

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MESTRADO**

**DUAS NOVAS ESPÉCIES DE FUNGOS FOLIÍCOLAS
ENCONTRADOS NOS BIOMAS CAATINGA E CERRADO**

FRANCIANE DOS SANTOS FRANÇA

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
JUNHO 2014**

DUAS NOVAS ESPÉCIES DE FUNGOS FOLIÍCOLAS
ENCONTRADOS NOS BIOMAS CAATINGA E CERRADO

FRACIANE DOS SANTOS FRANÇA

Engenheira Agrônoma

Universidade do Estado da Bahia, 2008.

Dissertação submetida ao Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Agrárias, Área de Concentração: Fitotecnia.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza

Co-Orientador: Prof. Dr. José Luiz Bezerra

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA - 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

F814d

França, Franciane dos Santos.

Duas novas espécies de fungos foliícolas encontrados nos biomas Caatinga e Cerrado / Franciane dos Santos França. Cruz das Almas, BA, 2014.

37f.; il.

Orientador: Jorge Teodoro de Souza.

Coorientador: José Luiz Bezerra.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Fungos foliícolas. 2.Fungos – Botânica. 3.Caatinga – Cerrados. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.
II.Título.

CDD: 576.8



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
FRANCIANE DOS SANTOS FRANÇA

Membro Presidente: Prof. Dr. José Luiz Bezerra
Instituição: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Bolsista do Programa Professor Visitante Nacional Sênior/CAPES

Membro Externo ao Programa: Profa. Dra. Elizabeth Amélia Alves Duarte
Instituição: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Bolsista do Programa Nacional de Pós-Doutorado/CAPES

Membro Externo ao Programa: Prof. Dr. Fabiano Branco Rocha
Instituição: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Bolsista de Pós-Doutorado/FAPESB-CAPES

Homologada em / / .

**À Deus, minha família e meus amigos,
DEDICO.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me concedeu a dádiva da vida.

Aos meus pais, França (em memória) e Maria (minha mãe que tanto me apoiou nos momentos mais difíceis da minha vida), pela vida que me deram e ensinaram-me a vivê-la com dignidade e honestidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, e seus professores pelo ensino e dedicação para minha formação de Mestre em Ciências Agrárias.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jorge Teodoro, pela paciência, apoio, compreensão e conselhos durante toda jornada do curso.

Em especial ao Prof. Dr. José Luiz Bezerra e Dr. Fabiano Branco Rocha por todo apoio, força, incentivo, compreensão e ajuda com contribuições na execução e conclusão do trabalho.

Aos técnicos, em especial a Carol e toda a equipe do Bloco L, Margarida, Juliana, Leonardo, Jérsica, Lica, Jaqueline Maria, Jackeline Andrade, Patrícia, Elizabeth, da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, pelo apoio, incentivo e amizade durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos Programas CNPq, FAPESB e a CAPES pela concessão da bolsa de estudo que me manteve nesta longa jornada da pesquisa.

Enfim, agradeço a todos que me ajudaram para que eu pudesse estar concluindo mais esta etapa da minha vida.

A TODOS UM MUITO MUITO OBRIGADA!!!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO GERAL	08
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	10
Capítulo 1	
<i>Pilidiella</i> sp. associada à folhagem de <i>Qualea grandiflora</i> no Cerrado Brasileiro.....	14
Capítulo 2	
<i>Parafulvia</i> sp. em tricomas foliares de <i>Hymenaea courbaril</i> encontrada na Caatinga, Brasil.....	25
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	36

DUAS NOVAS ESPÉCIES DE FUNGOS FOLIÍCOLAS ENCONTRADOS NOS BIOMAS CAATINGA E CERRADO

Autora: Franciane dos Santos França

Orientador: Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza

Co-Orientador: Prof. Dr. José Luiz Bezerra

RESUMO: A diversidade de fungos associados a lesões e tricomas foliares em plantas do Cerrado e da Caatinga é pouco conhecida. Nesse trabalho, dois isolados coletados em Brasília, DF e em Caldeirão Grande, BA foram estudados. Visando contribuir para o conhecimento de fungos foliícolas nesses dois biomas brasileiros, foram realizadas coletas de plantas com sintomas e sinais de origem fúngica. *Pilidiella* sp. foi encontrada em folhas de *Qualea grandiflora* (primeiro registro do gênero em Vochysiaceae). Essa espécie difere morfológicamente das outras principalmente pelos seus conídios não apresentarem cicatrizes no local de inserção no conidióforo. *Parafulvia* sp. foi encontrada em tricomas foliares de *Hymenaea courbaril* (também é o primeiro registro em Fabaceae). Essa espécie é a segunda do gênero até o momento e difere de *P. indica* por apresentar conídios maiores (12,5-20 x 5-7,5 μm), estriados, 3-septados, enquanto *P. indica* apresenta conídios menores (9-10 x 4-5 μm), lisos e 4-septados. Essas novas espécies ampliam a distribuição geográfica e a gama de hospedeiros dos gêneros *Pilidiella* e *Parafulvia*.

Palavras chave: Taxonomia; Sistemática; Ascomycota; Caatinga; Cerrado.

TWO NEW SPECIES OF FUNGI FOUND IN FOLIÍCOLAS BIOMES CAATINGA AND CERRADO

Author: Franciane dos Santos França

Adviser: Jorge Teodoro de Souza

Co-Adviser: José Luiz Bezerra

ABSTRACT: The fungal diversity associated with injury and foliar trichomes in plants of the Cerrado and Caatinga is scarcely known. In this study, two isolates were collected in Brasília, DF and in Caldeirão Grande, BA. Aiming to improve the knowledge about foliicolous fungi in plants showing symptoms and fungal structures were collected. *Pilidiella* sp. was found in *Qualea grandiflora* leaves (first record of the genus on Vochysiaceae). These species differs morphologically from others mainly by their conidia not submit scars at the site of insertion in the conidiophore. *Parafulvia* sp. was found on foliicolous trichomes of *Hymenaea courbaril* (it is also the first record on Fabaceae). This is the second species described belonging to this genus and differs from *Parafulvia indica* for having larger conidia (12.5-20 x 5-7.5 μm), striated, 3-septate, while *P. indica* has smaller conidia (9-10 x 4-5 μm), 4-septate and smooth. These new species extend the geographical distribution and host range of *Pilidiella* and *Parafulvia*.

Keywords: Taxonomy; systematics; Ascomycota; Caatinga; Cerrado.

INTRODUÇÃO GERAL

O conhecimento sobre a diversidade de fungos associados às plantas nativas da Caatinga e Cerrado tem sido negligenciado devido à escassez de micologistas para estudar a micobiota desses biomas. Este fato aliado à grande diversidade micológica nesses biomas responde pela existência de muitos fungos que podem ser extintos antes de serem estudados devido à crescente destruição da vegetação do Cerrado e da Caatinga para a implantação de lavouras e criação de gado.

Estima-se a existência de 1.500.000 espécies de fungos no planeta, das quais cerca de 100.000 espécies foram descritas (HAWKSWORTH, 2004). No entanto, o autor admite que trata-se de uma estimativa conservadora, uma vez que foi baseada em dados coletados em regiões temperadas, onde foi considerado que para cada espécie de planta vascular estão associados em média seis fungos (HAWKSWORTH, 1991, 2001, 2004). A quantidade de estudos em regiões tropicais, onde há uma maior biodiversidade, ainda é insuficiente para uma estimativa mais precisa sobre a quantidade de fungos associadas a espécies de plantas vasculares. Desta forma, justifica-se uma maior atenção em relação à diversidade de fungos em regiões tropicais incluindo biomas como o Cerrado e a Caatinga.

Além da justa curiosidade inerente ao ser humano que utiliza a Taxonomia como ferramenta para entender a natureza, outras pesquisas, incluindo as aplicadas, também são beneficiadas pelo conhecimento taxonômico dos seres vivos. A prospecção de fungos de interesse biotecnológico, por exemplo, toma como ponto de partida bancos de dados que compilam literatura especializada em relatos e descrições provenientes de estudos taxonômicos (ROBERT *et al.*, 2005; FARR & ROSSMAN, 2006). Sendo assim, estudos taxonômicos podem ser considerados, por exemplo, o primeiro passo para a descoberta de novos agentes de controle biológico de plantas invasoras (VAREJÃO *et al.*, 2013), doenças de plantas (KUPPER *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2012), e também de metabólitos secundários como os antibióticos (LUCAS *et al.*, 2007).

