



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
CAMPUS DARCY RIBEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA

**CARACTERIZAÇÃO MORFO-MOLECULAR DE *Gliocephalotrichum*
EM DIFERENTES HOSPEDEIROS**

BRASÍLIA– DISTRITO FEDERAL
BRASIL
2018



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
CAMPUS DARCY RIBEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA

RILDO ALEXANDRE FERNANDES DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MORFO-MOLECULAR DE *Gliocephalotrichum*
EM DIFERENTES HOSPEDEIROS**

Dissertação apresentada à
Universidade de Brasília como
requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Fitopatologia
pelo Programa de Pós-Graduação
em Fitopatologia.

Orientador: Prof. Dr. Danilo Batista
Pinho

BRASÍLIA– DISTRITO FEDERAL
BRASIL
2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Rildo Alexandre Fernandes da.
Caracterização morfo-molecular de *Gliocephalotrichum* em diferentes hospedeiros. /
Rildo Alexandre Fernandes da Silva.
Brasília, 2018.
p. 56.

Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia,
Universidade de Brasília, Brasília.

1. *Gliocephalotrichum* – Podridão de frutos.
- I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.
- II. *Gliocephalotrichum* spp. em diferentes hospedeiros.

“Só podemos ver um pouco do futuro, mas o suficiente para nos darmos conta de que há muito o que fazer” (Alan M. Turing).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe por todos os ensinamentos durante a vida, apoio, confiança, educação e amor, a minha irmã Patrícia e minhas sobrinhas Thaissa e Thainá, por todo amor independente da distância. Aos meus amigos pelo apoio, conversas e momentos de descontração, os quais contribuíram indiretamente para realização desse trabalho, em especial a Fabrício Tillmann, que sempre esteve ao meu lado;

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram diretamente para o término desse trabalho, sobretudo a Camila Pereira de Almeida, a qual teve grande participação na execução de todas etapas desse trabalho. Também agradeço aos amigos Deziany da Silva Ferreira, Aline Suelen da Silva, Jennifer Decloquement, Lincoln Bizerra, Raycene Rosa Leite, Débora Cervieri Guterres, Samuel Elias Galvão, Bianca Samay Bonfim e Justino Dias Neto por serem verdadeiros pilares de apoio e incentivo;

Quero agradecer os professores Rafael Ferreira Alfenas e Solange Maria Bonaldo da Universidade Federal de Mato Grosso, por serem eternos amigos e fonte de inspiração profissional e pessoal;

Ao professor Danilo Batista Pinho pela orientação, apoio e proposição de novos desafios. Ao Dr. Ailton Reis da Embrapa Hortaliças por idealizar e ceder gentilmente os isolados fúngicos;

Agradeço a bolsista de Iniciação Científica da Coleção Micológica, Ana Clara Ribeiro Quitania, pela ajuda oferecida;

Ao professor Dr. Leonardo Silva Boiteux e o Dr. Rafael Ferreira Alfenas por compor a banca examinadora e pelas sugestões durante o exame;

À Universidade de Brasília pela oportunidade de realização do Mestrado em Fitopatologia, um dos meus sonhos;

À Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de recursos financeiros e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de Mestrado.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do professor Dr. Danilo Batista Pinho, com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

CARACTERIZAÇÃO MORFO-MOLECULAR DE *Gliocephalotrichum* EM DIFERENTES HOSPEDEIROS

RILDO ALEXANDRE FERNANDES DA SILVA

DISSERTAÇÃO APROVADA em: 26/ 07/ 2018 por:

Dr. Leonardo Silva Boiteux
Universidade de Brasília (Examinador Interno)

Dr. Rafael Ferreira Alfenas
Universidade Federal de Mato Grosso (Examinador Externo)

Dr. Danilo Batista Pinho
Universidade de Brasília (Presidente - Orientador)

**BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL
BRASIL
2018**

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	II
RESUMO GERAL	IV
INTRODUÇÃO.....	6
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
1.1. <i>Gliocephalotrichum</i> spp.....	9
1.2. Diversidade de espécies e distribuição geográfica	11
1.3. Substratos e hospedeiros	14
1.4. Dificuldades de identificação de <i>Gliocephalotrichum</i>	16
2. MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1. Obtenção de isolados e culturas monohifais.....	21
2.2. Extração e quantificação de DNA.....	21
2.3. Reação em cadeia da polimerase - PCR	22
2.4. Caracterização morfológica de <i>Gliocephalotrichum</i> spp.....	24
2.5. Teste de patogenicidade.....	25
3. RESULTADOS	27
3.1. Caracterização molecular.....	28
3.2. Caracterização morfológica	33
3.3. Patogenicidade	42
4. DISCUSSÃO.....	45
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. *Gliocephalotrichum bulbilium*, Conidióforos (A-C); ápice da ramificação da estipe (D-H); ramificações do conidióforo (I-J); agregado bulbiloide de clamidósporos (K) e conídios (L). Barras: B = 50 μm ; C = 20 μm ; D-L= 10 μm (Fonte: LOMBARD et al. 2014).....9
- Figura 2. Ciclo de formação de conidióforos e clamidósporos. Em meio de cultura os conídios se enlanguescem após 2 horas (A), germinando e se anastomosam (B), crescimento e septação de estipe dando início a formação dos primeiros ramos em torno do septo primário, com concomitante início de formação de clamidósporos (C), formação de ramos secundários (D), formação de fiálides (E), formação de conídios nas fiálides (F) e conidióforo maduro após 24 horas (G). (Adaptado de ELLIS e HESSELTINE, 1962).....10
- Figura 3. Formação de conidióforos de *Gliocephalotrichum* spp. e *Calonectria* spp. mostrando formação de ramificações poliverticilada e formação de ramificações da estipe abaixo do primeiro septo da estipe (A). e ramificações dicotômicas e alongação da extensão da estipe (B).....12
- Figura 4. Distribuição geográfica das espécies de *Gliocephalotrichum*, relatadas em quatro continentes: América, África, Ásia e Oceania.....14
- Figura 5. Conidióforos de *Calonectria*-like, *Calonectria* (A), *Cylindrocladiella* (B), *Gliocephalotrichum* (C), *Gliocladiopsis* (D), *Xenocylindrocladium* (E) e *Curvcladium* (F) (Fonte: CROUS, 2002; DECOCK et al. 1998; SARKENA, 1954).....16
- Figura 6. Marcadores morfológicos utilizados para a caracterização morfológica de cada isolado. Linhas em vermelho correspondem ao comprimento (C), linhas em azul correspondem a largura (L).....24
- Figura 7. Distribuição (por Estado) dos isolados de *Gliocephalotrichum*.....26
- Figura 8. Árvore filogenética obtida por Inferência Bayesiana com sequencias de Fator de alongação com 54 isolados de *Gliocephalotrichum* spp. com a indicação de hospedeiro e local de coleta respectivo. Isolados em destaque foram os selecionados para a análise multigênica. A probabilidade posterior é indicada acima dos nós e com as linhas mais grossas indicando probabilidade maior ou igual a 0,99 por análise de IB.....28
- Figura 9. Árvore filogenética concatenada com sequências das regiões Fator de alongação, β -tubulina, LSU, ITS e Histona 3 obtida por Inferência Bayesiana. A probabilidade posterior é indicada acima dos nós e com as linhas mais grossas indicando probabilidade maior ou igual a 0,99 por análise de IB. A árvore foi enraizada com *Calonectria candelabrum* CPC1675. Os espécimes deste estudo estão destacados em negrito.....32
- Figura 10. *Gliocephalotrichum bulbilium* (CCUB12, cultura examinada). A. Conidióforos em SNA com folhas de cravo; B, C. Conidióforos; D, E. Conidióforos penicilados com ramos e fiálides; F, G. ápice da ramificação da estipe; H. Conídios; I, Clamidosporos. - Scale bars: A=0,1mm; B=20 μm (se aplica a C-E); F=10 μm (se aplica a G-J).....34
- Figura 11. *Gliocephalotrichum* sp. nov. 1 (CCUB232, cultura tipo). A. Conidióforos em SNA com folhas de cravo; B, C. Conidióforos; D, E. Conidióforos penicilados com ramos e fiálides; F, G. ápice da ramificação da estipe; H. Clamidósporos; I.

