 1894.

CARMICHAEL, J. W.; KENDRICK, W. B., CONNERS, J. L.; SIGLER, L. **Genera of Hyphomycetes**. 386 S., 129 Taf. The University of Alberta Press. Edmonton, Alberta, Canada, 1980.

CHOI, Y; CHEONG, S. S; HONG S. H; J. H. PARK; SHIN, H. D. **First Report of Leaf Spot Caused by *Pseudocercospora atomarginalis* on *Solanum americanum* in Korea**. Plant disease: Disease notes. v. 99, n° 5, p. 727, 2015. (<https://doi.org/10.1094/PDIS-09-14-0950-PDN>)

CHUPP, C. **Monograph of *Cercospora***. Ithaca: New York, 667 p. 1954.

CROUS, P. W.; BRAUN, U. ***Mycosphaerella* and its anamorphs**: 1. Names published in *Cercospora* and *Passalora*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, 571 p. 2003.

CROUS, P. W.; SUMMERELL, B. A.; CARNEGIE, A. J.; MOHAMMED, C; HIMAMAN, W; GROENEWALD, J. Z. Foliicolous *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs on *Corymbia* and *Eucalyptus*. **Fungal Diversity**. v. 26. 1 ed. 172 p. 2007.

CROUS, P. W., BRAUN, U., HUNTER, G. C., WINGFIELD, M. J., VERKLEY, G .J. M., SHIN, H.-D., NAKASHIMA, C., AND GROENEWALD, J.Z. Phylogenetic lineages in *Pseudocercospora*. **Studies in Mycology**, v. 75, p. 37-114. 2013.

CROUS, P. W., HYDE, K.D., GROENEWALD, J. Z., ANAN, C. Species of *Mycosphaerella* and related anamorphs on *Eucalyptus* leaves from Thailand. **Persoonia**, v. 21, p.77-91, 2008.

CROUS, P. W., LIEBENBERG, M. M., BRAUN, U., AND GROENEWALD, J. Z. Re-evaluating the taxonomic status of *Phaeoisariopsis griseola*, the causal agent of angular leaf spot of bean. **Studies in Mycology**, v. 55, p. 163-173. 2006.

CROUS, P .W.; ALFENAS, A.C.; BARRETO, R. W. Cercosporoid fungi from Brazil. 1. **Mycotaxon**, v. 64, p. 405 – 430, 1997.

CROUS, P. W.; ALFENAS, A. C.; BARRETO, R. W. Cercosporoid fungi from Brazil. **Mycotaxon**, v. 64, p. 419. 1997. Disponível em: <http://www.librifungorum.org/Image.asp?ItemID=282&ImageFileName=0418b.jpg>. Acesso em: 26 out 2017.

DEIGHTON, F. C. *Pseudocercospora crotalariae* (Pavgi & U.P. Singh). **Mycological Papers**. v. 140: p. 142. 1976.

DEIGHTON, F. C. Studies on *Cercospora* and allied genera. VI. *Pseudocercospora* Speg., *Pantospora* Cif. and *Cercoseptoria* Petr. **Mycological Papers**. v. 140: p.168. 1976.

ELLIS, J. B.; EVERHARD, B. M. *Cylindrosporium cercosporoides* Ellis & Everh. **Journal of Mycology**. v. 03, n. 1–12, p. 22, 1887.

ELLIS, M. B. **Dematiaceous Hyphomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute. 608 p. 1971.

ELLIS, M. B. **More Dematiaceous Hyphomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute. 507 p. 1976.

FARR, D. F., ROSSMAN, A. Y. **Fungal Databases**. Syst. Mycol. Microbiol. Lab., Online publication, ARS, USDA, Retrieved 16 September, 2017.

FARR, D.F., ROSSMAN, A.Y., PALM, M.E.; MCCRAY, E.B. **Fungal Databases**, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved september 19, 2017, from <http://nt.ars-grin.gov/fungalDATABASES> 2016.

FITZPATRICK, D. A.; LOGUE, M. E.; STAJICH, J. E.; BUTLER G. A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. **BMC Evolutionary Biology**. v. 6. n. 99. p.1-15. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2148-6-99>. Acesso em 10 jul 2018.

FREIRE, F. C. O. Lista atualizada dos fungos de plantas do Estado do Ceará (Brasil) – I Hifomicetos. **Revista Ciência Agronômica**, v.36, n.3, p.364-370, 2005.

FRESENIUS, G. **Beiträge zur Mykologie**. v. 3. p. 1-111. 1863.

FUCKEL, K.W.G.L. Fungi Rhenani exsiccati a L. Fuckel collecti. **Hedwigia**. v. 2. p. 132-136. 1863.

GOODWIN, S. B. *et al.* Finished Genome of the Fungal Wheat Pathogen *Mycosphaerella graminicola* Reveals Dispensome Structure, Chromosome Plasticity, and Stealth Pathogenesis. **PLOS Genetics**. v. 7. 6 ed. 2011. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM_003851004.1. Acesso em 28 jul 2018.

GOVINDU, H. C.; THIRUMALACHAR, M. J. Notes on some Indian Cercosporae. IV. **Sydowia**. v. 8, n. 1-6, p. 221-230. 1954.

- GROENEWALD, M.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Distinct Species Exist Within the *Cercospora apii* Morphotype. **Phytopathology**. v. 95. 8 ed. p. 951-959. 2005. Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/662009295?log\\$=activity](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/662009295?log$=activity). Acesso em 28 jul 2018
- GUO, Y. L.; HSIEH, W. H. **The genus *Pseudocercospora* in China**. Mycosystema Monographicum Series 2, 1 ed. Beijing, International Academic Publishers. 388 p. 1995.
- HAWKSWORTH, D. L. Presidential Address 1990: The fungal dimension of Biodiversity: magnitude, significance, conservation. **Mycological Research**. v. 95. 6 ed.: 641-655. 1991.
- HAWKSWORTH, D. L.; ROSSMAN, A. Y. Where Are All the Undescribed Fungi? **Phytopathology**. v. 87. n. 9, p. 888-891, 2001.
- HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1, 5 million species estimate revised. **Mycological Research**, v. 105, n. 12, p. 1422-1432, 2001.
- HEALD, F. D.; WOLF, F. A. New species of Texas fungi. **Mycologia**. v. 3., n. 1, p. 5-22, 1911.
- HIBBETT, D. S., et al. A Higher-Level Phylogenetic Classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, p. 509-547, 2007. disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.004>. Acesso em 28 jul 2018.
- HSIEH, W.-H.; GOH, T. K. ***Cercospora* and Similar Fungi from Taiwan**. China: Maw Chang Book Company, 376 p., 1990.
- HYDE, K. D. Where are the missing fungi? Does Hong Kong have any answers? **Mycological Research**, v. 105, n. 12, p. 1514-1518, 1997.
- INÁCIO, C. A. et al. Some *Cercospora* species originally described by Ahmes Pinto Viégas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 21, p. 405 – 409, 1996.
- JAMES, T. Y., LETCHER, P. M.; LONGCORE, J. E., MOZLEY-STANDRIDGE, S. E.; PORTER, D.; POWELL, M. J., GRIFFITH, G. W.; VILGALYS, R. A molecular phylogeny of the flagellated fungi (*Chytridiomycota*) and description of a new phylum (*Blastocladiomycota*). **Mycologia**. v. 98. n. 6, p. 860–871. 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17486963>. Acesso em: 10 jul 2018.
- JAMES, T. Y.; PORTER, D.; LEANDER, C. A.; VILGALYS, R.; LONGCORE, J. E. Molecular phylogenetics of the *Chytridiomycota* support the utility of ultrastructural data in chytrid systematics. **Canadian Journal of Botany**, n. 78, p. 336–350. 2000.
- KAMAL, O. ***Cercosporoid fungi of India***. Bishen Singh Mahendra Pal Singh, Dehra Dun, India N/A: 351. 2010.
- KARLING, J. S. ***Chytridiomycetarum Iconographia***. Lubrecht & Cramer, New York. 1977.

KIRK, P. M., CANNON, P. F., MINTER, D.W., STALPERS, J. A (Eds). **Dictionary of the fungi**, 10 ed. Egham: CABI Publishing, UK. 771 p. 2008.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; DAVID, J. C.; STALPERS; J. A. A.; **Bisby's Dictionary of the Fungi**. 9 ed.. CABI Publishing. 2001.

LION, J. B. *Cylindrosporium acori* Peck, Annual report on the New York State Museum of Natural History. v. 46. p. 112, 1893.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3. ed. Nova Odessa: Plantarum. 624 p. 2000.

LUZ, W. C. ed. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v. 19. Gráfica e Editora Padre Berthier dos Missionários da Sagrada Família. Passo Fundo, RS. 399 p. 2011.

LUZ, W. C. ed. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v. 20. Gráfica e Editora Padre Berthier dos Missionários da Sagrada Família. Passo Fundo, RS. 400 p. 2012.