O Brasil apresenta uma grande extensão territorial abrigando diversos ecossistemas inseridos, em sua maioria, na região tropical onde a diversidade

micológica é maior (MITTERMEIER *et al.*, 1998). No entanto, a diversidade de fungos nesses ambientes ainda é pouco conhecida, sendo que, em relação aos fungos foliícolas os trabalhos mais referidos são os de Batista e colaboradores (BATISTA & PERES, 1962; BATISTA *et al.*, 1960 a, b, 1961, 1964, 1965), sumarizados em (SILVA & MINTER, 1995). Vários autores ressaltam a falta de estudos sobre a micobiota da Caatinga (MENEZES *et al.*, 2011; MENEZES *et al.*, 2013) e do Cerrado (HERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ & DIANESE, 2014; SOARES & DIANESE, 2014).

O Cerrado brasileiro é o segundo maior bioma do país e ocupa uma área de 2 milhões de km² na região central do Brasil, caracterizando-se por apresentar diferentes paisagens com variados tipos de vegetação, solo, clima e topografia. É um bioma tropical com estações bem definidas de seca no inverno e chuvas no verão (OUTORGA, 2012). Apesar deste bioma possuir solos pobres e secos, apresenta uma rica biodiversidade. O bioma Cerrado tem sofrido grandes perdas de áreas, segundo dados do IBGE sendo que a vegetação original foi desmatada em cerca de 48,37% (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2010; KLINK & MACHADO, 2005).

A Caatinga está localizada na região semiárida do nordeste brasileiro (DRECHSLER-SANTOS *et al.*, 2009) e o seu estudo e conservação representa um dos maiores desafios para a ciência brasileira. A Caatinga está totalmente contida no território nacional e além de ser o bioma menos estudado do Brasil é também o menos protegido e continua sendo vítima de vasto processo de degradação ambiental ocasionado pelo uso inadequado dos seus recursos (LEAL *et al.*, 2003).

Os fungos habitam diferentes substratos, apresentando vários tipos morfológicos e a sua identificação baseia-se quase que exclusivamente em sua morfologia macro e microscópica (BRUNS *et al.*, 1991). Técnicas moleculares têm sido bastante utilizadas para complementar as análises taxonômicas tornando mais confiável e rápida a identificação das espécies (GEISER *et al.*, 2007).

Nesse trabalho, levantamentos preliminares foram realizados tendo como alvo outros fungos associados a espécies vegetais como: *Phoma* associada à *Cordia globosa*, *Aspidosperma pyrofolia*, *Annona vepretorum*,

Bauhinia sp., *Celtis pubesceus* e *Manihot* sp., e *Septoria* associada a *Croton blanchettianus* e *Cnidocolus* sp., encontradas em Curaça - BA/PE; *Phoma* associada a *Bauhinia* sp., *Prockia crucis*, *Annona* sp. e *Caryocar coriaceum*, *Randia armata*, e *Septoria* associada a *Lafoensia* sp. e *Machaerium angustifolium*, encontradas na Chapada do Araripe - CE/PE; *Phoma* associada a *Bauhinia* sp., e *Paracercospora* sp. associada a *Manihot* sp., encontrados na Serra das Confusões - PI; *Septoria* associada a *Polcylanthe ullei*, e *Coccoloba arborescens*, encontrada na Serra da Jibóia - BA. Dois isolados foram selecionados para os estudos aqui relatados: *Pilidiella* sp. associada *Qualea grandiflora* coletada em Brasília - DF e *Parafulvia* sp. associada *Hymenaea courbaril* coletada em Caldeirão Grande - BA.

Este trabalho teve como objetivo contribuir para o conhecimento da diversidade de fungos foliícolas encontrados em dois biomas brasileiros: Cerrado e Caatinga.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATISTA, A.C.; BEZERRA, J.L. & SOUZA, R.G. Algumas espécies de *Helminthosporium* Link. ex Fr. **Publicações. Instituto de Micologia da Universidade do Recife 269**: 1-27. 1960a.

BATISTA, A.C.; MAIA, H.S.; LIMA, J.A. & MATTA, E.A.F. Moniliales – descrição e revisão de algumas espécies. **Atas do Instituto de Micologia. Universidade de Pernambuco, Recife 1**: 247-274. 1960b.

BATISTA, A.C.; BEZERRA, J.L.; MATTA, E.A.F. da *Mycosphaerella* Johanson: outras espécies identificadas no IMUR. **Publicações. Instituto de Micologia da Universidade do Recife 309**: 1-28. 1961.

BATISTA, A.C. & PERES, G.E.P. Novos fungos Sphaeropsidaceae. **Publicações. Instituto de Micologia da Universidade do Recife 358**: 1-30. 1962.

BATISTA, A.C.; BEZERRA, J.L.; CASTRILLÓN, A.L.; MATTA, E.A.F. da. Novos ascomycetos foliícolas e caulinares. **Publicações. Instituto de Micologia da Universidade do Recife 431**: 1-22. 1964.

BATISTA, A.C.; CAVALCANTE, W. de A.; MAIA, H. da SILVA . Novos binômios do gênero *Meliola*. **Atas do Instituto de Micologia. Universidade Federal de Pernambuco, Recife 2**: 253-289. 1965.

BRUNS, T.D.; WHITE, T.J.; TAYLOR, J. W. **Fungal molecular systematic. Annual review of ecology and systematic**, p. 22:252-2564, 1991.

DRECHSLER-SANTOS, E.R.; GIBERTONI, T.B. A re-evaluation of the lignocellulolytic Agaricomycetes from the Brazilian semi-arid region. **Mycotaxon**, v. 108, p. 241-244, 2009.

FARR, D.F.; ROSSMAN, A.Y. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. (2006). <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>. Acessado em: 06 de junho de 2014.

GEISER, D.M.; KLICH, M.A.; FRISVAD, J.C.; PETERSON, S.W.; VARGA, J.;SAMSON, R.A. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 1–10. 2007.

HAWKSWORTH, D.L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, v. 95, n. 6, p. 641-655, 1991.

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

HAWSWORTH, D.L. **Fungal diversity and its implications for genetic resource collections**. Studies in Mycology, Baarn, v. 50, p.9-18, 2004.

HERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; DIANESE, J.C. Cercosporoid hyphomycetes on malpighiaceae hosts from the Brazilian Cerrado: New *Passalora* and *Pseudocercospora* species on hosts of the genus *Banisteriopsis*. **Mycological Progress**, v. 13, p. 365-371, 2014.

IBGE (Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Censos agropecuários de 2010. <http://www.ipeadata.gov.br/>. Acessado em: 15 janeiro de 2014.

KUPPER, K.C.; CORRÊA, E.B.; MORETTO C.; BETTIOL, W.; GOES, A. Control of *Guignardia citricarpa* by *Bacillus subtilis* and *Trichoderma* spp.. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 111-1118, 2011.

KLINK, C.A. MACHADO, R.B. A conservação do Cerrado Brasileiro. **Megadiversidade** 1: 147-155. Belo Horizonte. 2005.

LEAL, I.R.; TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. **Ecologia e conservação da Caatinga**. Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. 2003.

LUCAS, E.M.F.; de CASTRO, M.C.M.; TAKAHASHI, J.A. Antimicrobial properties of sclerotiorin, isochromophilone VI and pencolide, metabolites from a Brazilian cerrado isolate of *Penicillium sclerotiorum* van Beyma. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p785-789, 2007.

MENEZES, A.A.; LEITE, A.B.X.; OTSUKA, A.Y.; de JESUS, L.S.; CACERES, M.E.S. Novas ocorrências de líquens corticícolos crostosos e microfoliosos em vegetação de Caatinga no semi-árido de Alagoas. **Acta Botanica Brasílica**, v. 25, p. 885-889, 2011.

MENEZES, A.A.; LEITE, A.B.X.; APTROOT, A.; CACERES, M.E.S. New lichen species from the Caatinga in Chapada do Araripe, northeastern Brazil. **The Bryologist**, v.116, p. 302-305, 2013.