	Conídios. - Scale bars: A=0,1mm; B=20µm (se aplica a C-E); F=10µm (se aplica a G-I).....	36
Figura 12.	<i>Gliocephalotrichum</i> sp. nov. 2 (CCUB231, cultura tipo). A, B. Conidióforos em SNA com folhas de cravo; C, D. Conidióforos; E, F. Conidióforos penicilados com ramos e fiálides; G. Conídios; H. Clamidósporo; I-J. Ápice da ramificação da estipe. - escala: A-B=0,1mm; C=20µm (se aplica a D-F); G=10µm (se aplica a H-J).....	38
Figura 13.	<i>Gliocephalotrichum</i> sp. nov. 3 (CCUB301, cultura tipo). A. Conidióforos em SNA com folhas de cravo; B, C. Conidióforos; D, E. Conidióforos penicilados com ramos e fiálides; F. conídios; G. Clamidósporos bulbilóides. - Scale bars: A=0,1mm; B=20µm (se aplica a C); D=10µm (se aplica a E-G).....	40
Figura 14.	Frutos de <i>Caryocar brasiliensis</i> inoculados com diferentes espécies de <i>Gliocephalotrichum</i> , após 10 dias de inoculados, mostrando intensa esporulação e micélio cotonoso na superfície do fruto.....	41
Figura 15.	Frutos de <i>Spondias purpurea</i> inoculados com diferentes espécies de <i>Gliocephalotrichum</i> , dez dias após a inoculação, mostrando intensa esporulação e micélio cotonoso na superfície do fruto.....	42
Figura 16.	Árvore filogenética obtida por Inferência Bayesiana com separação dos grupos, exemplificando a morfologia compartilhada para cada grupo dentro do gênero <i>Gliocephalotrichum</i> . Barras conídios iguais a 10 µm, barras de clamidósporos igual a 20 µm.....	48

RESUMO GERAL

FERNANDES, Rildo Alexandre. **Caracterização morfo-molecular de *Gliocephalotrichum* em diferentes hospedeiros**. 2018. 48p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

Gliocephalotrichum pertence à família Nectriaceae, pertence ao grupo dos *Calonectria*-like por possuir similaridades morfológicas, ecológicas e epidemiológicas ao gênero *Calonectria* dificultando a precisa identificação. Até o momento o gênero *Gliocephalotrichum* permanece pouco estudado. Embora esse gênero seja responsável por causar podridão pós-colheita em diversos frutos, poucas espécies fúngicas foram completamente caracterizadas. Trabalhos recentes revelaram novas espécies e novos relatos desses fitopatógenos em diversos países. No Brasil, o estudo sobre esse fungo é restrito a cinco espécimes encontrados em dois Estados da Federação. Portanto, neste contexto o objetivo desse estudo é caracterizar morfo-molecularmente as espécies de *Gliocephalotrichum* associadas a diferentes hospedeiros. Foram obtidos 54 isolados de *Gliocephalotrichum* a partir de frutos sintomáticos de *Caryocar brasiliense* (pequi), *Cyrtostachys renda* (palmeira vermelha), *Dypsis madagascariensis* (palmeira locuba), *Garcinia mangostana* (mangostin), *Spondias mombin* (cajazinho), *Spondias purpurea* (seriguela), *Syagrus romanzoffiana* (gueroba), *Syzygium cumini* (jamelão), e *Syzygium jambos* (jambo amarelo), nos Estados Goiás, Minas Gerais, Piauí, Tocantins e no Distrito Federal. Culturas monohifais foram utilizadas para a extração do DNA genômico e amplificação da região fator de alongação para todos os isolados. Análises filogenéticas por Inferência Bayesiana dos 54 isolados revelaram seis clados distintos. Para a identificação precisa, isolados representativos de cada clado, hospedeiro e localidade foram selecionados para a caracterização morfológica e o sequenciamento adicional das regiões ITS (*Internal Transcription Spacer*), Histona e β -tubulina. A combinação da análise multigênica com comparações morfológicas revela a existência de três potenciais novas espécies associadas ao cajazinho, gueroba, pequi, seriguela, mangostin e palmeira locuba, que serão propostas seguindo as normas do Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas. *Gliocephalotrichum longibrachium* foi encontrado pela primeira vez no país e em associação com pequi. Adicionalmente, *G. bulbilium* e *G. simplex*, anteriormente relatadas no Brasil a partir de amostras de solo, foram relatadas pela primeira vez em associação com jambo amarelo, jamelão, palmeira locuba, palmeira vermelha e seriguela. Comprova-se nesse estudo que espécimes representativos das seis espécies identificadas são capazes de causar podridão em frutos de pequi e seriguela. Esse é o primeiro trabalho abrangente sobre *Gliocephalotrichum* no Brasil. Estudos complementares são necessários para (i) coletar um número maior de isolados, (ii) examinar os espécimes por caracteres morfológicos e moleculares, (iii) descrever os espécimes considerados como novos, e (iv) relatar as novas ocorrências para o hospedeiro/substrato ou o novo registro de distribuição geográfica.

Palavras-chave: Filogenia molecular, fungos, *Leuconectria*, Nectriaceae, podridão de frutos.

Orientador- Dr. Danilo Batista Pinho- Universidade de Brasília

GENERAL ABSTRACT

FERNANDES, Rildo Alexandre. **Morpho-molecular characterization of *Gliocephalotrichum* in different host** 2018. 48p. Dissertation (Master in Plant Pathology) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

Gliocephalotrichum belongs to the family Nectriaceae, belongs to the group of *Calonectria*-like for it possesses morphological, ecological and epidemiological similarities to the genus *Calonectria*, hindering the precise identification of this genus. So far the genus *Gliocephalotrichum* remains little studied. Although this genus is responsible for causing post-harvest rot in several fruits, few fungal species have been completely characterized. Recent works have revealed new species and new reports of these phytopathogens in several countries. In Brazil, the study on this fungus is restricted to five specimens found in two States of the Federation. Therefore, in this context, the objective of this study is to characterize morpho-molecularly *Gliocephalotrichum* species associated with different hosts. A total of 54 isolates of *Gliocephalotrichum* were obtained from symptomatic fruits of *Caryocar brasiliense* (pequi), *Cyrtostachys renda* (red palm), *Dypsis madagascariensis* (palm of locuba), *Garcinia mangostana* (mangostin), *Spondias mombin* (Cajazinho), *Spondias purpurea* (seriguela), *Syagrus romanzoffiana* (gueroba), *Syzygium cumini* (jamelão), and *Syzygium jambos* (yellow jambo), in the States of Goiás, Minas Gerais, Piauí, Tocantins and in the Distrito Federal. Monophalic cultures were used for genomic DNA extraction and amplification of the elongation factor region for all isolates. Phylogenetic analysis by Bayesian Inference of 54 isolates revealed six distinct clades. For the precise identification, representative isolates of each clade, host, and locality were selected for the morphological characterization and the additional sequencing of the ITS (Internal Transcription Spacer), histone and β -tubulin regions. The combination of multigenic analysis with morphological comparisons reveals the existence of three potentially new species associated with cajazinho, gueroba, pequi, seriguela, mangostin and palm locuba, which will be proposed following the International Code of Nomenclature for Algae, Fungi and Plants. *Gliocephalotrichum longibrachium* was first found in the country and in association with pequi. In addition, *G. bulbilium* and *G. simplex*, previously reported in Brazil from soil samples, were first reported in association with yellow jambo, jamelão, palm of locuba, red palm and seriguela. It is verified in this study that representative specimens of the six species identified are capable of causing rot in small and seriguela fruits. This is the first comprehensive work on *Gliocephalotrichum* in Brazil. Further studies are needed to (i) collect a larger number of isolates, (ii) examine specimens by morphological and molecular characters, (iii) describe specimens considered novel, and (iv) report as new occurrences for the host/substrate or the new geographical distribution record.