LUZ, W. C.; FERNANDES, J. M.; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C. eds. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v. 6. Gráfica e Editora Padre Berthier dos Missionários da Sagrada Família. Passo Fundo, RS. 436 p. 1998.

MENDES, M. A. S., DA SILVA, V. L., DIANESE, J. C., and *et al.* **Fungos em Plantas no Brasil**. Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, Brasília, 555 p. 1998.

MENDES, M. A. S., URBEN, A. F. **Fungos relatados em plantas no Brasil**, Laboratório de Quarentena Vegetal. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Disponível em: <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/fgbanco01.asp>. Acesso em: 5/10/2017.

MENDES, M. A. S., URBEN, A. F. **Fungos relatados no Brasil**, Laboratório de Quarentena Vegetal. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Disponível em: <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/fgbanco01.asp>. Acesso em: 04/11/2017.

NAG RAJ, T. R. **Anamorfos coelomicetos com conídios portadores de apêndices**. Waterloo, Ontário, Canadá: Mycologue Publication. 1993.

NGUANHOM, J.; CHEEWANGKON, R.; GROENEWALD, J. Z.; BRAUN, U.; TOANUN, C.; AND CROUS, P. W. Taxonomy and phylogeny of *Cercospora* spp. from Northern Thailand. **Phytotaxa**. v. 233. 1 ed: p. 27-48. 2015.

O' DONNELL, K & CIGELNIC, E. Two divergent intragenomic ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are Nonorthologous. **Molecular Phylogenetics And Evolution**. v.7, n.1, p. 103-116, 1997.

PARREIRA, D. F.; FERREIRA, P. A.; DURATE, H. S. S.; CAPUCHO, A. S.; ZAMBOLIM, L. First report of *Pseudocercospora muntingiae* on *Muntingia calabura* in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes** v. 4. p. 110-113. 2009.

PENNYCOOK, S. R. Plant diseases recorded in New Zealand. vol. 3. **Plant Diseases Division**. D.S.I.R., Auckland. 1989.

PHENGSIKHAM, P.; CHUKKEATIROTE, E.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D.; BRAUN, U. Monograph of Cercosporoid fungi from Laos. **Current Research in Environmental & Applied Mycology**, v.3, n.1, p. 34–158, 2013.

PIRNIA, M.; ZARE, R.; ZAMANIZADEH, H. R.; KHODAPARAST, A. New records of cercosporoid hyphomycetes from Iran. **Mycotaxon**, v. 120, p. 157-169. 2012.

QUAEDVLIEG, W.; BINDER, M.; GROENEWALD, J. Z.; SUMMERELL, B. A.; CARNEGIE, A. J.; BURGESS, T. I.; CROUS, P. W. Introducing the Consolidated Species Concept to resolve species in the *Teratosphaeriaceae*. **Persoonia**, v. 33, p. 1-40. 2014.

REHNER, S. A. **Primers for elongation factor 1-alpha (EF1 – alpha)**. 2001. Disponível em: https://www.google.com.br/?gws_rd=ssl#q=Rehner+2001. Acessado em 29 Jun 2017.

REMBINSKI, J; FARIA, C. M. X; SOUZA, K, T; INÁCIO, C. A. Two interesting species of *Pseudocercospora* found associated to leaf spots on two hosts in the state of Rio de Janeiro, R. J. Brazil. 50 ° Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Uberlândia. **Anais do 50° Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, v.1, p.621, 2017.

RESENDE, D. V.; FERREIRA, F. A.; DEMUNER, N. L. Desfolha de *Camptomeris* em procedências e híbridos de *Leucaena* sp. **Fitopatologia Brasileira**, v.13, n.2, p.129, 1988.

RUGGIERO, M. A. et al. A Higher Level Classification of All Living Organisms. **PLOS ONE**. v. 10. 6 ed. 2015. . Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130114>. Acesso em 20 jul 2018.

SACCARDO, P. A. *Cercospora atromarginalis*. **Sylloge fungorum**. X: 635; XII: 84. 1892. Disponível em: <https://www.biodiversitylibrary.org/page/7311111#page/63/mode/1up>. Acesso em 29 out 2017.

SACCARDO, P. A. *Cercospora beticola* Sacc., **Nuovo Giornale botanico italiano**, v. 8, n. 2, p. 189, 1876.

SACCARDO, P. A. Sylloge Fungorum XIV: 1032 (1899): *Cylindrosporium acerinum* Tracy & Earle, Proc. Calif. Acad. Sci., Ser. 2, Bot., n. 5, p. 732, 1895.

SACCARDO, P.A. Sylloge Fungorum XXV: 620 (1931): *Cylindrosporium aceris-obtusati* Bubák, Bot. Közl., v. 14, n. 3-4, p. 75, 1915.

SILVA, M. **Exploring fungal diversity: Passalora, Pseudocercospora, Sirosporium and Zasmidium** on brazilian plants. (Tese/Universidade Federal de Viçosa). Viçosa-MG, 2016a. Disponível em: <http://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/8376/texto%20completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em 07 nov. 2017.

SILVA, M.; BARRETO, R.W.; PEREIRA, O. L.; FREITAS, N. M.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Exploring fungal mega-diversity: *Pseudocercospora* from Brazil. **Persoonia** 37, p. 142–172. 2016b: <http://dx.doi.org/10.3767/003158516X691078>.

SILVA, M.; MINTER, D. W. Fungi from Brazil recorded by Batista and co-workers. Wallingford: CAB INTERNATIONAL. **Mycological Papers**, v. 169, 585 p., 1995.

SINGH, P. N., SINGH, S. K, TRIPATHI, S. C. New species of *Pseudocercospora* causing leaf spots of forest plants of Nepal. **Mycological Research**. v. 100, n. 9, p. 1129-1132, 1996.

SOLHEIM, W. G.; STEVENS, F. L. *Cercospora* studies - II. Some tropical *cercosporae*. **Mycologia**, v.1–6, p. 394, 1931.

SPARROW, F. K. JR. Aquatic Phycomycetes. Univ. of Michigan Press, **Ann Arbor**. p. 1-1187. 1960. Disponível em: <http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?TableKey=14682616000000061&Rec=4104&Fields=All>. Acesso em 20 jun 2018.

SPEGAZZINI, G. Mycetes argentinenses: *Cercosporina tetragoniae* Speg. **Anales do Museo nazionale de Buenos Aires**, Ser. 3, n. 13. p. 425. 1911.

STEVENS, F. L.; DALBEY, N. E. New or noteworthy Puerto Rican fungi. 2 plates. **Mycologia**. v.11. 1–6 ed. p. 5. 1919. Disponível em: <http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=179667>. Acesso em 08 nov 2017.

SYDOW, H. Fungi venezuelani. **Annales Mycologici**. v. 28. n. 1-2. p. 29-224. 1930. Disponível em: <http://www.librifungorum.org/Image.asp?ItemID=618&ImageFileName=001/0222b.jpg>. Acesso em 08 nov 2017.

URTIAGA, R. **Indice de enfermedades en plantas de Venezuela y Cuba**, 2 ed. Unknown journal or Publisher. 2004.

URTIAGA, R.; BRAUN, U. New species and new records of cercosporoid hyphomycetes from Cuba and Venezuela (Part 2). **Mycosphere**. v. 4, p. 174-214, 2013.

VIÉGAS, A. P. Alguns fungos do Brasil : *Cercosporae*. **Boletim da Sociedade Brasileira de Agronomia**, v. 8, p. 1–160, 1945.

WEISS, F. **Index of plant diseases in the United States**. U.S. Department of Agriculture Agriculture Handbook #165. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C. 531 p. 1960.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Capítulo 38. p. 315-322. in: **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications** (M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky and T. White, eds.). Academic Press, Orlando, Florida, 1990.

YEN, W. Étude sur les champignons parasites du sud-est Asiatique. I. **Première note sur quelques nouvelles espèces de *Cercospora* de Singapour.** *Revue de Mycologie* Paris, v. **29**, n. 3, p. 209-240, 1964.