MITTERMEIER, R. A.; MYERS, N.; THOMSEN, J. B.; FONSECA, G. A. B. DA; OLIVIERI, S. Biodiversity hotspots and major tropical wilderness areas: approaches to setting conservation priorities. **Conservation Biology**, v. 12, n. 3, p. 516-520, 1998.

OUTORGA. 2012. www.outorga.com.br. Acessado em: 04/02/2014.

ROBERT, V.; STEGEHUIS, G.; STALPERS, J. **The MycoBank engine and related databases**. 2005. <http://www.mycobank.org>. Acessado em: 06 de junho de 2014.

SILVA, M.S.; MINTER, D.W. Fungi from Brazil recorded by Batista and coworkers. **Mycological Papers**, v. 169, p. 1-585, 1995.

SILVA, H.S.A.; TOZZI, J.P.L.; BETTIOL, W.; TERRASAN, C.R.F. Endophytic microorganisms from coffee tissues as plant growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust. **Biological Contro**, v. 63, p. 62-67, 2012.

SOARES, W.R.O.; DIANESE, J.C. New *Meliola* species on fabaceous hosts from the Brazilian Cerrado. **Mycological Progress**, v. 13, p. 321-331, 2014.

VAREJÃO, E.V.V.; DEMUMER, A.J.; BARBOSA, L.C.A.; BARRETO, R.W.; VIEIRA, B.S. Toxicidade de filtrados de cultura de *Alternaria euphorbiicola* em folhas de *Euphorbia heterophylla*. **Planta Daninha**, v. 31, p. 1-9, 2013.

CAPÍTULO 1

Pilidiella sp. associada à folhagem de *Qualea grandiflora* no
Cerrado Brasileiro¹

¹Artigo a ser ajustado para submissão na Mycotaxon.

***Pilidiella* sp. associada à folhagem de *Qualea grandiflora* no Cerrado Brasileiro**

Autora: Franciane dos Santos França

Orientador: Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza

RESUMO: *Qualea grandiflora* é uma planta pertencente à Vochysiaceae, família amplamente distribuída no Cerrado Brasileiro, considerado um vasto bioma brasileiro de grande diversidade biológica. Amostras de folhas de *Q. grandiflora* com lesões necróticas foram coletadas no Parque Nacional de Brasília - DF em julho de 2013. Observou-se nas lesões a presença de estruturas fúngicas das quais foi isolado um fungo em cultura pura cuja morfologia e análise molecular permitiu identificá-lo como uma nova espécie do gênero *Pilidiella*.

Palavras-chave: Coelomycetes, *Diaporthales*, ITS, LSU, Cerrado, taxonomia de fungos.

***Pilidiella* sp. associated *Qualea grandiflora* foliage in the Brazilian Cerrado**

ABSTRACT: *Qualea grandiflora* is a plant species belonging to Vochysiaceae, which is widely distributed in the Brazilian Cerrado, a biome with wide biological diversity. Leaves samples of *Q. grandiflora* with necrotic lesions were collected in the Parque Nacional de Brasília - DF in July 2013. Fungal structures were observed on necrotic lesions that was isolated in pure culture. The morphology and molecular analysis showed that identification as a new species of the genus *Pilidiella*.

keywords: Coelomycetes, *Diaporthales*, ITS, LSU, Cerrado, fungal taxonomy.

INTRODUÇÃO

Qualea glandiflora Mart. é uma planta típica do Cerrado, conhecida como pau terra, pertencente à família Vochysiaceae e é utilizada regionalmente na medicina popular. Seu potencial no controle alternativo de fitopatógenos foi estudado por (SILVA JUNIOR, 2005).

O Cerrado é um bioma com vasta riqueza biológica (AQUINO & OLIVEIRA, 2006) ocupando uma área de 2 milhões de Km² na região central do Brasil. É reconhecido como o segundo maior bioma do Brasil, sendo definido como tropical e com estações de seca bem definidas no inverno e chuvoso no verão (OUTORGA, 2012).

O gênero *Pilidiella* está inserido na ordem Diaporthales e família Schizoparmaceae (ROSSMAN & CASTLEBURY, 2007), tem uma distribuição cosmopolita e está associado com sintomas de doenças em muitas plantas.

Um fungo reconhecido como pertencente ao gênero *Pilidiella* foi encontrado associado a manchas foliares em *Q. grandiflora*. O presente estudo objetivou realizar a descrição morfológica, análise filogenética e ilustração do fungo a fim de identificar a espécie de *Pilidiella* associada a *Q. grandiflora*.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta, isolamento e caracterização morfológica.

Folhas com manchas foliares em *Q. grandiflora* foram coletadas no Parque Nacional de Brasília/DF em julho de 2013. O material coletado foi devidamente acondicionado e conduzido ao Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia da UFRB para confecção de exsicatas, isolamento, preservação e identificação fúngica. Uma parte das amostras foi acondicionada entre folhas secas de jornal e em prensa botânica para exsicatas. As folhas de jornal foram substituídas diariamente até a secagem do material. Após a confirmação da identificação da planta hospedeira, o material foi incorporado ao Herbário da UFRB. As amostras também foram analisadas ao microscópio estereoscópico buscando estruturas fúngicas para posterior observação em microscopia de transmissão de luz, sendo possível identificar o gênero encontrado utilizando

chaves taxonômicas (NAG RAJ, 1993; SUTTON, 1980). O isolamento foi feito retirando-se fragmentos das folhas com as frutificações do fungo e transferidos para placas de Petri com o meio de cultura Batata-Dextrose-Agar (BDA) 1/5 e mantidas em câmara de crescimento (BOD) com temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. As colônias foram preservadas em tubos estéreis de 2 mL contendo meio de cultura (BDA) 1/5, um deles foi coberto com água destilada esterilizada e o outro com óleo mineral, mantidos sob refrigeração (CASTELLANI, 1939; SHERF, 1943). As características culturais do fungo foram estudadas em placas de Petri contendo BDA. As culturas estudadas estão depositadas na Coleção Micológica da UFRB.

Para a caracterização morfológica do fungo foram feitas preparações microscópicas entre lâmina e lamínula, a partir das estruturas reprodutivas fúngicas presentes nas folhas e nas culturas em BDA. A observação dos picnídios na intimidade dos tecidos foliares foi realizada por meio de cortes transversais à mão-livre. Usou-se como corantes: o azul de algodão e a fucsina ácida diluídos a 1% em lactofenol de Amann. A análise morfométrica foi feita em um microscópio Leica Olympus CX 41 RF. As fotomicrografias foram obtidas com auxílio de câmera digital acoplada ao microscópio.

Caracterização molecular.

O isolado foi cultivado em meio líquido BD (batata-dextrose) por 5 dias. O DNA total do isolado foi extraído empregando-se o método proposto por DOYLE & DOYLE (1990). Cerca de 50 mg de micélio foi coletado e macerado em nitrogênio líquido no cadinho com almofariz. Em seguida, transferido para tubos estéreis de 1,5 ml, aos quais foram adicionados 650 μl de tampão de extração (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM EDTA pH 8,0; 1,4 M NaCl; 2 % CTAB; 1 % PVP; 0,2 % β -Mercaptoetanol; 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ proteinase K). Os tubos foram misturados por inversão e incubados a 55°C por 1 hora em banho-maria, sendo agitados a cada 15 min. Após a incubação, foi realizada a precipitação das proteínas, adicionando-se 650 μl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). As amostras agitadas manualmente por 2 min e centrifugadas por 5 min a 12000 rpm. A fase aquosa superior de cada amostra foi transferida para um novo tubo estéril de 1,5 ml. Adicionou-se na fase superior, 200 μl do

tampão de extração e 650 µl de CIA. Os tubos foram centrifugados por 5 min a 12000 rpm. A fase aquosa novamente foi transferida para novo tubo estéril de 1,5 ml e adicionou-se 200 µl do tampão de extração e 650 µl de CIA. Os tubos foram centrifugados novamente por 5 min a 12000 rpm. Depois coletou-se a fase aquosa superior, adicionando nela um volume igual de isopropanol gelado (cerca de 600 µl). As amostras foram incubadas a -80⁰ C por 15 min. Posteriormente centrifugadas por 5 min a 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com 1mL de etanol 70% gelado, centrifugado por 3 min a 12000 rpm e seco à temperatura ambiente. O *pellet* foi ressuscitado em 50 µl de TE (10mM Tris HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA), contendo 10 µg/mL RNase. As amostras ficaram por algumas horas em temperatura ambiente para completa ressuspensão. O DNA foi armazenado em freezer -80 °C.