Keywords: Cerrado, Molecular phylogeny, fungi, *Leuconectria*, Nectriaceae, fruit rot, postharvest rot.

Guidance Committee- Dr. Danilo Batista Pinho- Universidade de Brasília (Advisor).

INTRODUÇÃO

A família *Nectriaceae* (Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales) compreende aproximadamente 900 espécies pertencentes a 55 gêneros fúngicos (LOMBARD *et al.*, 2014). A maioria dos representantes dessa família sobrevive de forma saprofítica no solo ou como parasitas facultativos de espécies vegetais (ROSSMAN, *et al.*, 1999). Devido à importância agrícola, médica e biotecnológica, alguns gêneros são amplamente estudados no Brasil e no mundo (LOMBARD, *et al.*, 2014).

O gênero *Calonectria* destaca-se entre os representantes da família *Nectriaceae* por ocasionar podridões de raízes, tombamentos de pré e pós emergência, manchas foliares, seca de ponteiros e podridões pós-colheita em várias espécies vegetais. Recentemente, esse gênero foi amplamente caracterizado no Brasil utilizando uma abordagem polifásica para a identificação de isolados obtidos de vários hospedeiros/substratos (ALFENAS *et al.*, 2015).

Embora outros gêneros morfológicamente e ecologicamente similares a *Calonectria* também ocasionem doenças em diferentes tecidos de várias hospedeiras, estudos abrangentes utilizando uma abordagem polifásica ainda são escassos.

O gênero *Gliocephalotrichum* pertence ao grupo de fungos morfológicamente e ecologicamente similares a *Calonectria* spp. (*Calonectria-like*) e foi considerado por muitos anos, um habitante exclusivo do solo (LOMBARD *et al.*, 2014). Embora o gênero tenha sido descrito em 1962, somente após quatro décadas foram descobertas espécies capazes de induzir podridões pós-colheita em frutos (ELLIS e HESSELTINE, 1962; NISHIJIMA e FOLLETT, 2002; CONSTANTELO *et al.*, 2011).

Apesar do crescente registro de espécimes associados com doenças de plantas, o número de espécies de *Gliocephalotrichum* caracterizadas ainda é baixo. Atualmente, 13 espécies de *Gliocephalotrichum* são aceitas, sendo que duas delas também possuem a

descrição da forma sexual, anteriormente denominada *Leuconectria* (KIRK *et al.*, 2008; ROSSMAN *et al.*, 1999). Além disso, informações sobre a distribuição geográfica, gama de hospedeiros, biologia e interação com o hospedeiro ainda são restritas ou limitadas.

Gliocephalotrichum bulbilium J.J. Ellis & Hesselt. foi proposta como a espécie tipo do gênero, enquanto que a verificação dos isolados de *Cylindrocladium simplex* e var. *microclamydosporum* resultou na recombinação para *G. simplex* (Meyer) Willey & Simmons e *G. microclamydosporum* (J. Meyer) Willey & Simmons, respectivamente e na proposição de uma nova espécie nomeada de *G. cylindrosporum* Willey & Simmons (WILEY e SIMMONS, 1971; ELLIS e HESSELTINE, 1962). As espécies *G. humicola* Lombard, Chew. & Crous, *G. mexicanum* Lombard, Serrato-Diaz, French-Monar & Crous, *G. nephelii* Lombard, Serrato-Diaz, French-Monar & Crous, *G. queenslandicum* Lombard & Crous e *G. simmonsii* Lombard, Serrato-Diaz, French-Monar & Crous foram identificadas em amostras de solo e frutos de rambutan (*Nephelium lappaceum*) coletadas em diferentes países (LOMBARD *et al.*, 2014). As espécies *G. bacillisporum* Decock & Huret, *G. longibrachium* Decock & Charue, e *G. ohiense* L.H. Huang & J.A. Schmit foram baseadas em características morfológicas da fase assexual enquanto que *G. grandis* Nong & W.Y. Zhuang foi descrito na forma sexual e assexual (HUANG e SCHMITT, 1973; DECOCK *et al.*, 2006; ZHUANG *et al.*, 2007).

Espécimes de *G. bulbilium* e *G. simplex* foram encontrados nos Brasil, Estados Unidos, Guatemala, Guiana Francesa, Indonésia, México, República Central Africana e Tailândia, enquanto outras espécies possuem distribuição geográfica restrita. *Gliocephalotrichum cylindrosporum*, *G. grandis*, *G. humicola*, e *G. longibrachium* foram descobertas somente na Tailândia, China, Taiwan e Guiana Francesa, respectivamente, enquanto que *G. simmonsii* e *G. nephelii* foram relatadas na Guatemala (DECOCK *et al.*, 2006; LOMBARD *et al.*, 2014).

No Brasil ainda não existe um estudo abrangente sobre o gênero *Gliocephalotrichum*. Um único isolado de *G. bacillisporum* foi relatado em uma raiz de planta no Pará enquanto que o isolado de *G. bulbilium* foi encontrado em uma amostra de solo no mesmo Estado. Os três isolados de *G. simplex* foram obtidos de amostras de solo ou raiz nos estados da Bahia e Pará (LOMBARD *et al.*, 2014).

A incorporação de dados moleculares tem revelado a existência de espécies crípticas (morfologicamente semelhantes, porém geneticamente distintas) na maioria dos gêneros fúngicos, incluindo espécies relacionadas ao gênero *Calonectria* (LOMBARD *et al.*, 2016). Essas informações demonstram a necessidade de estudos abrangentes sobre esse gênero no Brasil e no mundo, utilizando uma abordagem polifásica para ampliar o conhecimento sobre a distribuição geográfica, diversidade genética das espécies e nichos ecológicos desse fungo.

Devido à importância da caracterização morfológica e molecular para a identificação precisa de fungos e a ausência de estudos abrangentes sobre *Gliocephalotrichum*, o objetivo desse trabalho foi caracterizar morfo-molecularmente os espécimes de *Gliocephalotrichum* associados a diferentes hospedeiros no Brasil.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. *Gliocephalotrichum* spp.

O gênero *Gliocephalotrichum* (*Hypocreales*, *Nectriaceae*) foi proposto em 1962 a partir de uma investigação de amostras de solo feita por Ellis e Hesseltine (1962). Ao observar a morfologia dos isolados, os autores concluíram que se tratavam de um novo gênero. *Gliocephalotrichum bulbilium* (Figura 1) foi proposto como a espécie tipo desse novo gênero por possuir hábito saprófita, rápido crescimento; conidióforos com coloração marrom-clara, livres, septados, poliverticilados com formação de ramificações primárias, secundárias e terciárias, fiálides formadas nas extremidades das ramificações; conidióforos com extensões estéreis emergindo abaixo das primeiras ramificações peniciladas; conídios



Figura 1. *Gliocephalotrichum bulbilium*, Conidióforos (A-C); ápice da ramificação da estipe (D-H); ramificações do conidióforo (I-J); agregado bulboide de clamidósporos (K) e conídios (L). : B = 50µm; C= 20 µm; D-L= 10 µm (Fonte: LOMBARD *et al.* 2014).

oblongos a elipsoidais, hialinos, formados sucessivamente em uma massa mucilaginosa (ELLIS e HESSELTINE, 1962).