CAPÍTULO II

INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO MICELIAL *IN VITRO* DE *Fusarium Solani* COM BACTERIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO

RESUMO

REMBINSKI, Jessica. **Inibição de Crescimento Micelial in vitro de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* com Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal**. 2018. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Departamento de Entomologia e Fitopatologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

A pimenta-do-reino, originária da Índia, é uma das especiarias mais importantes e utilizadas no mundo. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial. A Cultura tem seu ciclo de vida reduzido pela atuação do fungo anamórfico *Fusarium solani* f.sp. *piperis* agente causal da fusariose, que promove seca dos ramos e podridão de raízes. Métodos alternativos de controle estão sendo estudados ao longo dos anos, visto que ainda não existem fungicidas capazes de controlar a doença. Um destes métodos seria a utilização de microorganismos antagônicos, como bactérias endofíticas que promovem crescimento vegetal e produzem sideróforos capazes de inibir o desenvolvimento fúngico. O presente estudo objetivou a obtenção de estirpes bacterianas com potencial antagônico contra o fungo *Fusarium solani* f.sp. *piperis* agente causal da Fusariose na cultura Pimenta-do-reino. A obtenção do fungo *Fusarium solani* foi proveniente de áreas produtoras do município de Água Doce do Norte/ES causando murcha e secade folhas em mudas de pimenta-do-reino com 3-4 meses de idade. O fungo foi isolado e seu DNA extraído. As estirpes bacterianas foram provenientes da coleção de culturas da EMBRAPA Agrobiologia localizada no município de Seropédica, sendo utilizadas 29 estirpes, dentre elas *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Microvirga* e *Serratia*. Realizou-se o cultivo duplo em placas de *petri* contendo BDA a $\pm 25^{\circ}\text{C}/15$ dias, sendo depositado um disco micelial de 8 mm no centro da placa e as estirpes bacterianas ao redor, totalizando 8 placas no primeiro screening avaliadas pelo tamanho do halo de inibição de crescimento micelial formado pelas bactérias. Das 29 estirpes foram selecionadas 21, as quais passaram novamente pelo procedimento de cultivo duplo por 4 repetições consecutivas, obtendo-se assim um total de 5 isolados bacterianos (*Pseudomonas*: BR 10376; BR 10449; BR 10218, *Bacillus*: BR 10788, *Burkholderia*: BR 10920) com potencial antibiotico para controle do fungo *Fusarium solani* f.sp. *piperis*.

Palavras-chave: *Piper nigrum*, *hyphomycetes*, controle biológico.

ABSTRACT

REMBINSKI, Jéssica Inhibition *in vitro* of Mycelial Growth of *Fusarium solani* by Plant Growth Promoting Bacteria. 2018. Dissertation (MSc in Phytosanitary and Applied Biotechnology). Institute of Biological Sciences and Health. Department of Entomology and Phytopathology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

The black pepper, originated from India, is one of the most important and used spices in the world. Brazil is the third largest producer in the world. This culture has its life cycle reduced by the action of the anamorphic fungus *Fusarium solani* f.sp. *piperis* causal agent of fusariosis, which promotes drought of the branches and root rot. Alternative control methods have been studied over the years, since fungicides are still not able to control the disease. One of these methods would be the use of antagonistic microorganisms, such as endophytic bacteria that promote plant growth and produce siderophores capable of inhibiting fungal development. The present study aimed to obtain bacterial strains with antagonistic potential against the fungus *Fusarium solani* f.sp. *piperis* causal agent of *Fusarium* in the Pepper of the Kingdom culture. The fungus *Fusarium solani* was obtained from producing areas of the northern fresh water / ES causing wilting and leaf drying in pepper plants of the kingdom at 3-4 months of age. The fungus was isolated and its DNA extracted. Bacterial strains were obtained from the EMBRAPA Agrobiology cultures collection located in the municipality of Seropédica, with 29 strains, among them *Bacillus*, 1, *Pseudomonas*, *Microvirga* and *Serratia*. Double culture was performed on petri dishes containing BDA at $\pm 25^{\circ} \text{C}$ / 15 days, and an 8 mm mycelial disc was deposited in the center of the plate and the surrounding bacterial strains, totaling 8 plates in the first screening evaluated by the size of the halo of inhibition of mycelial growth formed by bacteria. From the 29 strains were selected 21, which were again doubled by the 4 consecutive replicates, obtaining a total of 5 bacterial isolates (*Pseudomonas*: BRS10376; BRS10449; BRS10218, *Bacillus*: BRS10788, *Burkholderia*: BRS10920) with antibiotic potential for control of the fungus *Fusarium solani* f.sp. *piperis*.

Key words: *Piper nigrum*, *hyphomycetes*, biological control.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o país de maior diversidade biológica, destacando-se no ranking mundial entre os países: México, Colômbia, Equador, Peru, Austrália, Zaire, Madagascar, China, Índia, Malásia, Indonésia.

Existem atualmente duas espécies fúngicas causadoras de doenças em pimenta-do-reino, registradas no no Ministério da agricultura, sendo estas *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal da “Antracnose” e *Fusarium solani* f.sp. *piperis* conhecido como agente causal da Fusariose (MAPA, 2016); cabe mencionar que existem outros agentes fúngicos já descritos causando podridões, seca dos ramos e murcha em plantas adultas bem como tombamento de mudas em pimenteiros situados no estado do Pará (EMBRAPA, 2005). No Espírito Santo, e em todos os lugares onde a cultura é implantada, a Fusariose é a doença de maior impacto econômico, e é a que mais tem sido estudada na busca por métodos alternativos de controle, em decorrência dos efeitos nocivos que os defensivos agrícolas provocam ao meio ambiente e à saúde humana.

Até o momento, não há tratamento químico eficaz contra o *Fusarium*, nem cultivares de pimenta-do-reino comerciais resistentes à fusariose (TREMACOLDI, 2010). Métodos ou produtos alternativos têm sido parcialmente testados visando o aproveitamento de suas atividades antibióticas (Ex. obtenção de fungicidas, propriedades fungistáticas e microorganismos antagônicos) no controle de doenças de plantas.

O Estado do Espírito Santo representa o 2º maior produtor e exportador de pimenta-do-reino no Brasil (INCAPER, 2004) com média de 6,7 mil toneladas de pimenta-do-reino produzidas, perdendo apenas para o Pará (CONAB, 2015).

No Estado do Espírito Santo foi introduzida a cultivar Cingapura primeiramente no município de Linhares, com mudas originárias do Pará e, novas introduções foram efetuadas a partir do Estado da Bahia e atualmente, cultiva-se área superior a 3.500 ha. Conhecida também como o ouro negro é a cultura de maior destaque no município de São Mateus, o maior produtor estadual, seguido de Jaguaré (CONAB, 2015), e vem aumentando consideravelmente entre os pequenos produtores da região norte do Estado devido ao potencial produtivo e econômico (INCAPER, 2004).

Diante do potencial econômico presente na cultura da pimenta-do-reino e do crescimento da demanda por conhecimento acerca do controle do agente etiológico da Fusariose nos estados produtores, o presente estudo objetivou estudar estipes bacterianas promotoras de crescimento vegetal com potencial para controle biológico de *Fusarium solani* f.sp. *piperis* através do cultivo duplo *in vitro* em condições laboratoriais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pimenta-do-reino

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.), originária da Índia, é uma das especiarias mais importantes e utilizadas no mundo. Desde o ano de 2000, é cultivada em escala comercial em 26 países, principalmente a Indonésia, Malásia, Brasil, Vietnã, China e Tailândia (RAVINDRAN, 2000).

A pimenta-do-reino foi introduzida no Brasil por colonos portugueses no século XVII, ficando restrita aos Estados do litoral brasileiro. Entretanto, o cultivo racional apenas se estabeleceu após a introdução da cultivar Cingapura por imigrantes japoneses, em 1933 no município de Tomé-Açu - PA, onde teve início a produção comercial, principalmente de pimenta preta e pimenta branca. Por volta de 1950, os japoneses e os brasileiros introduziram o sistema de cultivo intensivo praticado na Malásia, tornando o Brasil autossuficiente na produção da cultura (DUARTE; ALBUQUERQUE, 2005).

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de pimenta-do-reino e o Espírito Santo é o segundo colocado entre os Estados brasileiros, com uma produção de 37 mil toneladas do grão (IBGE, 2017). Apesar da importância da pipericultura no cenário regional, nacional e internacional, conhecimentos que garantam a produção sustentável e econômica da cultura ainda são escassos (SILVA *et al.* 2011). A fusariose, também conhecida como podridão do pé e podridão das raízes, de ocorrência restrita ao Brasil, é causada pelo fungo hemibiotrófico *Fusarium solani* f. sp. *piperis* (TRINDADE; POLTRONIERI, 1997; DUARTE *et al.*, 2005). Como consequência da infecção fúngica, em áreas de ocorrência da doença, o ciclo produtivo da cultura foi alterado de 12 para 5 a 6 anos (LE MOS *et al.*, 2011). Porém, a fusariose, doença que inviabiliza o cultivo da pimenta nas lavouras infestadas, ainda carece de estudo sobre cultivares resistentes, métodos alternativos de controle e manejo integrado.

O gênero *Piper* pertence ao grupo das Eudicotiledôneas, classe *Magnoliopsida*, ordem *Piperales* e família *Piperaceae* (EMBRAPA, 2004). A posição filogenética da família *Piperaceae* está entre um conjunto diversificado de eudicotiledôneas denominado "paleoervas". São plantas que se assemelham à monocotiledôneas em certas características vegetativas, como, por exemplo, estípula adaxial e feixes vasculares dispersos (DONOGHUE; DOYLE, 1989; LOCONTE; STEVENSON, 1991). Esse gênero é mais diversificado nos trópicos americanos do que nos trópicos asiáticos (cerca de 700 vs. 300 espécies, respectivamente). Poucas espécies são encontradas nas ilhas do Pacífico Sul (cerca de 40 spp.) e na África (apenas duas espécies nativas). São abundantes em florestas de baixa e média altitude, raramente chegando a 2.500 m de altitude nos Andes tropicais. Os centros de diversificação de espécies de *Piper* incluem o Sudeste Asiático, o sul do México, os Andes, o Chocó, a Amazônia e a Mata Atlântica do Brasil (DYER; PALMER, 2004).