Para amplificação e seqüenciamento de fragmentos da região ITS do rDNA foram utilizados os primers ITS1 e ITS4 (WHITE *et al.*, 1990). A região LSU também foi seqüenciada utilizando os primers LR7 e LR0R (VILGALYS & HESTER, 1990). As amplificações ocorreram em um termociclador (peqSTAR 96 universal gradiente). O sequenciamento das amostras ocorreu de acordo com o método de SANGER *et al.*, (1977). As amostras foram submetidas à eletroforese em seqüenciador do tipo ABI prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystem), segundo recomendação do fabricante. A edição e montagem das seqüências foram realizadas com o programa Sequencher 5.1 (Gene Code Corporation). O programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990) foi usado para comparar as seqüências de cada isolado com aquelas encontradas em bancos de dados públicos que foram incluídas nas análises para fins de comparação. O programa MEGA 5 (TAMURA *et al.*, 2011), foi usado para alinhar as seqüências e para gerar as árvores filogenéticas. O método Máxima Verossimilhança (ML) com análises de *bootstrap* com 1.000 reamostragens foram usados na construção das árvores.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pilidiella sp. F. S. França, J. L. Bezerra, F. B. Rocha & J. T. de Souza sp. nov. (Figs. 1 e 2).

Lesões epífilas, necróticas, marrom-claras, irregularmente distribuídas, de tamanho variado. *Picnídios* intra-epidérmicos, subglobosos, ostiolados, 88-155 μm de diâmetro; paredes pseudoparenquimáticas, 12,5 μm de espessura, formadas por células poligonais ou irregulares, 6,0-10,5 μm de diâmetro. *Células conidiogênicas* fialídicas, 10-17 x 2-4 μm , hialinas, mucronadas. *Conídios* hialinos quando jovens, tornando-se marrom-claros à maturidade, unicelulares, elipsóides, lisos, 10-12,5 x 7,5 μm , sem cicatriz conidial, gutulados. Culturas em BDA apresentando micélio branco alaranjado formado por hifas ramificadas, septadas, hialinas.

Espécime examinado: BRASIL. DF: Parque Nacional de Brasília, julho de 2013, J. T. de Souza, CMR 560 (Coleção Micológica do Recôncavo – CCAAB/UFRB).

Habitat: Em folhas de *Q. grandiflora* (Vochysiaceae).

Comentários: As análises morfológicas e moleculares comprovam que o fungo presente em *Q. grandiflora* pertence ao gênero *Pilidiella*. SUTTON (1980) e NAG RAJ (1993) trataram *Pilidiella* como sinônimo de *Coniella*. No entanto, CASTLEBURY *et al.* (2002), baseados em análises de DNA, concluíram que *Pilidiella* é distinto de *Coniella* e ambos os gêneros devem ser mantidos como distintos um do outro na ordem Diaporthales. *Pilidiella* tem duas características morfológicas principais separando-o de *Coniella*: a presença de conídios hialinos a marrom claro, em contraste com os conídios marrom escuro de *Coniella*. Além disso, *Pilidiella* tem a proporção entre o comprimento e a largura dos conídios maior do que 1,5 e *Coniella* igual ou menor do que 1,5 (VAN NIEKERK *et al.*, 2004). *Pilidiella* sp. difere das demais espécies congênicas devido principalmente aos seus conídios não apresentarem cicatrizes no local

de inserção no conidióforo e nem possuírem apêndice mucóide. (Figuras 1 e 2).

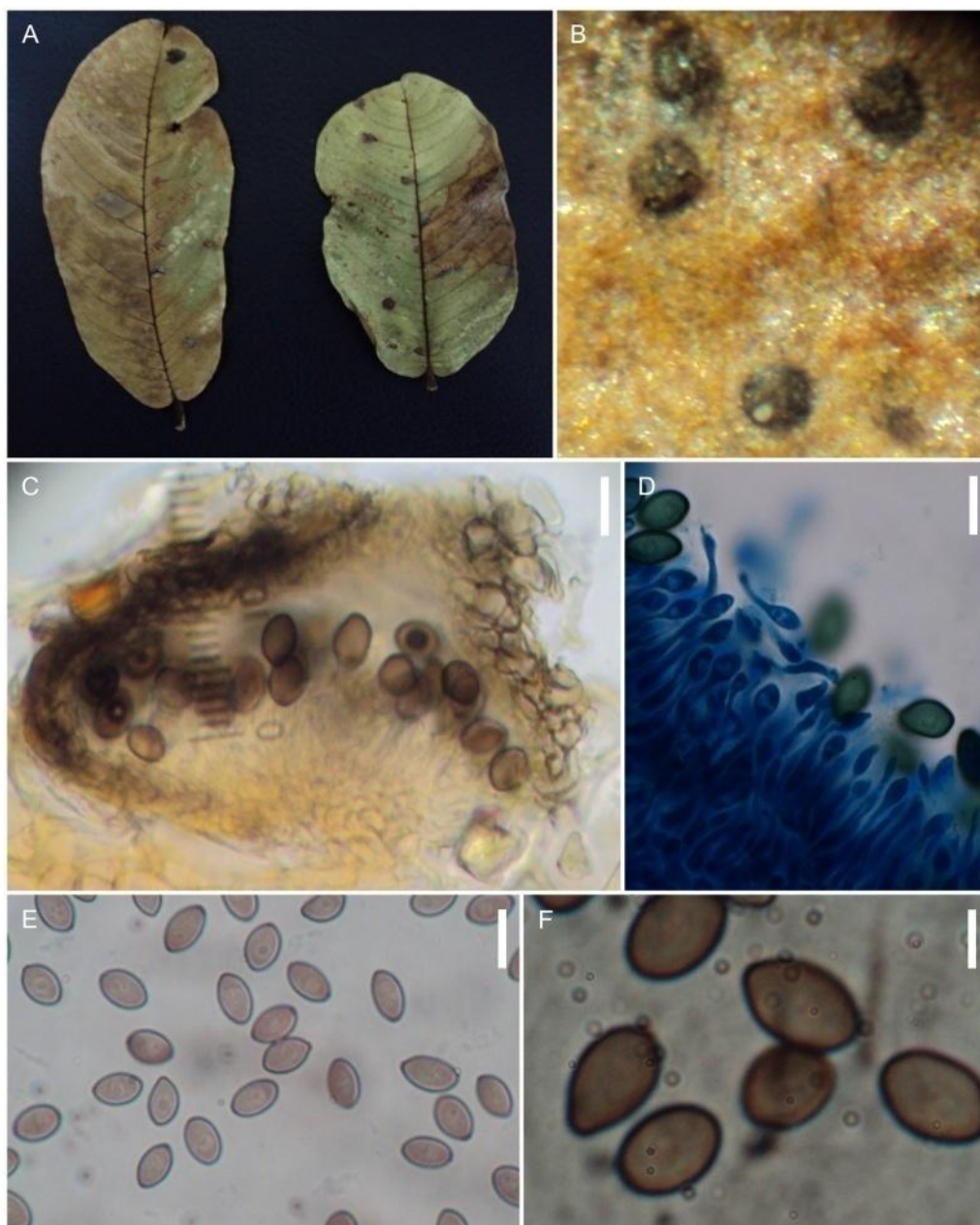


Figura 1. *Pilidiella* sp. A. Manchas foliares em *Qualea grandiflora*. B. Vista superior dos picnídios. C. Corte longitudinal dos picnídios. D. Conidióforos. E, F. Conídios. Barras: C, D, E = 10 μ m. F = 5 μ m.