Ellis e Hesseltine (1962) relatam que o micélio de espécies de *Gliocephalotrichum* exalava um odor característico de maçã até 22 dias de cultivo e posteriormente observam-se grânulos nas colônias devido à formação de clamidósporos. Quanto à formação dos conidióforos, os autores observaram que uma hifa, quando imersa no meio de cultivo, produzia uma haste ereta não ramificada a qual posteriormente era formado um septo. Abaixo do septo inicia-se a formação dos novos ramos, os quais formam uma nova septação após o seu desenvolvimento (Figura 2 - C). A partir do septo apical dos ramos primários

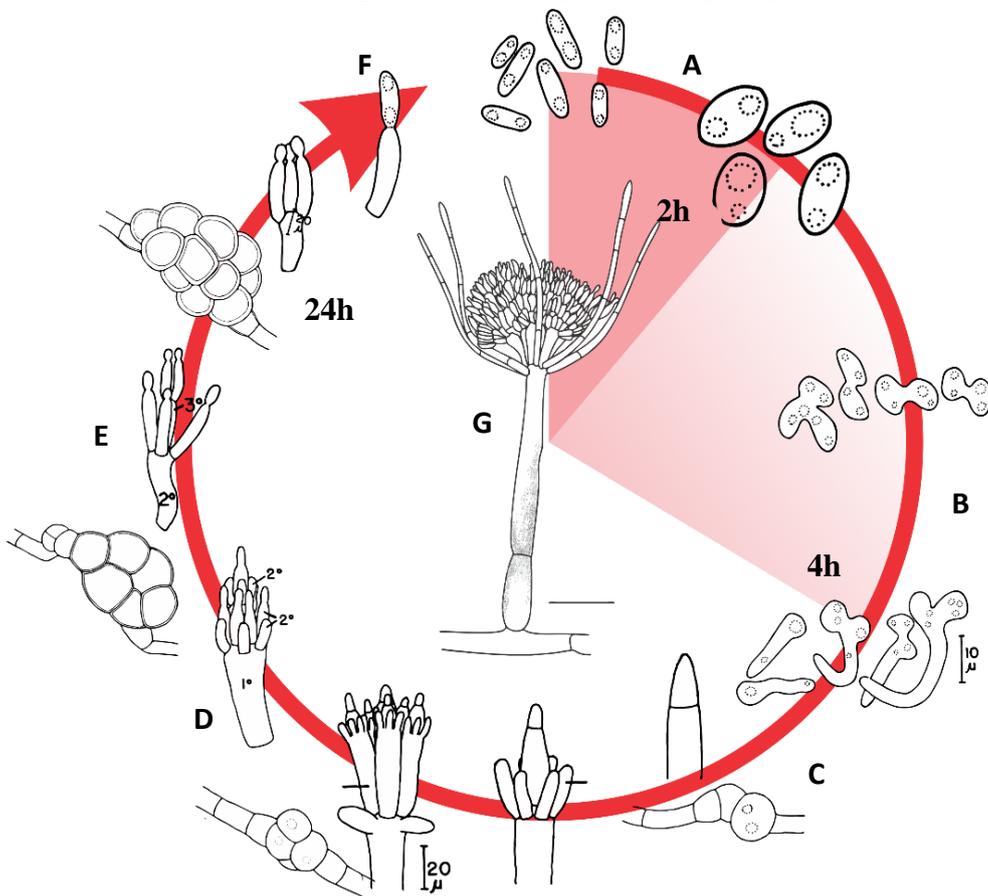


Figura 2. Ciclo de formação de conidióforos e clamidósporos. Em meio de cultura os conídios se enlanguescem após 2 horas (A), germinando e sofrem anastomose (B), crescimento e septação de estipe dando início a formação dos primeiros ramos em torno do septo primário, com concomitante início de formação de clamidósporos (C), formação de ramos secundários (D), formação de fiálide (E), formação de conídios nas fiálide (F) e conidióforo maduro após 24 horas (G). (Adaptado de ELLIS e HESSELTINE, 1962)

inicia-se a formação dos ramos secundários, os quais podem originar fiálides ou ramos terciários (Figura 2 – D, E). Logo após a formação dos ramos secundários, ocorre um intenso prolongamento das extensões da estipe. Essas extensões são formadas abaixo das ramificações primárias (Figura 2 - G).

Os clamidósporos são facilmente formados no micélio, a partir de uma única célula (solitários) ou por um conjunto de células (agregados bulbiloides) composto de gutulações. Os clamidósporos podem germinar em 24 horas enquanto os conídios germinam facilmente em aproximadamente duas horas (Figura 2 - A). Após quatro horas inicia-se a anastomose de conídios (Figura 2 - B) e em 24 horas observam-se os conidióforos e a formação dos clamidósporos (ELLIS e HESSELTINE, 1962).

Apesar da fase assexuada ser conhecida desde 1962, somente em 1993 foi proposto o gênero *Leuconectria* (espécie tipo *L. clusiae*) para representar a forma sexuada de espécies do gênero *Gliocephalotrichum*. A proposição realizada por Rossman e Samuels (1993) foi baseada na morfologia das estruturas assexuadas produzidas após o plaqueamento dos ascósporos de *L. clusiae*, assim como o padrão de crescimento e esporulação. Apesar da conexão fase sexual/assexual, o gênero *Leuconectria* foi suprimido e o nome *Gliocephalotrichum* foi selecionado para representar a fase sexual e assexual, devido o maior número de espécies conhecidas e ser a fase mais frequente na natureza (ROSSMAN *et al.* 2013).

1.2. Diversidade de espécies e distribuição geográfica

Apesar dos estudos com o gênero *Gliocephalotrichum* terem mais de 50 anos, o conhecimento sobre esse gênero ainda é limitado, onde apenas duas das 13 espécies possuem a fase sexual conhecida (KIRK *et al.*, 2008). A espécie mais conhecida é *G. bulbilium*, com ocorrência em oito países, principalmente na América, África, Indonésia e Tailândia (ELLIS e HESSELTINE, 1962). *Gliocephalotrichum simplex* é uma espécie já foi

descrita em sete países. Essa espécie foi descrita em 1971 a partir da reavaliação taxonômica de *Cylindrocladium simplex* var. *microclamydosporum* (WILEY e SIMMONS, 1971). No mesmo trabalho foram descritas, *G. cylindrosporum* e *G. michochlamydosporum*. Os autores concluíram que *Calonectria* (= *Cylindrocladium*) possui alongamento mononematoso com uma ramificação de crescimento contínua em uma seta longa e estéril com extremidade dilatada (Figura 3 – B) enquanto *Gliocephalotrichum* possui estipe terminal penicilada composta de métulas e fiálides (Figura 3 – A).