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.), nativa das florestas úmidas da Costa do Malabar no sudoeste da Índia (NELSON; CANNON-EGGER, 2011), é uma planta perene, semi-lenhosa e trepadeira. O caule é formado por duas partes distintas: a haste central que possui raízes adventícias, grampiformes, que se originam nos nós e aderem livremente no suporte (ramo ortotrópico) e as hastes laterais são desprovidas de raízes aderentes com gemas

originando as flores e frutos (chamados ramos de frutificação ou plagiotrópicos). As folhas são pecioladas e localizadas à altura dos nós existentes nos ramos. O sistema radicular possui 3 a 6 raízes laterais fasciculadas, localizadas, na maior parte, numa profundidade de até 30 cm, num raio de aproximadamente 60 cm em torno da planta e uma raiz central, que ajuda a fixar a planta no solo. A inflorescência é uma espiga que pode atingir 10 a 12 cm, composta de floretas aperiantadas. A fecundação normalmente se dá entre flores diferentes de uma mesma espiga (geitonogamia). O fruto é uma drupa séssil, indeiscente, proveniente de um único óvulo. Quando maduro, o fruto possui de 4 a 6 mm de diâmetro, e a casca adquire coloração avermelhada. A semente apresenta o endosperma esbranquiçado. No Pará, a maturação ocorre no período de junho a setembro e no sul da Bahia e Espírito Santo há dois períodos de maturação: de março a abril e outubro a novembro. O intervalo entre floração e maturação é de seis meses (EMBRAPA, 2004).

Os plantios se concentram no Norte do Estado do Espírito Santo, tendo como destaque o município de São Mateus no Estado Do Espírito Santo, com mais de 65% da área cultivada e da produção. De acordo com a Secretaria de Estado da Agricultura, Abastecimento, Aquicultura e Pesca (SEAG, 2013), São Mateus produz sozinho, quase 8% de toda produção brasileira. Todos os outros municípios, a partir do segundo, estão localizados no Pará, destacando-se Igarapé-Açu, Tomé-Açu e Baião, entre outros.

2.3 Fusariose

Apesar da importância da pipericultura no cenário regional, nacional e internacional, a atividade, frequentemente é relegada ao esquecimento. A falta de pesquisas para melhoramento, manejo e combate às doenças revelam a falta de conhecimento científico sobre a cultura. Assim, mesmo doenças tão devastadoras como a fusariose não são totalmente estudadas, e as técnicas de prevenção e combate a esta e outras doenças não são totalmente eficientes (SILVA *et al.* 2011). Como consequência, o ciclo produtivo da cultura, que dura, em média 12 anos foi alterado, tornando-se mais curto, com uma média de cinco a seis anos de sobrevivência em área de ocorrência da doença (LEMOS *et al.*, 2011).

A severidade das doenças causadas por *Fusarium* sp. está condicionada a fatores favoráveis tais como: temperatura, umidade, plantio em solos arenosos, presença de nematóides, ocorrência de pH baixo e adubação com baixo teor de potássio, além da falta de resistência do hospedeiro (SANTOS, 2008).

A introdução da planta no Brasil, ocorrida em 1933 no Estado do Pará, bem como sua exploração comercial, levou ao monocultivo da cultura, o que permitiu o surgimento de várias doenças (ALBUQUERQUE; DUARTE, 1991).

A podridão-das-raízes, conhecida como fusariose, é a principal doença da pimenta-do-reino (KIMATI *et al.*, 1997; TRINDADE; POLTRONIERI, 1997; TREMACOLDI, 2010) responsável por dizimar lavouras inteiras. Detectada primeiramente no Estado do Pará em 1957, somente em 1976, o agente etiológico foi identificado como *Fusarium solani* f.sp. *piperis* (ALBUQUERQUE; FERRAZ, 1976; ALBUQUERQUE; DUARTE, 1991). A fusariose está, atualmente, disseminada em todos os estados brasileiros produtores de pimenta-do-reino. No Espírito Santo, a doença ocorre nos municípios de Linhares, São

Mateus, Jaguaré, Nova Venécia, Colatina, Boa Esperança e Aracruz (VENTURA; MILANEZ, 1983).

O agente causal da fusariose é o fungo, *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. Este fungo, produz três tipos de esporos em sua fase anamórfica (assexuada), : macroconídios, microconídios e conídios intermediários. A partir do espessamento da parede celular das hifas e células de macroconídios, realiza-se a produção de clamidósporos (DUARTE *et al.*, 2005). Os macroconídios são conídios hialinos e septados (apresentam de cinco a nove septos e formato fusiforme) produzidos em esporodóquios, que são as estruturas de frutificação do fungo na fase assexuada. Algumas espécies produzem, também, conídios em micélio aéreo, denominados de microconídios (são cilíndricos, asseptados ou unisseptados e produzidos em fiáides laterais longas ou em conidióforos em forma de cacho). A produção de macro e microconídios é variável, em função das condições do ambiente. *Fusarium* sp. produz ainda os clamidósporos, que são as estruturas de resistência deste fungo (são globosos e podem sobreviver no solo por vários anos (BOOTH, 1971; FISCHER *et al.*, 2005; HAWKSWORTH *et al.*, 1995; NELSON, 1981, 1983, 1997; WINDELS, 1992a). A fase teleomórfica do fungo é conhecida e pode ocorrer nos gêneros *Gibberella* e *Nectria* (WINDELS, 1992b), que se caracteriza por formar peritécios redondos ou piriformes, avermelhados, com superfície rugosa de consistência gelatinosa e ascos contendo oito ascósporos..

O complexo de espécies de *Fusarium solani* - FSSC é um importante componente da microbiologia mundial. O grande número de espécies pertencentes a este gênero evidencia a diversidade de habitats nos quais elas podem sobreviver. Dentro de cada espécie de *Fusarium* pode haver ainda uma subdivisão ou *formae speciales* (EDEL *et al.*, 1997). O conceito *formae speciales* (SNYDER; HANSEN, 1953) é usado para reconhecer isolados patogênicos que foram morfológicamente semelhantes a isolados saprofiticos da mesma espécie, mas que diferenciam em sua habilidade para parasitar hospedeiros específicos. Albuquerque e Ferraz (1976) testaram a especificidade de 34 isolados patogênicos de *F. solani* à pimenta-do-reino (*Piper nigrum*), utilizando feijão (*Phaseolus vulgaris*), ervilha (*Pisum sativum*), abóbora (*Cucurbita* sp.) e batata (*Solanum tuberosum*) e não obtiveram sintomas de podridão induzidos pela presença do fungo. Os autores, assim comprovaram a especificidade dos isolados patogênicos testados à *P. nigrum*, atribuindo a denominação *formae specialis piperis*. Existem ainda espécies do FSSC que possuem uma variedade de enzimas, as quais podem contribuir para a virulência ou patogenicidade junto à planta hospedeira. Elas incluem as cutinases, as proteases e pectinases que agem nas barreiras da planta, a pisatina demetilase, para detoxificar as fitoalexinas e enzimas biossintéticas como algumas toxinas (GERHOLD *et al.* 1993; ZHANG *et al.*, 2006).

A doença pode iniciar a partir das raízes ou da parte aérea. Quando iniciada pelas raízes, as folhas e os internódios assumem coloração amarelada e caem, à medida que a doença evolui, ocorre o secamento total da planta. O sistema radicular é reduzido e se torna necrótico. Esta necrose pode evoluir até 30 cm acima do solo, a partir da base da planta (VENTURA; COSTA, 2004; TREMACOLDI, 2010). Na fase de produção, a doença promove a queda dos frutos. No entanto, quando a doença se inicia na parte aérea, esta é caracterizada pela presença de ramos amarelados em uma planta bem vigorosa. Examinando-se o ramo plagiotrópico até o ponto de inserção no ramo ortotrópico, observa-se uma lesão escura na região do nó. Com a evolução da doença, é observado o secamento na parte superior e inferior da planta (VENTURA; COSTA, 2004; SILVA *et al.*, 2011).

2.4 Formas de controle

No caso da pimenta-do-reino, algumas medidas que previnem a entrada do patógeno na área de plantio têm dado alguma contribuição reduzindo a disseminação da doença (SILVA *et al.*, 2011).

Dentre estas, o não reaproveitamento de tutores provenientes de áreas onde a doença tenha ocorrido é uma prática indicada. Recomenda-se, também, que áreas com histórico de ocorrência da doença não sejam utilizadas para um plantio antes de 5 a 8 anos após o último plantio (VENTURA; COSTA, 2004). O uso de cobertura morta no período de menor precipitação e o uso de adubação orgânica também tem sido sugerido. Recomenda-se, também, evitar o trânsito de máquinas agrícolas provenientes de áreas infectadas. Segundo Ventura; Costa (2004), a poda seguida da eliminação do material da lavoura e da aplicação de fungicida constituem ações de controle do patógeno em fase inicial de infecção. Portanto, estas medidas, de caráter preventivo, não eliminam em definitivo a disseminação do *Fusarium*.