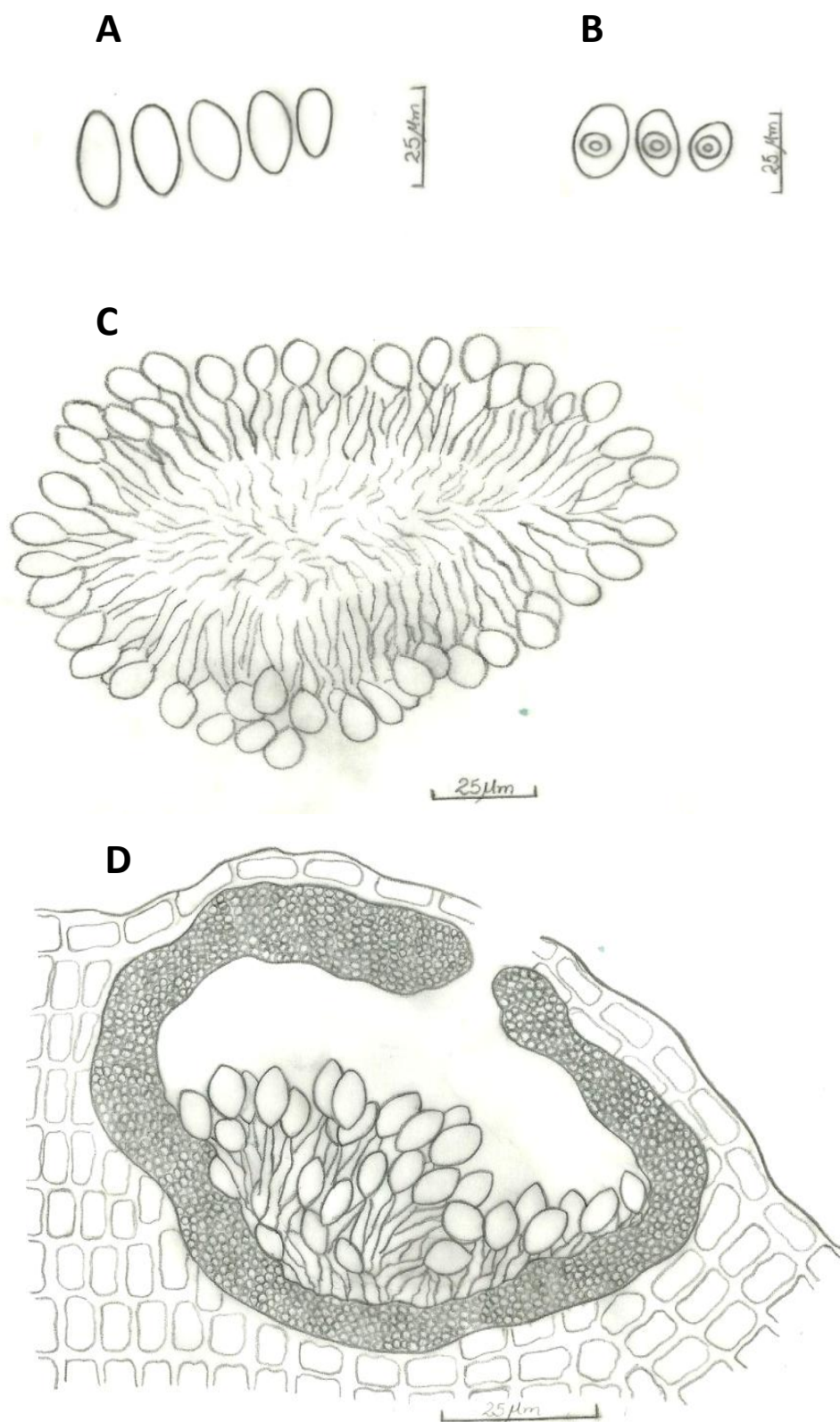
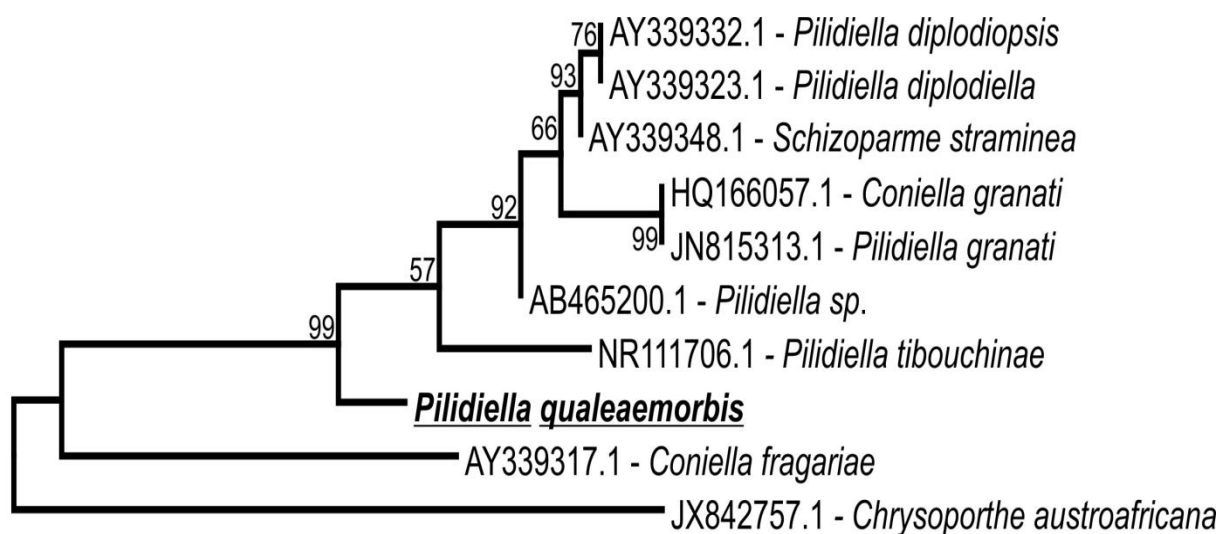


Figura 2. *Piliella* sp. A. Conídios. B. Conídios gutulados. C. Conídios presos às células conidiogênicas. D. Corte longitudinal do picnídio.

A



B

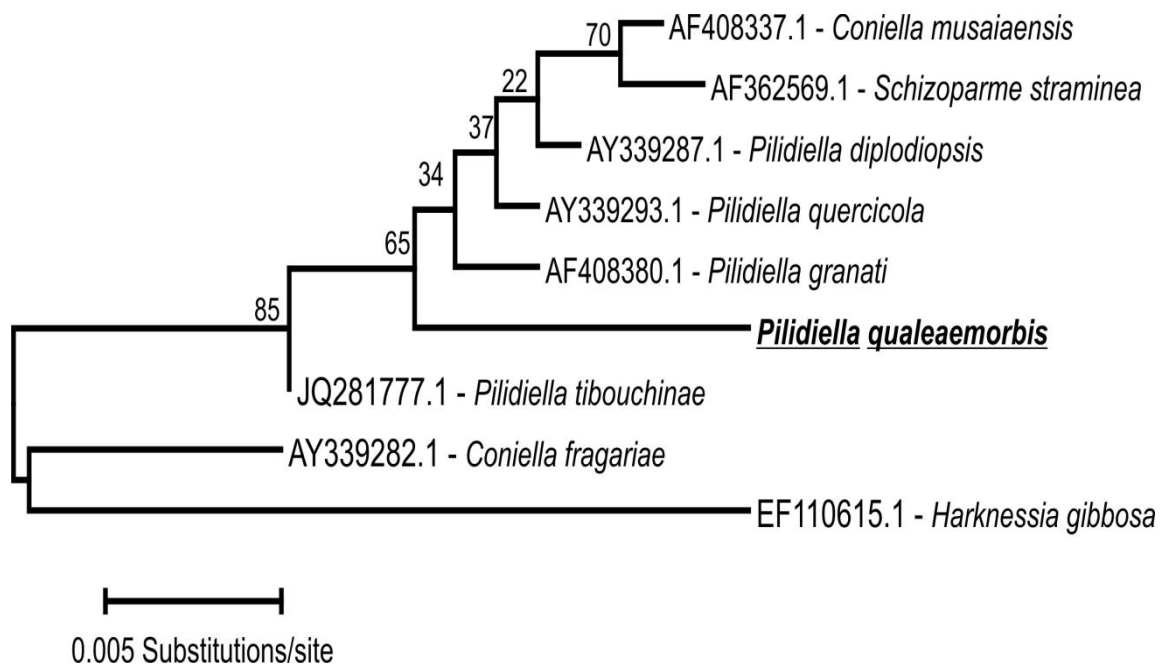


Figura 3. Agrupamentos gerados com a espécie *Pilidiella sp.* e espécies relacionadas. **(A)** Árvore filogenética gerada a partir de 600 nucleotídeos alinhados de sequências do gene ITS. O agrupamento foi gerado com o método Máxima verossimilhança e modelo evolutivo Kimura 2 parâmetros + G. Os valores de bootstrap (1000 repetições) são mostrados nos ramos correspondentes. **(B)** Árvore filogenética gerada a partir de 856 nucleotídeos alinhados de sequências do gene LSU. O agrupamento foi gerado com o método Máxima verossimilhança e modelo evolutivo Tamura 3 parâmetros + I. Os valores de bootstrap (1000 repetições) são mostrados nos ramos correspondentes.