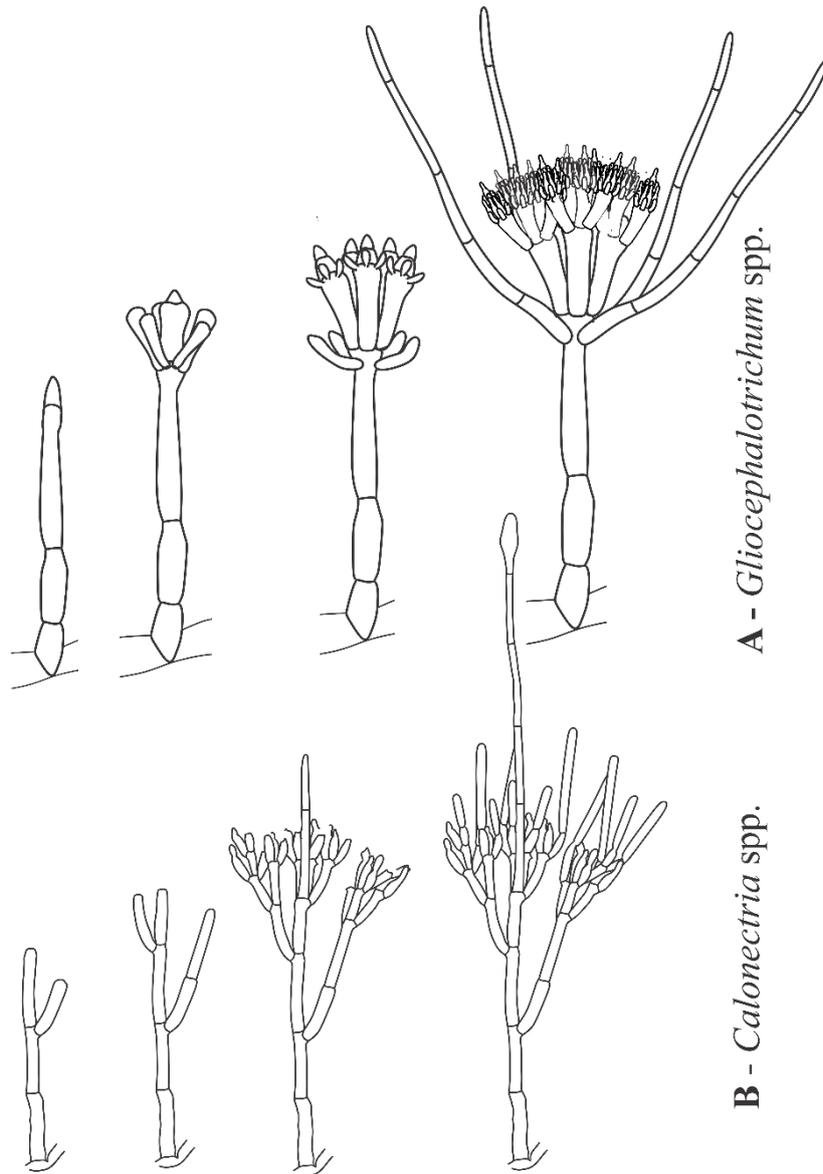


Figura 3. Formação de conidióforos de *Gliocephalotrichum* spp. e *Calonectria* spp. mostrando formação de ramificações poliverticilada e formação de ramificações da estipe abaixo do primeiro septo da estipe (A). e ramificações dicotômicas e alongação da extensão da estipe (B).

Em 1973 a partir de exploração da microfauna dos solos de Ohio nos Estados Unidos, Huang e Schmitt (1973) descreveram a espécie *G. ohiense*. Até o momento esse é o único espécime encontrado no mundo. Trinta e três anos depois dos estudos de Huang e Schmitt (1973) iniciaram os estudos de morfologia integrada com dados moleculares para a identificação das espécies. Nos estudos de Decock et al. (2006) analisando amostras provenientes da Guiana Francesa, unindo análises da região ITS (Internal Transcription Spacer), identificaram duas novas espécies (*G. longibrachium* e *G. bacillisporum*) e confirmaram que o gênero formava um grupo monofilético dentro dos Hypocreales.

Recentemente seis espécies novas foram propostas após identificar isolados depositados em coleções micológicas, obtidos a partir de amostras de solo da Tailândia e frutos de rambutan provenientes do Guatemala, México e Porto Rico (LOMBARD *et al.*, 2014). Isso foi possível devido ao aumento das regiões gênicas utilizadas para a identificação das espécies e padronização dos meios de cultivo para a descrição dos parâmetros morfológicos. Nesse mesmo trabalho foram incluídos espécimes provenientes do Brasil pela primeira vez, os quais foram obtidos a partir de amostras de solo coletadas nos estados da Bahia e Pará nos anos de 1969, 1991, 1995 e 2011.

Embora poucas espécies descritas e poucos trabalhos, o gênero *Gliocephalotrichum* encontra-se amplamente distribuído, com ocorrência em quase todos os continentes, em uma totalidade de 17 países, com o continente Americano tendo o maior número de relato de espécies. Somente *G. bacillisporum*, *G. bulbilium* e *G. simplex* são relatadas no Brasil (Figura 4).

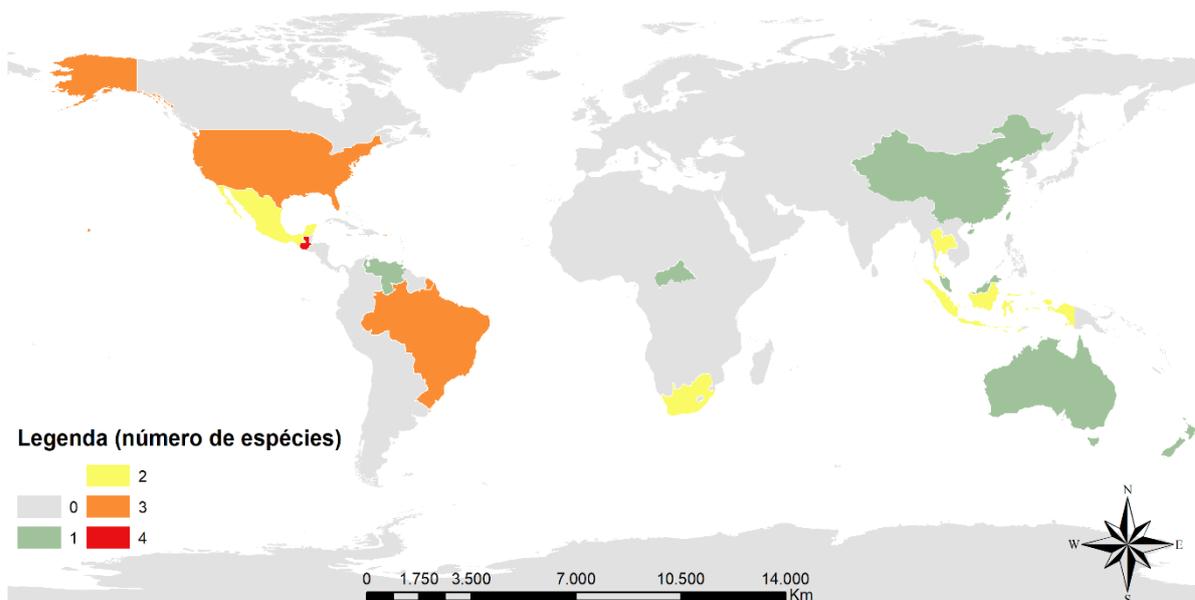


Figura 4. Distribuição geográfica das espécies de *Glioscephalotrichum*, relatadas em quatro continentes: América, África, Ásia e Oceania.

1.3. Substratos e hospedeiros

A primeira espécie de *Glioscephalotrichum* foi descrita a partir de amostras de solo, desde então, estas são classificadas como saprófitas por serem comumente encontradas em amostras de solos, plantas em decomposição, serrapilheira e frutas em apodrecimento (LOMBARD *et al.*, 2014). No entanto a partir de 2002 este gênero tem sido relacionado como agentes causais de podridões em diversos frutos no mundo (Tabela 1).