Até o momento, não há tratamento químico eficaz contra o *Fusarium*, nem tampouco cultivares de pimenta-do-reino comerciais resistentes à fusariose (TREMACOLDI, 2010). Logo, métodos ou produtos alternativos têm sido parcialmente testados visando o aproveitamento de suas atividades antibióticas (fungicidas e fungistáticas) no controle de doenças de plantas. A busca por métodos/produtos alternativos de manejo das doenças, em substituição aos métodos convencionais, vem aumentando nos últimos anos, em decorrência dos efeitos nocivos que os defensivos agrícolas provocam ao meio ambiente e à saúde humana. Assim, os estudos para controle da fusariose com uso de métodos alternativos, são concernentes com as estratégias da agricultura moderna e vão em direção aos interesses econômicos e ecológicos.

2.4 Microorganismos antagonistas: BPCP

Bactérias em habitats naturais colonizam o interior e exterior de órgãos de plantas e podem ser benéficas, neutras ou prejudiciais ao seu crescimento. As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) fazem parte da população residente das plantas como epifíticas ou endofíticas e não são fitopatogênicas. Podem ser utilizadas para tratamento de sementes, explantes e mudas micropropagadas, incorporadas ao substrato de plantio, tratamento de estacas, tubérculos e raízes, pulverizações na parte aérea incluindo folhagem e frutos, e em pós-colheita. Já existem diversos produtos biológicos a base de BPCP sendo comercializados no mundo (MARIANO *et al.*, 2004).

Hallmann *et al* (1997) sugeriram que, evolutivamente, as bactérias endofíticas são intermediárias entre as bactérias saprófitas e patogênicas, além de especularem a possibilidade de as bactérias endofíticas serem mais evoluídas que as patogênicas, por se nutrirem do hospedeiro sem matá-lo. Essa especulação pode ser reforçada pela sequência evolutiva proposta por Djordjevic *et al.* (1987), que contemplaram a ideia de que a mais bem-sucedida

interação entre micro-organismo e planta não apenas explora os vegetais como fonte nutritiva, mas através do tempo causa menos danos à planta

As rizobactérias, ou seja, bactérias que habitam a rizosfera e o rizoplano, além de promoverem o crescimento das plantas hospedeiras, por intermédio de uma série de mecanismos, que incluem: a produção de fitohormônios, dentre os quais as auxinas; a solubilização de fosfato e a produção de quelantes de ferro, como os sideróforos; pela liberação de metabólitos antimicrobianos; pela degradação da parede celular de patógenos através da produção de enzimas líticas; pela competição por nutrientes e pela indução de resistência sistêmica nas plantas (MARIANO, 2004).

A indução de resistência nas plantas hospedeiras, provocada pela presença dessas bactérias, pode ampliar a persistência dos agrotóxicos, porque a durabilidade dessa resistência pode diminuir, diante da elevada variabilidade genética dos fitopatógenos, além de os ingredientes ativos dos agrotóxicos apresentarem limitado espectro de ação para os organismos-alvo (KUMAR *et al.*, 2012; HARDOIM *et al.*, 2012; REINHOLDHUREK, 2011).

De acordo com Zago *et al.*, (2000) as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas são os microrganismos antagônicos mais estudados com potencial para serem utilizados na agricultura. Para Harthmann (2009) as rizobactérias devem apresentar três características: colonizar as raízes, sobreviver e se multiplicar, competindo com a microbiota nativa e estimulando o crescimento vegetal.

Segundo Podile e Kishore (2006) as bactérias dos gêneros *Aeromonas*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Arthobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Serratia*, são as mais encontradas, associadas à raízes de plantas no solo. Destas, segundo Hernández (2000) as bactérias do gênero *Pseudomonas* predominam entre todos os microrganismos que habitam a rizosfera, por serem capazes de colonizar os órgãos das Rizobactérias como agentes de controle biológico e promotores de crescimento de plantas, tais como, raízes e tubérculos, utilizam exsudatos radiculares e produzem uma grande variedade de metabólitos secundários tóxicos a fungos e bactérias fitopatogênicas, entre os quais se destacam os antibióticos e os alcaloides (HERNÁNDEZ *et al.*, 1999).

Dessa forma, a utilização de rizobactérias como agentes de controle biológico de fitopatógenos e como promotoras de crescimento tem se mostrado como excelente alternativa. Estas bactérias podem atuar em vários mecanismos, como antibiose, competição por ferro, indução de resistência, mineralização de fosfatos, fixação de nitrogênio e reguladores de crescimento, além de serem capazes de inibir o crescimento de outros organismos no solo (ROMEIRO, 2005), tanto aderidas às raízes quanto livres na solução do solo (VIEIRA *et al.*, 2013).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos para avaliação do potencial antagônico das Bacterias promotoras de crescimento vegetal foram realizados através da obtenção do patógeno pelo isolamento indireto, a obtenção das bactérias, os quais foram dispostos em crescimento por cultivo duplo in vitro em placas de Petri.

3.1 Isolamento do patógeno

O patógeno foi isolado de mudas doentes de pimenta- do -reino, com sintoma de murcha foliar secamento de ramos e raízes apodrecidas, provenientes do campo no município de Água Doce do Norte no Estado do Espírito Santo. Foi realizado o isolamento indireto (ALFENAS; MAFIA, 2007) com partes do caule próximo a raiz afetadas pelo patógeno. Os fragmentos foram lavados em hipoclorito de sódio 1% por 1 min, álcool 70 % por 1 min e água destilada por 1min e depositados em placas de *Petri* contendo meio BDA+ (adição de forbiótico), e crescidos em BOD a 25° por sete dias e então depositada a colônia pura na coleção de Fungos Fitopatogenicos do Laboratório de Micologia/Fitopatologia sob o numero C149.

3.2 Obtenção dos isolados bacterianos

Os isolados bacterianos foram obtidos da coleção de microorganismos da EMBRAPA Agrobiologia localizada no município de Seropédica-RJ. Os isolados são provenientes da associação simbiótica de diferentes hospedeiros vegetais, e são descritos na tabela a seguir.

Tabela 22. Isolados bacterianos endofíticos provenientes da EMBRAPA Agrobiologia e seu crescimento em meio de cultura BDA $\pm 25^{\circ}\text{C}/4\text{dias}$. (Continuação)

Hospedeiro	Código de coleção	Estirpe bacteriana	Crescimento em meio de cultura BDA $\pm 25/7\text{dias}$
<i>Allium sativum</i>	BR 10451	<i>PSEUDOMONAS</i>	+
<i>A. sativum</i>	BR 10445	<i>PSEUDOMONAS</i>	+
<i>A sativum</i>	BR 10449	<i>PSEUDOMONAS</i>	+
-	BR10416	<i>PSEUDOMONAS</i>	+
<i>Centrolobium paraensis</i>	BR 10376	<i>PSEUDOMONAS</i>	+
<i>Crotalaria juncea</i>	BR 10218	<i>PSEUDOMONAS</i>	+
-	BR 10879	<i>BURKHOLDERIA</i>	+
<i>Mimosa scabrella</i>	BR 3433	<i>BURKHOLDERIA</i>	+
<i>M. arenosa</i>	BR 3506	<i>BURKHOLDERIA</i>	+
<i>Ananas comosus</i>	BR 11563	<i>BURKHOLDERIA</i>	+
-	BR 12233	<i>BURKHOLDERIA</i>	+

Tabela 22. Continuação.

<i>Oryza sativa</i>	BR 12049	<i>BURKHOLDERIA</i>	+
-	BR 3432	<i>BURKHOLDERIA</i>	+
<i>Mimosa setosa</i>	BR 10137	<i>BURKHOLDERIA</i>	+
<i>M. pudica</i>	BR 10920	<i>BURKHOLDERIA</i>	+
<i>Stylosanthes</i>	BR 405	<i>BURKHOLDERIA</i>	+
-	BR 10661	<i>BURKHOLDERIA</i>	+
<i>Phaseolus vulgaris</i>	BR 361A	<i>BURKHOLDERIA</i>	+
<i>Oryza sativa</i>	BR 11793	<i>BURKHOLDERIA</i>	+
<i>Vigna unguiculata</i>	BR 3299	<i>MICROVIRGA*</i>	-
<i>V. unguiculata</i>	BR 3291	<i>MICROVIRGA*</i>	-
<i>Vigna unguiculata</i>	BR 3294	<i>MICROVIRGA*</i>	-
<i>Lactuca sativa</i>	BR 10584	<i>BACILLUS</i>	+
<i>Daucus carota</i>	BR 10536	<i>BACILLUS</i>	+
-	BR 10788	<i>BACILLUS</i>	+
-	BR 12309	<i>BACILLUS</i>	+
<i>Zea mays</i>	BR 11034	<i>BACILLUS</i>	+
<i>Oryza sativa</i>	BR 12142	<i>BACILLUS</i>	+
<i>Passiflora edulis</i>	BR 13 469	<i>SERRATIA</i>	+

*A bactéria endofítica *Microvirga* não apresentou crescimento em meio BDA, sendo testada em meio TY em cultivo duplo com o fungo, o qual obteve ótimo crescimento neste meio de cultivo.