CONCLUSÃO

Uma espécie nova de *Pilidiella* está sendo proposta com base em estudos morfológicos e moleculares que a distinguem das demais espécies congêneras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AQUINO, F.G. & OLIVEIRA, M.C. **Reserva legal no bioma Cerrado: uso e preservação**. Planaltina: Embrapa Cerrados. 2006

CASTELLANI, A. **Viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water**. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 42, 225-226. 1939.

CASTLEBURY, L.A., ROSSMAN, A.Y., JAKLITSCH, W.J. & VASILYEVA, L.N. A preliminary overview of the Diaporthales based on large subunit nuclear ribosomal DNA sequences. **Mycologia** 94:1017–1031. 2002.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n. 1, p. 13-15. 1990.

NAG RAJ, T.R. **Coelomycetous anamorphs with appendage-bearing conidia**. *Mycologue Publications*. p. 1101. 1993.

NIEKERK, J.M. VAN; GROENEWALD, J.Z; VERKLEY, G.J.M; FOURIE, P.H; WINGFIELD, M.J; CROUS P.W. Systematic reappraisal of *Coniella* and *Pilidiella*, with specific reference to species occurring on *Eucalyptus* and *Vitis* in South Africa. **Mycological Research** 108: 283–303. 2004.

OUTORGA. 2012. www.outorga.com.br. Acessado em: 04/02/2014.

ROSSMAN, A.Y.; FARR, D.F.; CASTLEBURY, L.A. A review of the phylogeny and biology of the *Diaporthales*. **Mycoscience** **48**(3): 135-144: Springer for Mycological Society of Japan. 2007.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SILVA JUNIOR, M.C. **100 Árvores do Cerrado: guia de campo**. Brasília: Rede de Sementes do Cerrado. 2005.

SHERF, A. A method for maintaining *Phytophthora* in culture for long periods without transfer. **Phytopathology**, v. 33, p. 330-332. 1943.

SUTTON, B.C. **The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata**. p. 696. 1980.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N. *et al.* MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n.10, p. 2731-2739, 2011.

VILGALYS, R. & HESTER, M. **Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species**. *Journal of Bacteriology* 172: 4239-4246.1990.

WHITE, T.J; BRUNS, T; LEE, S; TAYLOR, J. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. In: *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA: 315–322. 1990.

CAPÍTULO 2

Parafulvia **sp. em tricomas foliares de *Hymenaea courbaril***
encontrada na Caatinga, Brasil¹

¹Artigo a ser ajustado para submissão na Mycotaxon.

***Parafulvia* sp. em tricomas foliares de *Hymenaea courbaril* encontrada na Caatinga, Brasil**

Autora: Franciane dos Santos França

Orientador: Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza

Co-Orientador: Prof. Dr. José Luiz Bezerra

RESUMO: *Hymenaea courbaril* (nome comum: Jatobá) é uma espécie da família Fabaceae, comumente encontrada no bioma Caatinga. Amostras de folhas desta planta foram coletadas no município de Caldeirão Grande, Bahia, cujos tricomas estavam colonizados por estruturas de um fungo. O fungo foi isolado em cultura pura e com base em suas características morfológicas e moleculares foi identificado como uma espécie desconhecida para a ciência.

Palavras-chave: Hyphomycetes, ITS, LSU, Caatinga, Taxonomia

***Parafulvia* sp. in leaf trichomes of *Hymenaea courbaril* found in the Caatinga, Brazil**

ABSTRACT: *Hymenaea courbaril* L. (common name Jatobá) is a plant species belonging to Fabaceae easily found in the Caatinga biome. Leaf samples of this plant were collected in the municipality of Caldeirão Grande, Bahia, on which trichomes were colonized by a fungus. The fungus was isolated in pure culture and based on its morphology and DNA sequences it was identified as unknown species for science.

Keywords: Hyphomycetes, ITS, LSU, Caatinga, Taxonomy

INTRODUÇÃO

Hymenaea coubaril L. é uma espécie arbórea da família Fabaceae (Leguminosae-Caesalpinioideae), distribuída por quase todo o Brasil, conhecida como jatobáé uma espécie comum no bioma Caatinga. É uma espécie que tem sua importância econômica e deve ser utilizada e manejada de modo sustentável (ALVINO *et al.*, 2005). Essa espécie também pode ser encontrada em vários biomas como Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal, sendo uma espécie nativa, mas não endêmica no Brasil.

Dentre os biomas brasileiros, a Caatinga, localizada na região semi-árida do nordeste brasileiro (DRECHSLER-SANTOS *et al.*, 2009), está entre as regiões onde ainda são escassos os estudos de biodiversidade dos microrganismos. Esse bioma tem apenas 1% de seu território protegido por meio de reservas legais (LEAL *et al.*, 2003).

Em uma expedição de coleta pela Caatinga da Bahia, foi encontrado um fungo associado aos tricomas de *Hymenaea courbaril*, o qual tinha características do gênero *Parafulvia*. O objetivo desse trabalho foi descrever e identificar a espécie de *Parafulvia* encontrada.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta, isolamento e caracterização morfológica.

Foram realizadas coletas de folhas de *Hymenaea courbaril* aparentemente parasitadas por fungos em Caldeirão Grande/BA em julho de 2013. O material coletado foi devidamente acondicionado e conduzido ao Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia da UFRB para realização de estudos envolvendo preparação de exsicatas, isolamento e identificação fúngica. Uma parte das amostras foi acondicionada entre folhas secas de jornal e prensada para eliminação da umidade. As folhas de jornal foram substituídas diariamente até a secagem completa do material. Após identificação da planta e do fungo parasita o material (exsicata) foi incorporado ao Herbário da UFRB. Frutificações fúngicas observadas ao estereoscópio foram colocadas entre lâmina e lamínula para análise morfológica em microscópio de luz usando-se

os corantes azul de algodão e fucsina básica (1%) em lactofenol de Amann, sendo possível identificar o gênero encontrado utilizando as descrições realizadas por (SEIFERT *et al.*, 2011). As medidas das estruturas fúngicas foram feitas com o micrômetro ocular e as microfotografias foram tomadas em um microscópio Leica Olympus CX 41 RF com câmara digital acoplada. Fragmentos de folha e tricomas foram esterelizados superficialmente com cloro 1% e colocados para isolamento do fungo em meio de cultura Batata-Dextrose-Agar (BDA) 1/5, em placas de Petri mantidas em câmara de crescimento (BOD) à temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. As culturas puras do fungo foram preservadas em tubos estéreis de 2 ml contendo uns água destilada esterilizada e outros contendo óleo mineral, ambos contendo meio de cultura BDA, mantidos sob refrigeração (CASTELLANI, 1939; SHERF, 1943). As culturas foram caracterizadas em meio de BDA, após ocuparem todo o diâmetro da placa (9 cm). Culturas do fungo acham-se depositadas na coleção micológica do CCAAB/UFRB.

Caracterização molecular.