Nos últimos anos, uma boa quantidade de trabalhos tem relacionando estes fungos como causadores de podridões em frutos. Nishijima, et al. (2002) relatam que a partir de sintomas de podridão e morte de ponteiros em *Nephelium lappaceum* L., foi possível isolar as espécies de *G. simplex* e *G. bulbilium* (tambem isolada a partir de tecido vascular da planta). A patogenicidade de isolados destas espécies foi posteriormente comprovada através da complementação dos postulados de Koch.

Na Malásia *G. bacillisporum* foi relatado, causando podridão de frutos em *N. lappaceum* (INTAN SAKINA e LATIFFAH, 2013). Em Porto Rico tambem foram relatadas

as espécies *G. simplex* e *G. bulbilium* causando podridão em frutos na espécie *N. lappaceum* (SERRATO-DIAZ, *et al.*, 2012). Também foram relatadas como hospedeiras de *G. bacillisporum* as espécies de *Psidium gajava* no Havaí, *Durio graveolens*, *D. kutejensis* em Brunei Darussalam, *Terminalia chebula* na Índia, *Garcinia mangostana* na Tailândia e *Vaccinium macrocarpon* nos Estados Unidos (CONSTANTELOS, *et al.*, 2011; SIVAPALAN, *et al.*, 1998; SINGH, *et al.*, 2012; SANGCHOTE e PONGPISUTTA, 1997).

Tabela 1. Relação de substratos/hospedeiros e localidades por espécie de *Gliocephalotrichum* relatadas no mundo.

Espécies	Substrato/ hospedeiro	Local	Referência
<i>G. bacillisporum</i>	Raiz de planta	Brasil	Lombard <i>et al.</i> , 2014
	Folha em liteira	Guiana Francesa	Lombard <i>et al.</i> , 2014
	<i>N. lappaceum</i>	Malásia	Sakinah e Latiffah, 2013
<i>G. bulbilium</i>	Ar	República Central Africana	Lombard <i>et al.</i> , 2014
	<i>Flacourtia</i> sp.	Indonésia	Lombard <i>et al.</i> , 2014
	<i>Clusia</i> sp.	Porto Rico	Lombard <i>et al.</i> , 2014
	Solo	Brazil, Tailândia	Lombard <i>et al.</i> , 2014
	<i>Nyssa sylvatica</i>	USA	Lombard <i>et al.</i> , 2014
	Folha em liteira	Guiana Francesa	Lombard <i>et al.</i> , 2014
	<i>Nephelium lappaceum</i>	Porto Rico, México, Havaí	Serrato-Diaz <i>et al.</i> , 2012; Lombard <i>et al.</i> , 2014
<i>G. cylindrosporum</i>	Solo	Tailândia	Lombard <i>et al.</i> , 2014
<i>G. grande</i>	Folha em liteira	China	Lombard <i>et al.</i> , 2014
<i>G. humicola</i>	Solo	Taiwan	Lombard <i>et al.</i> , 2014
<i>G. longibrachium</i>	Folha em liteira	Guiana Francesa	Lombard <i>et al.</i> , 2014
<i>G. mexicanum</i>	<i>N. lappaceum</i>	México	Lombard <i>et al.</i> , 2014
<i>G. microchlamydosporum</i>	Solo	Zaire	Lombard <i>et al.</i> , 2014
	–	Zaire	Lombard <i>et al.</i> , 2014
	–	África do Sul	Lombard <i>et al.</i> , 2014
<i>G. nephelii</i>	<i>N. lappaceum</i>	Guatemala	Lombard <i>et al.</i> , 2014
<i>G. ohiense</i>	Solo	USA	Lombard <i>et al.</i> , 2014
	<i>Eleaeocarpus angustifolius</i>	Austrália	Lombard <i>et al.</i> , 2014
<i>G. queenslandicum</i>	<i>N. lappaceum</i>	Guatemala	Lombard <i>et al.</i> , 2014
<i>G. simmonsii</i>		África do Sul e	
	Solo	Brasil	Lombard <i>et al.</i> , 2014
	<i>Musa</i> sp.	Nova Zelândia	Lombard <i>et al.</i> , 2014
<i>G. simplex</i>		Hawaii,	
		Guatemala,	
	<i>N. lappaceum</i>	Malásia e Porto Rico	Nishijima <i>et al.</i> , 2002; Serrato-Diaz <i>et al.</i> , 2012
	Raiz de planta	Brasil	Lombard <i>et al.</i> , 2014

Lombard et al. (2014), analisando isolados de *Gliocephalotrichum* spp. em *N. lappaceum*, descreveram cinco novas espécies dentro do gênero. Destes novos relatos três deles foram encontrados em frutos sintomáticos no México e na Guatemala em frutos sintomáticos importados dos Estados Unidos, indicando que estes fungos podem ser levados em um país para outro a partir do comércio de material vegetal contaminado.

1.4. Dificuldades de identificação de *Gliocephalotrichum*

Segundo Crous (2002) vários outros gêneros pertencentes à família *Nectriaceae* (os quais frequentemente compartilham nichos ecológicos similares) são, muitas vezes, confundidos com a fase anamórfica de *Calonectria* spp. (= *Cylindrocladium* spp.). Um exemplo citado por Crous (2002) se refere aos gêneros como *Cylindrocladiella*, *Gliocladiopsis*, *Xenocylindrocladium* e *Curvocladium*. Lombard et al. (2014) indicaram que estes quatro gêneros são relativamente fáceis de serem confundidos devido a similaridades em seus aspectos morfológicos (Figura 5).

Cylindrocladiella corresponde a um gênero comumente confundido com *Calonectria* spp., isto devido à similaridade de sintomas causados entre estes dois fitopatógenos, bem como, devido ao fato da formação da ramificação da estipe de ambos ocorrer dentro do aparato conidiogênico. No entanto, uma importante característica para distinção dos gêneros são: tamanho de conídios, tipo de vesícula e a septação da ramificação da estipe, ausente em *Cylindrocladiella* spp. e presente em *Calonectria* spp. e conidióforos geralmente são muito pequenos (PHAM, et al., 2018).