3.4 Cultivo *in vitro*: teste de antagonismo

Foram utilizados um total de 29 estirpes bacterianas endofíticas para testar seu efeito antagonico contra o fungo *Fusarium solani* f.sp. *piperis* (= *F. solani*). O cultivo foi realizado em câmara de fluxo laminar, em placas de *petri*, colocando-se um disco micelial no centro da placa, adicionando-se as bacterias nas extremidades das placas. O fungo foi cultivado em BOD a $\pm 25/7$ dias, cobrindo totalmente a placa. Os discos miceliais foram feitos com auxílio de uma ponteira de 1 ml (8 mm), e depositados no centro das placas. As Culturas puras de cada célula bacteriana foram mantidas em Meio BDA e TY.

3.5 Análise dos dados

Avaliou-se o crescimento micelial por meio da formação de halo bacteriano, com auxílio de uma régua milimetrada aos 8 e 15 dias após inoculação nas placas. Realizando suas respectivas médias após quatro repetições, gerando um gráfico de barras por meio do programa Microsoft Excel demonstrando a eficácia dos tratamentos ao longo do período de incubação.

$$\text{Média} = \text{Soma das repetições de cada tratamento} / 4 \text{ (numero de repetições)}$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 29 bactérias testadas sobressaíram-se 21 estipes (Fig. 36), contra o fungo *Fusarium solani*, as quais foram novamente testadas em quatro repetições e obtidas um total de 5 estipes bacterianas (Fig. 38).



Figura 40. Cultivo *in vitro*: 29 isolados bacterianos x *Fusarium solani* f.sp. *piperis*.

O gráfico de barras demonstra as médias mm obtida pela formação do halo bacteriano após os tratamentos em cultivo duplo nas placas de Petri ao longo de 8 a 15 dias após inoculação, avaliando-se a inibição do crescimento micelial (Fig. 37). As médias das estipes BR 10920 (8,75mm), BR 10788 (8 mm), BR 10218 (11,5 mm), BR 10449 (7,25 mm) e BR 10376 (5,75 mm) que equivalem a estipes das bactérias *Bacillus*, *Burkholderia* e *Pseudomonas*, foram respectivamente maiores aos 15 dias após inoculação *in vitro* em relação as outras estirpes testadas, que não apresentaram padrão de resposta considerável em relação as estirpes aqui descritas, ou seja, não inibiram o desenvolvimento do fungo em meio de cultivo BDA (Batata Dextrose Agar) após incubação em $\pm 25^{\circ}\text{C}$.

A estirpe de *Bacillus* demonstrou um crescimento muito grande em relação ao fungo cobrindo totalmente a área da placa em que foi depositada, e inibindo o crescimento do fungo (Fig. 38). Estudos utilizando *Bacillus* como inibidor de crescimento micelial de fungos como *Fusarium* sp. (RHODEN *et al*, 2010; MARTINS *et al*, 2016; SHIOMI *et al*, 2008; FREITAS, 2105) e *Colletotrichum* sp. (ANN *et al*, 2015; SOUZA, 2015), por exemplo, vem sendo realizados ao longo dos anos, demonstrando a eficácia deste microorganismo como agente de controle biológico. O que corrobora para o resultado alcançado com esta estirpe bacteriana. ANN *et al*. (2015) demonstrou em seu estudo, a eficácia da espécie *Bacillus subtilis* sobre a atuação do patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* (agente causal da antracnose da pimenta-do-reino), através do cultivo duplo em placas e em tratamentos em casa de vegetação avaliando-se a inibição do crescimento micelial e a progressão da doença através do aparecimento dos sintomas, que foram reduzidos consideravelmente em relação ao uso do fungicida que obteve resultado superior.

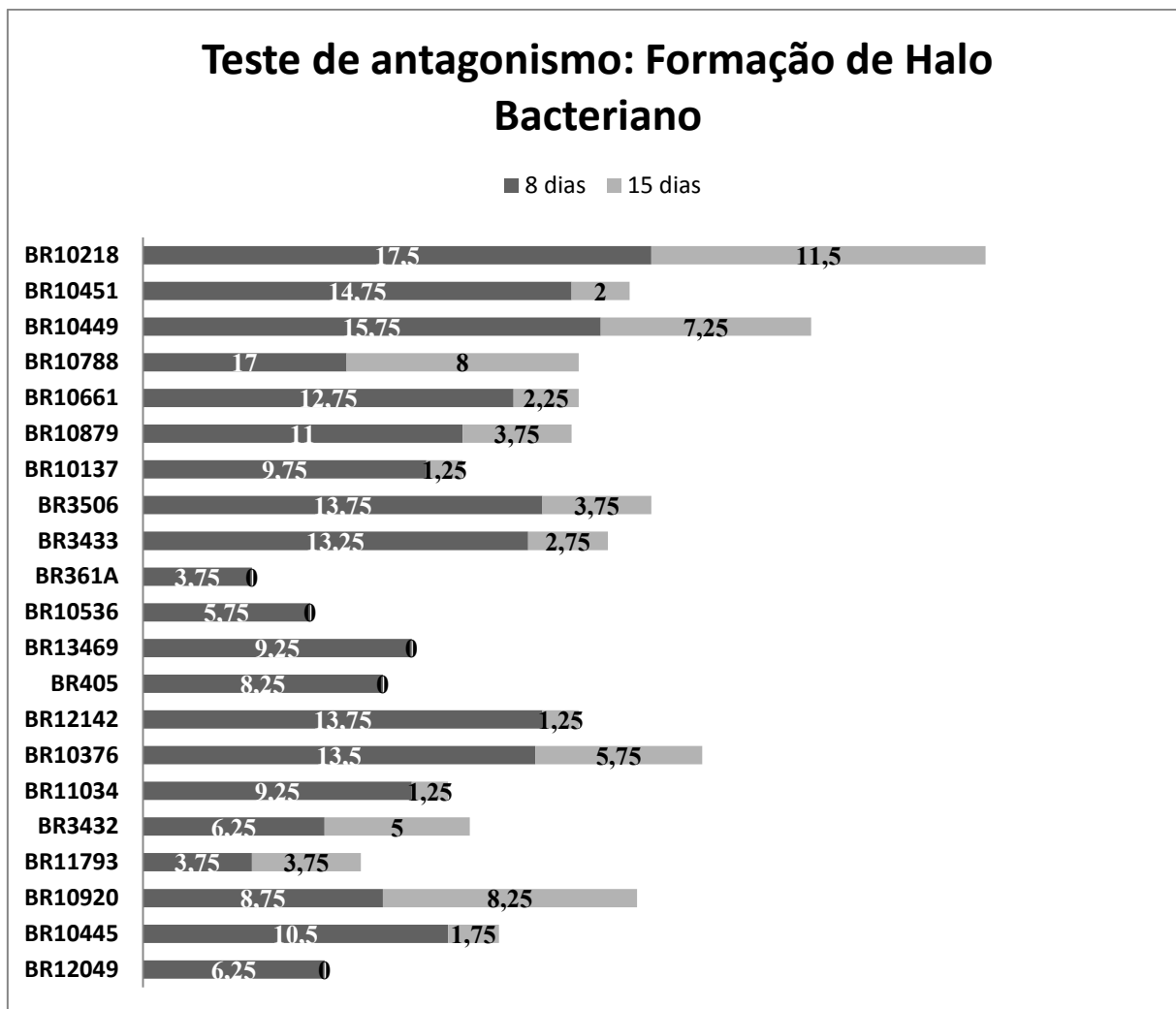


Figura 41. Avaliação da formação de halo bacteriano ao longo de 8-15 dias após inoculação, resultando na diminuição do crescimento micelial.

As estirpes de *Burkholderia* tem ampla distribuição, ocorrendo comumente no solo, água, plantas, fungos, animais e humanos. Apresentam na literatura potencial tanto para crescimento vegetal como sendo patogênicas (espécies *B. mallei* e *B. pseudomallei*, causadoras das doenças mormo em animais e melioidosis em humanos, e as espécies do complexo *B. cepacea* em pacientes com Fibrose Cística), mas em sua maioria, as espécies aparentemente não são patogênicas (PERIM; ARAUJO; REIS, 2006). Mas neste estudo, apresentaram um bom crescimento em relação ao desenvolvimento fungico *in vitro* corroborando para a validação destes microorganismos como agentes de controle biológico além de promoverem o crescimento vegetal ou mesmo a indução de resistência, pois desde a antiguidade o controle biológico de enfermidades de plantas tem sido usado (COOK; BAKER, 1983; VIEIRA *et al.*, 2013).