O isolado foi cultivado em meio líquido BD (batata-dextrose) por 5 dias. O DNA total do isolado foi extraído empregando-se o método proposto por DOYLE & DOYLE (1990). Cerca de 50 mg de micélio foi coletado e macerado em nitrogênio líquido no cadinho com almofariz. Em seguida, transferido para tubos estéreis de 1,5 ml, aos quais foram adicionados 650 μl de tampão de extração (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM EDTA pH 8,0; 1,4 M NaCl; 2 % CTAB; 1 % PVP; 0,2 % β -Mercaptoetanol; 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ proteinase K). Os tubos foram misturados por inversão e incubados a 55°C por 1 hora em banho-maria, sendo agitados a cada 15 min. Após a incubação, foi realizada a precipitação das proteínas, adicionando-se 650 μl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). As amostras agitadas manualmente por 2 min e centrifugadas por 5 min a 12000 rpm. A fase aquosa superior de cada amostra foi transferida para um novo tubo estéril de 1,5 ml. Adicionou-se na fase superior, 200 μl do tampão de extração e 650 μl de CIA. Os tubos foram centrifugados por 5 min a 12000 rpm. A fase aquosa novamente foi transferida para novo tubo estéril de 1,5 ml e adicionou-se 200 μl do tampão de extração e 650 μl de CIA. Os tubos

foram centrifugados novamente por 5 min a 12000 rpm. Depois coletou-se a fase aquosa superior, adicionando nela um volume igual de isopropanol gelado (cerca de 600 μ l). As amostras foram incubadas a -80° C por 15 min. Posteriormente centrifugadas por 5 min a 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com 1mL de etanol 70% gelado, centrifugado por 3 min a 12000 rpm e seco à temperatura ambiente. O *pellet* foi ressuscitado em 50 μ l de TE (10mM Tris HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA), contendo 10 μ g/mL RNase. As amostras ficaram por algumas horas em temperatura ambiente para completa ressuspensão. O DNA foi armazenado em freezer -80° C.

Para amplificação e seqüenciamento de fragmentos da região ITS do rDNA foram utilizados os primers ITS1 e ITS4 (WHITE *et al.*, 1990). A região LSU também foi seqüenciada utilizando os primers LR7 e LR0R (VILGALYS & HESTER, 1990). As amplificações ocorreram em um termociclador (peqSTAR 96 universal gradiente). O sequenciamento das amostras ocorreu de acordo com o método de (SANGER *et al.*, 1977). As amostras foram submetidas à eletroforese em seqüenciador do tipo ABI prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystem), segundo recomendação do fabricante. A edição e montagem das seqüências foram realizadas com o programa Sequencher 5.1 (Gene Code Corporation). O programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990) foi usado para comparar as seqüências de cada isolado com aquelas encontradas em bancos de dados públicos que foram incluídas nas análises para fins de comparação. O programa MEGA 5 (TAMURA *et al.*, 2011), foi usado para alinhar as seqüências e para gerar as árvores filogenéticas. O método Máxima Verossimilhança (ML) com análises de *bootstrap* com 1.000 reamostragens foram usados na construção das árvores.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parafulvia sp. F. S. França, J. L. Bezerra, F. B. Rocha & J. T. de Souza sp. nov. (Figs. 1 e 2).

Colônias hipófilas, escuras, dispersas, desenvolvendo-se sobre tricomas foliares. *Micélio* superficial com *Hifas* marrom-claras, septadas, ramificadas, lisas. *Conidióforos* restritos às células conidiogênicas. *Células conidiogênicas*, unicelulares, subglobosas a subquadráticas, monoblásticas, marrons, 5-7 x 2-5 μm . *Conídios* 12,5-20 x 5-7,5 μm , agrupados, secos, marrons, cilíndricos, estriados, 0-3 septos, isolados ou em cadeias curtas.

Espécime examinado: BRASIL. Bahia. Caldeirão Grande, julho de 2013, J. T. de Souza. CMR 325 (Coleção Micológica do Recôncavo – CCAAB/UFRB).

Habitat: Em folhas de *Hymenaea courbaril* (Fabaceae)

Comentários: O gênero *Parafulvia* possui apenas uma espécie descrita, *Parafulvia indica* (KAMAL RAI, A.N., RAI, A.N. & MORGAN-JONES, G., 1983). *Parafulvia* sp. difere desta espécie por apresentar conídios maiores (12,5-20 x 5-7,5 μm), estriados, 3-septados (Figuras 1 e 2), enquanto *P. indica* possui conídios menores (9-10 x 4-5 μm), lisos e 4-septados. Tricomas foliares são parasitados por muitos fungos filamentosos especializados para viver nesse microhabitat onde a umidade foliar é mantida por mais tempo. SEIFERT *et al.* (2011) descrevem e ilustram hifomicetos diversos que se desenvolvem sobre tricomas.



Figura 1. *Parafulvia* sp. A. Folhas de Jatobá com sintomas associados a *Parafulvia* sp. B. Esporulação sobre os tricomas. C. Conídios em cadeia. D. Conidióforos e conídios. E. Conídios estriados. Barras 10 μm.

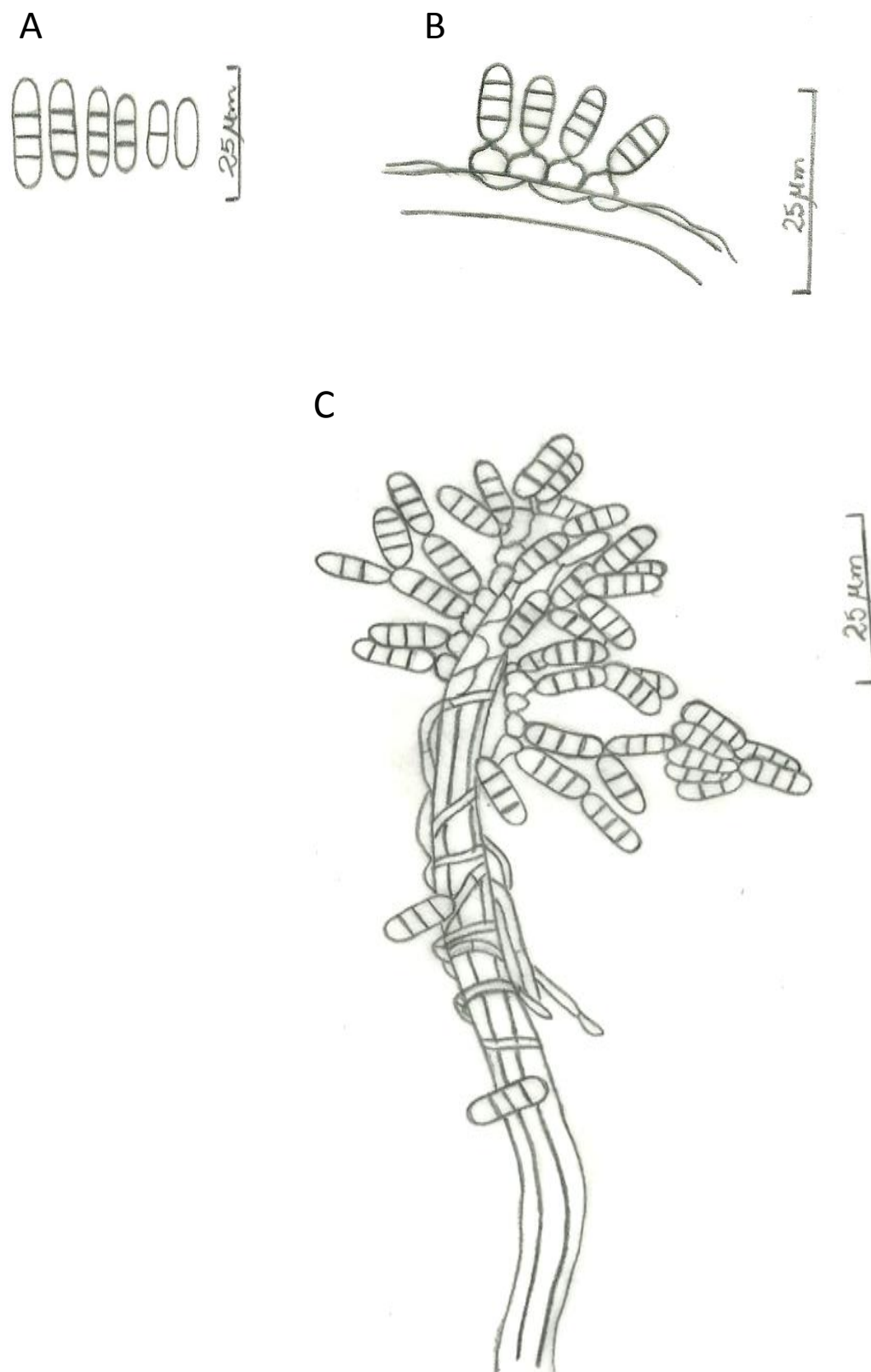
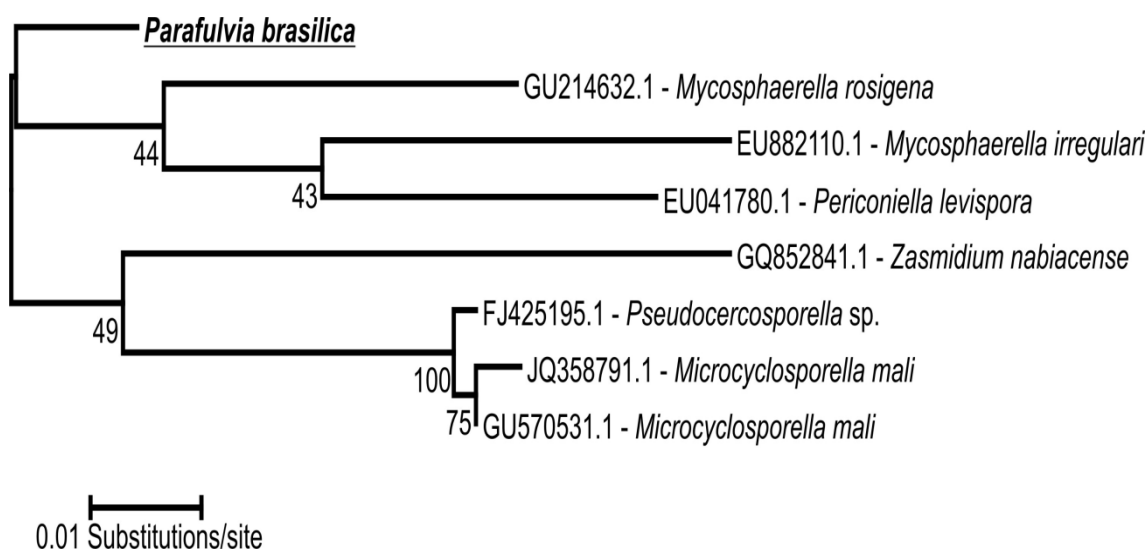