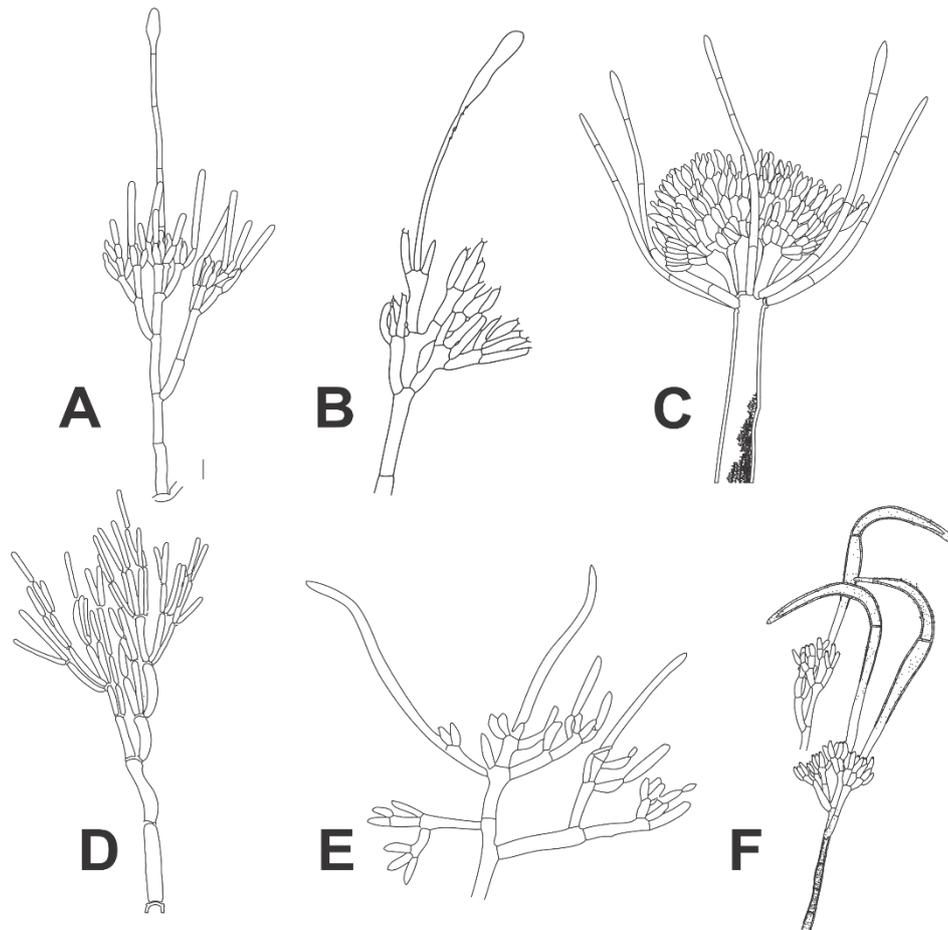


Figura 5. Conidióforos de *Calonectria*-like, *Calonectria* (A), *Cylindrocladiella* (B), *Glioccephalotrichum* (C), *Gliocladiopsis* (D), *Xenocylindrocladium* (E) e *Curviciadiella* (F) (Fonte: CROUS, 2002; DECOCK *et al.* 1998; SARKENA, 1954).

Outros gêneros como *Gliocladiopsis* se caracterizam por não possuir a ramificação da estipe; e *Curviciadiella* spp. que apresenta estipe curvada e com parede verruculosa e *Xenocylindrocladium* que apresenta ramificação das estipe avesiculadas e septada (CROUS, 2002). Apesar de atualmente se conhecer algumas características morfológicas que possam ajudar a diferenciação entre gêneros de fungos, o aperfeiçoamento e diminuição de custos de técnicas de biologia molecular, faz com que a informação genética/genômica obtida se converta em ferramentas possíveis de resolver potenciais divergências inter e intra gêneros.

O gênero *Glioccephalotrichum* também pode ser incluído na lista dos chamados “*Calonectria*-like” ou similares a *Calonectria* spp. Essa nomenclatura foi adotada por este

gênero e os anteriormente citados compartilham similaridades morfológicas do anamorfo de *Calonectria*. (CROUS, 2002). Exemplificando estes aspectos, até 1971 dentro do gênero *Cylindrocladium* existia as espécies *C. simplex* e var. *microchlamydosporum*, estas espécies foram revisadas por Wiley e Simmons (1971). Estes autores constataram que estas pertenciam ao gênero *Gliocephalotrichum* descrito pela primeira vez nove anos antes. Wiley e Simmons (1971) descrevem que estas duas espécies, na verdade, representavam três diferentes espécies, renomeadas por ele como *G. simplex*, *G. microchlamydosporum* e *G. cylindrosporum*

Tal confusão é ocasionada pela grande similaridade entre ambos os gêneros quando o conidióforo está maduro. Nesses gêneros os conidióforos são eretos, terminando em um penicilado composto de métulas (ramos) e fiálides (WILEY e SIMMONS, 1971). Havendo como diferença, em que, *Cylindrocladium* spp. tem uma alongada estipe mononematosa com ramificações dicotômicas, um ramo caracteristicamente continuando seu crescimento em uma longa seta estéril com ápice dilatado, com ramos terminando em fiálides doliforme.

Gliocephalotrichum spp. apresenta uma série de ramificações em torno do septo, havendo presença de ramificações primárias, secundárias e as vezes terciária, todos estes terminando em fiálides (WILEY e SIMMONS, 1971). De acordo com Rossman et al. (1993) as espécies de *Gliocephalotrichum* podem ser diferenciadas de *Cylindrocladium* spp. também pelo ponto de inserção da ramificação da estipe, a qual, se desenvolve diretamente abaixo das ramificações, enquanto a ramificação da estipe de *Calonectria* se origina dentro do aparato conidiogênico.

Para solucionar tais problemas de confusões no momento da identificação, uma abordagem polifásica tem sido adotada para aumentar a precisão no setor. Tal abordagem apresenta a união de duas ou mais técnicas de identificação unidas, uma dando suporte a

outra. Dentro disto as técnicas moleculares juntamente com as comparações morfológicas se constituem em fortes ferramentas para a taxonomia moderna.

Os sistemas de marcadores moleculares envolvem a extração do DNA genômico do organismo por meio de vários protocolos, e o uso de um conjunto variado de técnicas tais como RFLPs (*Restriction fragment length polymorphisms*) e outras baseadas em PCR (*Polymerase chain reaction*; MILLUS *et al.* 1989), tais como RAPDs (*Random amplified polymorphic*).

Um estudo ilustrando o emprego das técnicas moleculares na resolução de problemas quanto a identificação correta do fitopatógeno. Com a grande contestação sobre a validade do gênero *Cylindrocladiella* por Peeraly (1991) autores através de avaliações morfológicas e técnicas de RAPDs e AT-DNA mostrou que o gênero formava um grupo monofilético validando-o como um gênero. Posteriormente dados de inferência filogenética usando as regiões ITS e β -tubulina também serviram para suportar e realocar espécies dentro do gênero (LOMBARD *et al.*, 2014).

Para *Gliocephalotrichum* spp. técnicas moleculares só começaram a serem utilizadas a partir de 2006 com a utilização da região do ITS (*Internal Transcription Spacer*) e Beta-tubulina (DECOCK *et al.*, 2006). A partir destes estudos em 2014 um trabalho usando análises filogenéticas multilocus, com ITS, Beta-tubulina, Fator de alongação e Histonas (LOMBARD *et al.*, 2014). Nestas análises, os autores discutem que apesar da boa resolução gerada, esta não refletia os agrupamentos informais propostos por Wiley e Simmons (1971). Apesar de estes dois estudos serem referência para o gênero no mundo, os trabalhos com análises moleculares ainda são escassos não permitindo estimar a real diversidade genética destes organismos.

Quando comparamos nos bancos de dados públicos de sequencias nucleotídicas o nível de amostragem molecular deste gênero com seus vizinhos mais próximos

filogeneticamente, nos bancos de dados públicos de sequências nucleotídicas, verificamos que para cada uma sequência de *Gliocephalotrichum* spp. (553 sequências no GenBank) existem 1,94 sequências de *Cylindrocladiella* spp. (1.072 sequências no GenBank) 8 de *Calonectria* spp. (4.451 sequências no GenBank). Isso podem ser explicado, em parte, pelo número de espécies conhecidas, nível de amostragem e sobretudo pelo fato das espécies *Calonectria*. serem conhecido como importante patógenos de diversas culturas agrícolas e florestais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção de isolados e culturas monohifais

Frutos com sintomas de podridão foram coletados, acondicionados em sacos de papel e encaminhados para a Coleção Micológica do Departamento de Fitopatologia da UnB para o isolamento direto das amostras ao encontrar os sinais do patógeno. Isolamentos indiretos também foram efetuados a partir de frutos sintomáticos (ALFENAS *et al.*, 2016).

Discos de micélio de 5 mm de diâmetro retirados de culturas puras foram depositados em placas de Petri contendo ágar água (AA; 1,5% de ágar). Após 24 horas, um segmento de hifa individual foi seccionado do meio de cultivo com o auxílio de uma agulha previamente esterilizada, e transferido para uma nova placa de Petri contendo Extrato de Malte-Ágar (MEA) para a obtenção de culturas monohifais. As amostras foram incubadas a $25\pm 1^\circ\text{C}$ e, posteriormente armazenadas em água esterilizada, glicerol 10% e óleo mineral a $18\pm 1^\circ\text{C}$.