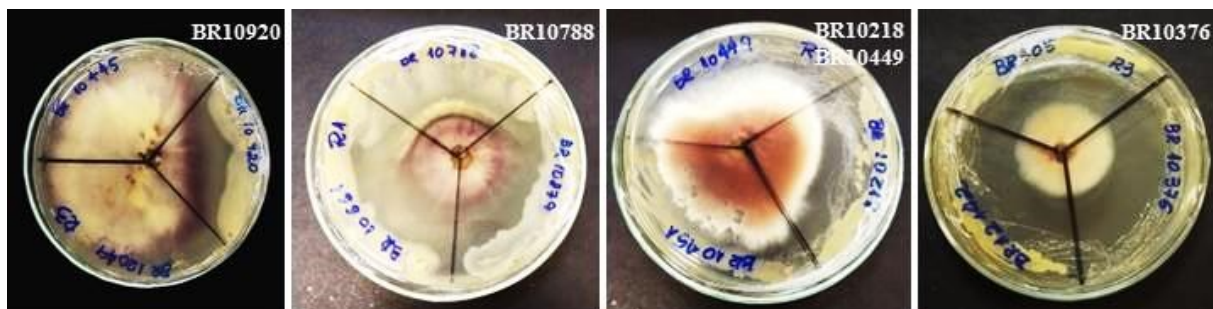


Figura 42. Estirpes bacterianas que apresentaram potencial de inibição do crescimento micelial do fungo *Fusarium solani* f.sp. *piperis*.

Além da antibiose, certas espécies de *Pseudomonas*, especialmente aqueles do grupo fluorescente, são capazes de produzir compostos que quelam o ferro, presente em baixas concentrações na rizosfera. Estes compostos são denominados sideróforos e atuam inibindo o crescimento de outros microrganismos (FREITAS, 2007; ROMEIRO, 2007).

Segundo Perim *et al.* (2006), em seu trabalho publicado sobre o genero *Burkholderia*, das espécies descritas, 7 são diazotróficas, 3 estão sendo propostas como diazotróficas e estudos mostraram que isolados de mais 3 espécies fixam nitrogênio atmosférico. Sendo o único gênero que forma nódulos em leguminosas e também se associa à rizosfera e tecidos internos de gramíneas. Muitas espécies são utilizadas em trabalhos de biorremediação, controle biológico e na indústria pela produção de biopolímeros. Um grande número de espécies do gênero *Burkholderia*, foram identificadas como agentes de controle de patógenos de inúmeras culturas. Podendo inibir o crescimento de muitos fungos, como *Phythium aphanidermatum*, *Phythium ultimum*, *Fusarium* sp., *Phytophthora capsici* e *Rhizoctonia solani* (CAIN *et al.*, 2000; HEBBAR *et al.*, 1998; HEYDARI; MISAGHI, 1998; LI *et al.*, 2002), e uma estirpe identificada como *Burkholderia* spp., foi capaz de inibir o crescimento de bactérias, leveduras e protozoários (CAIN *et al.*, 2000). Em muitos casos, o mecanismo envolvido na supressão da doença não é conhecido, mas provavelmente controlam populações patogênicas pela produção de sideróforos, verificado em *B. cepacea* e *B. vietamiensis* (MEYER *et al.*, 1995).

Entretanto estas bactérias são provenientes de hospedeiros distintos, e estudos posteriores devem ser realizados promovendo testes de patogenicidade e avaliação de crescimento vegetal para o hospedeiro do fungo *Fusarium solani*, a pimenta-do-reino; e então realizados testes em casa de vegetação avaliando-se qual estirpe aqui encontrada neste estudo promoverá uma melhor resposta de controle ao fungo, gerando assim um possível inoculante para se testar a nível de campo.

5 CONCLUSÃO

Das vinte e nove estirpes de bactérias promotoras de crescimento vegetal testadas, cinco apresentaram potencial para inibição do desenvolvimento micelial *in vitro*, sendo *elas Bacillus* (BR 10788), *Pseudomonas* (BR 10376; BR 10449; BR 10218) e *Burkholderia* (BR 10920), indicando potencial de controle biológico contra o agente etiológico da fusariose na pimenta-do-reino.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, F. C.; DUARTE, M. L. R. **Comportamento de cultivares de pimenta-do-reino em áreas de ocorrência de fusariose no Estado do Pará**. Belém: Embrapa-CPATU, 40 p. 1991.
- ALBUQUERQUE, F. C.; FERRAZ, S. Características morfológicas e fisiológicas de *Nectria haematococca* f. sp. *piperis* e sua patogenicidade à pimenta-do-reino. **Experientia**, v. 22, n. 6, p. 133-151, 1976.
- ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. **Métodos em Fitopatologia**. 2 ed. Viçosa. Ed. UFV, 516 p. 2016.
- ANN, Y. C.; SALLEHIN, A. A.; ROSLAN, H.A.; HUSSAIN, M. H. M.; LIHAN, S. Antagonistic Activity of Endophytic *Bacillus* Species Against *Colletotrichum gloeosporioides* for the Control of Anthracnose Disease in Black Pepper (*Piper nigrum* L.). **Global Journal of Biology, Agriculture and Health Sciences**. v. 4, n. 2, p. 115-123. 2015.
- BOOTH, C. **The Genus *Fusarium***. Oxford: Commonwealth Mycological Institute, 237 p. 1971.
- CAIN, C. C.; HENRY, A. T.; WALDO, R. H.; CASIDA, L. J.; FALKINHAM, J. O. Identification and characteristics of a novel *Burkholderia* strain with broad-spectrum antimicrobial activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p.4139-4141, 2000..
- CARVALHO JÚNIOR, A. A. **Uredinales da Floresta Atlântica In: Micologia: avanços o conhecimento**.1 ed.Recife : Ed. Universitária da UFPE, 1. p. 88-95. 2007).
- CONAB. **Conjuntura da pimenta-do-reino no Espírito Santo**. 2015. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_08_26_16_06_06_conjuntura_de_pimenta-do-reino_2015_.pdf. Acesso em 18.07.2016.
- COOK, R. J.; BAKER, K. F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul: **The American Phytopathology Society**. 1983. 539p.
- DIANESE, J. C. **Micodiversidade Associada a Plantas Nativas do Cerrado. In Tópicos Atuais em Botânica** – palestras convidadas no 51 Congresso Anual de Botânica (Eds. T.B. Cavacalcanti & B.M.T. Walter), p. 109-115. 2001.
- DUARTE M. L. R.; ALBUQUERQUE F. C. **Sistema de Produção da Pimenteira-do-reino**. Embrapa Amazônia Oriental, 2005. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/PimenteiradoReino/paginas/importancia.htm>
- DUARTE, M. L. R. **Development of pepper industry in Brazil**. International Pepper News Buletin. p. 13–28, 2001.

DUARTE, M. L. R.; ALBUQUERQUE, F.C.; ALBUQUERQUE, P.S.B. Doenças da Pimenteira-do-Reino (*Piper nigrum* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, JA.M. et al. (Eds.) **Manual de Fitopatologia**. 4 ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, v. 2, p. 507-516. 2005.

EMBRAPA. **Manual Segurança e Qualidade para a Cultura da Pimenta-do-Reino**. Brasília: EMBRAPA/SEDE, 65 p. (Qualidade e Segurança dos Alimentos). Projeto PAS Campo. Convênio CNI/SENAI/SEBRAE/EMBRAPA. 2004.

EPSTEIN, L.; KWON, Y. H.; ALMOND, D. E.; SCHACHED, L. M.; JONES, M. J. Genetic and biochemical characterization of *Nectria haematococca* strains with adhesive and adhesion-reduced macroconidia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 524-530, 1994.

FISCHER, I. H.; KIMATI, H.; REZENDE, J. A. M. Doenças do maracujazeiro (*Passiflora* spp.). In: KIMATI, H. et al. (Ed.) **Manual de fitopatologia**. 4ª edição. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2: Doenças das Plantas Cultivadas, p. 467-474, 2005.

FRAGA, M. E.; PEREIRA, M. G. **Diversidade de Trichocomaceae Isolada de Solo e Serrapilheira de Floresta Atlântica. Floresta e Ambiente**. EMPRAPA: Brasília, v. 19. 4 ed. p. 405-413. 2012.

FRAGA, M. E.; PEREIRA, M. G.; BARBOSA, D.; MELO, M. Diversidade de *Trichocomaceae* isoladas de solo em dois ecossistemas florestais. **Ciência Florestal**, v. 20: p. 169-177. 2010.

FRAGA, M. E.; PEREIRA, M.G.; SOUZA, F. A. Microbiota do solo de uma área de duna na Restinga da Marambaia, Rio de Janeiro, RJ. **Floresta e Ambiente**, v. 17. p. 30-36. 2010.