Figura 2. *Parafulvia* sp. A. Conídios. B. Conídios e células conidiogênicas. C. Conídios em cadeia e tricoma foliar.

A



B

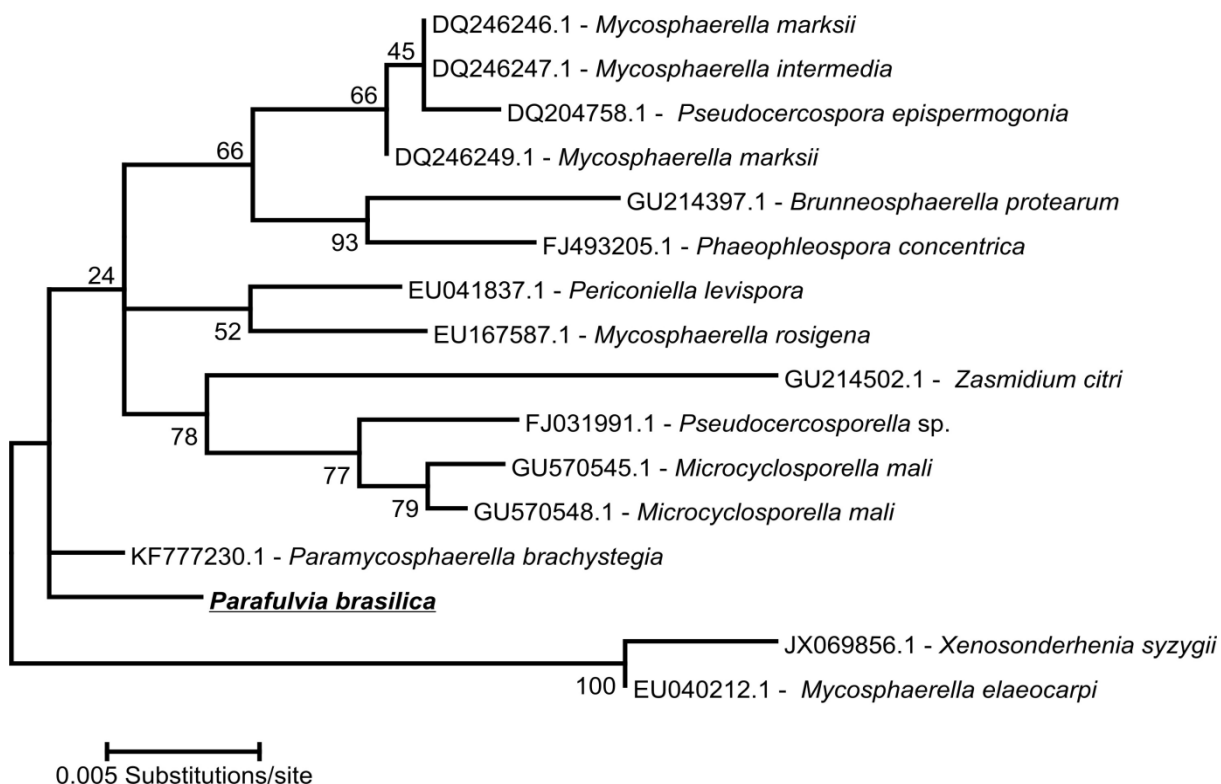


Figura 3. Agrupamentos gerados com a espécie *Parafulvia* sp. e gêneros relacionados. **(A)** Árvore filogenética gerada a partir de 527 nucleotídeos alinhados de sequências do gene ITS. O agrupamento foi gerado com o método Máxima verossimilhança e modelo evolutivo Tamura 3 parâmetros + G. Os valores de bootstrap (1000 repetições) são mostrados nos ramos correspondentes. **(B)** Árvore filogenética gerada a partir de 822 nucleotídeos alinhados de sequências do gene LSU. O agrupamento foi gerado com o método Máxima verossimilhança e modelo evolutivo Kimura 2 parâmetros + G. Os valores de bootstrap (1000 repetições) são mostrados nos ramos correspondentes.

CONCLUSÃO

O fungo estudado sobre tricomas de *Hymenaea coubaril* corresponde a uma nova espécie do gênero *Parafulvia*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALVINO, P. de O.; SILVA, M. F. F. da & RAYOL, B. P. Potencial de uso das espécies arbóreas de uma floresta secundária, na Zona Bragantina, Pará, Brasil. **Acta amazonica**, Manaus, v.35, n.4, p.413-420, 2005.

CASTELLANI, A. **Viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water**. Journal of Tropical Medicine and Hygiene 42, p. 225-226. 1939.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n. 1, p. 13-15. 1990.

DRECHSLER-SANTOS, E.R.; GIBERTONI, T.B. A re-evaluation of the lignocellulolytic Agaricomycetes from the Brazilian semi-arid region. **Mycotaxon** 108: 241-244. 2009.

LEAL, I.R.; TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. **Ecologia e conservação da Caatinga**. Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. 2003.

KAMAL RAI, A.N., RAI, A.N. & MORGAN-JONES, G. Notes on hyphomycetes, XLVI. *Parafulvia*, a new foliicolous, phaeophragmosporous genus with catenate conidia. **Mycotaxon** 18: 67-71. 1983.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SEIFERT, K.A.; KENDRICK, B.; GAMS, W. **The Genera of Hyphomycetes**. CBS Fungal Biodiversity Centre, the Netherlands. p. 1–997. 2011.

SHERF, A. A method for maintaining *Phytophthora sepedonica* in culture for long periods without transfer. **Phytopathology** 33:330-332. 1943.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N. *et al.* MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n.10, p. 2731-2739, 2011.

VILGALYS, R. & HESTER, M. **Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species**. *Journal of Bacteriology* 172: 4239-4246.1990.

WHITE, T.J; BRUNS, T; LEE, S; TAYLOR, J. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. In: *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA: 315–322. 1990.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos na execução deste trabalho foi proposto duas prováveis espécies novas, *Pilidiella* sp. associada a lesões foliares em *Qualea grandiflora* no bioma Cerrado e *Parafulvia* sp. em tricomas foliares em *Hymenaea courbaril* no bioma Caatinga.

É preciso estudos mais aprofundados sobre os agrupamentos gerados com a espécie *Pilidiella* sp. e as espécies relacionadas e também com a espécie *Parafulvia* sp. e gêneros relacionados.

Além disso, este trabalho permitiu contribuir com a gama de hospedeiros dos gêneros *Pilidiella* e *Parafulvia*.