FREITAS, Mônica Aparecida de. **Bacillus subtilis e bactérias endofíticas autóctones como agentes de biocontrole para Fusarium solani e bioacúmulo de ferro na cultura da mandioca**. Lavras: UFLA. 91 p. 2015.

FREITAS, S. S. Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. **Microbiologia do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agronômico, 20 p. 2007.

HAWKSWORTH, D. L. Presidential Adress 1990: The fungal dimension of Biodiversity: magnitude, significance, conservation. **Mycological Research**. v. 95. 6 ed. p. 641-655. 1991.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105. 12:ed. p. 1422-1432. 2001.

HAWKSWORTH, D. L., ROSSMAN, A. Y. Where Are All the Undescribed Fungi? **Phytopathology**, v. 87, n. 9, p. 888-891, 1997.

HEBBAR, K. P.; MARTEL, M. H.; HEULIN, T. Suppression of preand port-emergence damping-off in corn by *Burkholderia cepacia*. **European Journal of Plant Pathology, Dordrecht**, v. 104, p. 29-36, 1998.

HEYDARI, A.; MISAGHI, I. J. Biocontrol activity of *Burkholderia cepacia* against *Rhizoctonia solani* in herbicide-treated soils. **Plant and Soil, Dordrecht**, v. 202, p. 109-116. 1998.

HYDE, K. D. Where are the missing fungi? Does Hong Kong have any answers? **Mycological Research**, v. 105, n. 12, p. 1514-1518, 2001.

IBGE. **Levantamento da Produção Agrícola**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística Rio de Janeiro, v. 26, n. 2, p. 1-84, 2013.

IBGE. **Levantamento da Produção Agrícola**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro, v. 29, n. 1, p. 1-83, 2015.

IBGE. **Levantamento da Produção Agrícola**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística Rio de Janeiro, v. 30, n. 5, p. 1-83, 2017.

INCAPER: **Manejo da fusariose da pimenta-do-reino no Estado do Espírito Santo**. Vitória, E.S. 16p. Documentos 131. 2004. Disponível em: <http://biblioteca.incaper.es.gov.br/digital/bitstream/item/973/1/Livreto-Pimenta-do-Reino-AINFO.pdf>. Acesso em 18.07.2016.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**. 3 ed.. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, p.774, 1997.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; DAVID, J. C. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi**, 9th Edition. CABI Publishing. 2001.

MAPA. **Agrofit: Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. 2016. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em 18.09.2016.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES A. M. A.; NASCIMENTO A. R.; DONATO V. M. T. S. **Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável**. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, v. 1, p. 89-111, 2004.

MARTINS, M. J.; XAVIER, A. A.; SANTOS, B. H. C.; RIBEIRO, R. C. F. **Avaliação in vitro de isolados de bactérias endofíticas do nim no controle de patógenos solo**. Ciência & Tecnologia: FATEC-JB, Jaboticabal (SP), v. 8, Número Especial, 2016.

MEYER, J. M.; TRANVAN, V.; STINZI, A.; STEPHAN, H.; BERGE, O.; WINKELMANN, G. Ornibactin production and transport properties in strains of *Burkholderia vietnamiensis* e *B. cepacea* (Formely *Pseudomonas cepacea*). **Biometals Dordrecht**, v. 8, p. 309-317, 1995.

MUSSI-DIAS, V; ARAÚJO, A. C. O.; SILVEIRA, S. F.; ROCABADO, J. M. A.; ARAÚJO, K. L. Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v. 14, n. 2, p. 261-266. 2012. Disponível em:

http://www.ibb.unesp.br/Home/Departamentos/Botanica/RBPMRevistaBrasileiradePlantasMedicinais/v14_n2_02.pdf. Acesso em 12 out 2017.

NELSON, B. D.; HANSEN, J. M. Reaction of soybean cultivars to isolates of *Fusarium solani* from the Red River Valley. **Plant Disease**, v. 81. p. 664–668. 1997.

NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. **Fusarium Species: an Illustrated Manual for Identification**. Philadelphia: Pennsylvania State University Press. 193 p. 1983.

NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; COOK, R. J. **Fusarium: diseases, biology and taxonomy**. Pennsylvania State University Press, University Park, p. 391-399. 1981.

PERIN, L.; ARAÚJO, J. L. S.; REIS, V. M. **O gênero *Burkholderia*: um importante componente da comunidade microbiana**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 219). 32 p. 2006.

RHODEN, S. A.; GARCIA, A.; SANTOS, C. M.; POLONIO, J. C.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. **Anais Eletrônicos do VIII EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar UNICESUMAR – Centro Universitário Cesumar Editora CESUMAR Maringá – Paraná – Brasil**. 2016.

ROMEIRO, R. S. **Controle biológico de doenças de plantas – Fundamentos**. Viçosa - MG: UFV, 296 p. 2007.

SALES, H. B. **Alguns fungos associados a plantas do cerrado**. Tese de Mestrado. Brasília. Universidade de Brasília. 78p. 2003.

SHIOMI, H. F.; MELO, I. S.; MINHONI, M. T. A. Seleção de bactérias endofíticas com ação antagonica a fitopatogenos. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.9, n.4, p.535-538, 2008.

SILVA, S. O.; NETO, A. P. D.; SILVA, M. B. Pimenta-do-reino: importância da defesa fitossanitária para a sustentabilidade da atividade na região norte do Espírito Santo. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v. 1, n. 1, p. 88-92, 2011.

SOUZA, R. D.; MENDONÇA, E. A. F.; SOARES, M. A. Atividade antagonica a microrganismos patogênicos por bactérias endofíticas isoladas de *Echinodorus scaber* Rataj. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 41, n. 3, p. 229-232, 2015.

TREMACOLDI, C. R. **Principais Doenças Fúngicas da Pimenteira-do-Reino no Estado do Pará e Recomendações de Controle**. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, p. 25, 2010.

TRINDADE, D.R.; POLTRONIERI, L.S. Doenças da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BARGAMIN FILHO, A. et al. (Eds). **Manual de Fitopatologia**. 3ª edição. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, v. 2, p. 579-593, 1997.

VAZ, A. B. **Caracterização biológica e filogenética do agente etiológico da Fusariose da Pimenta-do-Reino no Brasil**. Tese de Doutorado em Agronomia/Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras – UFLA, 62p. 2013.

VENTURA, J. A.; COSTA, H. **Manejo da fusariose da pimenta-do-reino no estado do Espírito Santo**. INCAPER, Vitória, 16 p. 2004.

VENTURA, J. A.; MILANEZ, D. **Fusariose da pimenta-do-reino e seu controle**. Cariacica: ENCAPA, 20 p. 1983.

VIEIRA JÚNIOR, J. R.; FERNANDES, K. F.; ANTUNES JÚNIOR, H.; DOMINGOS, M. S. S.; SILVA, S. G.; SILVA, U. O. **Rizobactérias como agentes de controle biológico e promotores de crescimento de plantas**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Rondônia Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Rondonia 2013. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1018841/1/doc155rizobacterias.pdf>.

YARED, J. A. Z. **Sistema de produção da pimenteira do reino**. Sistemas de Produção. EMBRAPA: Amazônia. Versão Eletrônica. 2005. Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/PimenteiradoReino/paginas/apresentacao.htm>. Acesso em 18.07.2017.

ZHANG, N. et al. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infection in both humans and plants are common in the environment. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 2186-2190, 2006.

CONCLUSÕES GERAIS

No capítulo 1 deste estudo, foram encontrados, identificados e caracterizados morfológicamente 20 espécies de cercosporóides presentes em distintos hospedeiros. Estas espécies aqui encontradas pertencem aos gêneros *Camptomeris*, *Cercospora*, *Cylindrosporium*, *Pluripassalora* e *Pseudocercospora*.

A caracterização molecular realizada em 15 isolados demonstrou que estes são representantes dos gêneros de *Cercospora* e *Pseudocercospora*. Contudo a análise do gene ITS revelou similaridade com múltiplas sequências de material tipo presentes no GenBank.

No capítulo 2 deste estudo, foram testados *In Vitro* 29 bactérias promotores de crescimento vegetal e identificados 5 microorganismos pertencentes aos gêneros de *Bacillus*, *Burkholderia* e *Pseudomonas* com potencial de antibiose para controle Biológico do fungo *Fuarium solani* (agente causal da Fusariose da Pimenta do Reino).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos posteriores devem ser realizados acerca da biodiversidade dos fungos cercosporóides no Estado do Rio de Janeiro, visto que, ainda há um grande número de espécies ainda desconhecidas pela ciência, presentes nos diversos biomas, principalmente o da Mata Atlântica; bem como estudos adicionais de análise molecular com a utilização de genes adicionais como Tef e β -tubulina, visando desta forma estas prováveis novas espécies.

Visando a elucidação dos dados encontrados neste estudo, trabalhos futuros devem ser realizados em campo, via casa de vegetação, em plantas infectadas com o fungo para confirmação efetiva do potencial uso das bactérias promotoras de crescimento vegetal aqui selecionada para controle do fungo, verificada através da antibiose.