2.2. Extração e quantificação de DNA

A extração de DNA genômico foi realizada utilizando o Kit de purificação de DNA genômico da Promega (Wizard Genomic DNA Purification Kit) seguindo as adaptações descritas abaixo:

Aproximadamente 40 mg de micélio com sete dias de crescimento em MEA coberto com celofane foram transferidos para microtubos de 1,5 mL contendo quatro esferas de aço (3 mm de diâmetro), 600 μL da solução de lise (Nuclei Lysis Solution) e 100 mg de polivinilpirrolidona (PVP). As amostras foram maceradas por 90 segundos a 1.777g no equipamento L-Beader 6 (Loccus biotecnologia, Cotia, Brasil) e posteriormente incubadas em banho seco a 65°C por 15 minutos. Em seguida, 3 μL de RNase A (20 mg/mL) foram adicionados e misturados sob um vortex para incubação a 37°C por 15 minutos.

Posteriormente, 200 μL da solução para precipitação de proteínas (Precipitation Protein Solution) foram adicionados as amostras, e os tubos foram invertidos cuidadosamente e centrifugados a 18.407 g/ 5 minutos. Após a centrifugação, a fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para microtubos tipo eppendorff de 1,5 mL, aos quais foram adicionados 600 μL de isopropanol 100% resfriado e agitados cuidadosamente invertendo os tubos manualmente por 2 min. Foi realizada nova centrifugação a 18.407 g/ 5 minutos. Após a centrifugação, foi descartado o sobrenadante tomando cuidado para não descartar também o precipitado (pellet) formado no fundo do microtubo, o pellet foi lavado com 600 μL de etanol 70% resfriado, mediante centrifugação a 18.407 g/ 5 minutos. A secagem dos pellets foi realizada deixando-os invertidos sob papel a temperatura ambiente por no mínimo 30 minutos. Após a secagem o pellet de DNA foi ressuscitado em 50 μL de T.E. (p.H. 8,0) incubados em banho seco por 1 hora a 65 °C, ou deixados em Freezer a -20°C (??) por 12 horas. Verificou a qualidade do DNA extraído em gel de agarose 1%.

2.3. Reação em cadeia da polimerase - PCR

As reações de PCR foram realizadas usando MyTaq PCR Master Mix com um volume final de 12,5 μL , contendo 6,25 μL de MyTaq PCR Master Mix (2 \times), 0,3 μL de cada iniciador (10 pmol/ μL) (senso e anti-senso), 1 μL de DNA genômico e 4,65 μL de água livre de nuclease. Para a identificação prévia, o DNA de todos os isolados foi amplificado e sequenciado com os iniciadores da região fator de alongação (Tabela 1). Isolados representativos de cada espécie e localidade foram selecionados para amplificação e sequenciamento do rDNA e das regiões, histonas 3, ITS, LSU e β -tubulina (Tabela 1). As amplificações foram realizadas em um termociclador utilizando os seguintes parâmetros: um passo de 5 minutos a 96°C, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 96°C, anelamento de acordo com a Tabela 2, extensão a 72°C por 45 segundos e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 1% para verificar a

pureza e o tamanho dos fragmentos. Os amplicons com uma banda individual e intensa foram purificados e sequenciados pela Macrogen Inc., Coréia do Sul (<http://www.macrogen.com>).

Tabela 2. Iniciadores (primers) selecionados para a identificação das espécies de *Gliocephalotrichum* para os estudos filogenéticos.

Região gênica	Iniciador	Sequência	Sentido	Referência	Temperatura e tempo de anelamento
Fator de alongação (<i>tef1a</i>)	EF-1F	5'-TGC GGT GGT ATC GAC AAG CGT-3'	Senso	Jacobs et al. 2004	56 °C
	EF-2R	5'-AGC ATG TTG TCG CCG TTG AAG-3'	Anti-senso	Jacobs et al. 2004	
Histona 3 (<i>his3</i>)	CYLH3F	5'-AGTCCACTGGTGGCAAG-3'	Senso	Crous <i>et al.</i> ,2004	52 °C
	CYLH3R	5'-AGCTGGATGTCCTTGGACTG-3'	Anti-senso	Crous <i>et al.</i> ,2004	
β - tubulina (<i>tub2</i>)	T1	5'-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3'	Senso	O'Donnell e Cigelnik, 1997	56 °C
	Bt2b	5'-ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC-3'	Anti-senso	Glass e Donaldson, 1995	
5.8 S e 28S rDNA	LR5	5'-TCC TGA GGG AAA CTT CG-3'	Senso	Vilgalys e Hester, 1990	53 °C
	V9G	5'-TTA CGT CCC TGC CCT TTG TA-3'	Anti-senso	Hoog e Ende, 1998	

2.4 Análises Filogenéticas

As sequências de nucleotídeos foram analisadas a qualidade e editadas com o software MEGA v. 7 (KUMAR *et al.*, 2016). Todas as sequências foram analisadas e o arranjo dos nucleotídeos em posições ambíguas foram corrigidos por comparação das sequências senso e anti-senso. Os isolados foram previamente identificados pela análise das sequências de fator de alongação em comparação pelo algoritmo BLASTn com outros isolados de *Gliocephalotrichum* spp. depositados no banco de dados do GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) com posterior submissão da matriz ao web portal CIPRES (MILLER *et al.*, 2010).

Após a identificação inicial, dois isolados representativo de cada espécie e localidade foram selecionados para realizar a análise filogenética concatenada com as regiões β -tubulina, ITS, LSU, histonas 3 e fator de alongação. As sequências adicionais foram selecionadas a partir de Lombard et al. (2014), e obtidas do GenBank (Tabela 2). As

sequências foram alinhadas utilizando o software MAFFT v. 7. 245 (KATHO *et al.*, 2015). Foi escolhido *Calonectria candelabra* CPC1675 como grupo externo (outgroup).

A análise de Inferência Bayesiana (IB) empregando o método Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC) foi realizada empregando MrMODELTEST 2.3 (NYLANDER, 2004) visando para selecionar o modelo de substituição de nucleotídeos para análise de IB para cada região gênica. Os valores de verossimilhança foram calculados e o modelo foi selecionado de acordo com o Akaike Information Criterion (AIC). A análise de IB foi concluída com MrBayes v. 3.1.2 (RANNALA e YANG, 1996; RONQUIST e HUELSENBECK, 2001). Cada cadeia MCMC foi conduzida simultaneamente, iniciando as árvores aleatoriamente até 10.000.000 de gerações. As árvores foram amostradas a cada 1.000 gerações, resultando em 10.000 árvores. As primeiras 2.500 árvores foram descartadas da análise. Os valores de probabilidade posterior (RANNALA e YANG, 1996) foram determinados da árvore consenso através das 7.500 árvores remanescentes. A árvore foi visualizada no software FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) e exportada para programas gráficos.

2.4. Caracterização morfológica de isolados de *Gliocephalotrichum* spp.

Espécimes representativos de cada espécie filogenética foram selecionados para a caracterização morfológica. Primeiramente, isolados monohifais foram cultivados em meio nutriente-sintético-ágar (SNA) contendo folhas de cravo (NIRENBURG 1981, LOMBARD *et al.*, 2010). As placas foram mantidas a 25 °C até a observação das estruturas reprodutivas. As características morfológicas foram determinadas pela montagem de estruturas em lâminas contendo ácido láctico. Foram realizadas 30 medições de cada marcador morfológico recomendado por Lombard *et al.* (2014) no aumento de 1000x para cada isolado (Figura 06). O teleormorfo, quando presente, foi caracterizado a partir dos peritécios, ascos e ascósporos formados.

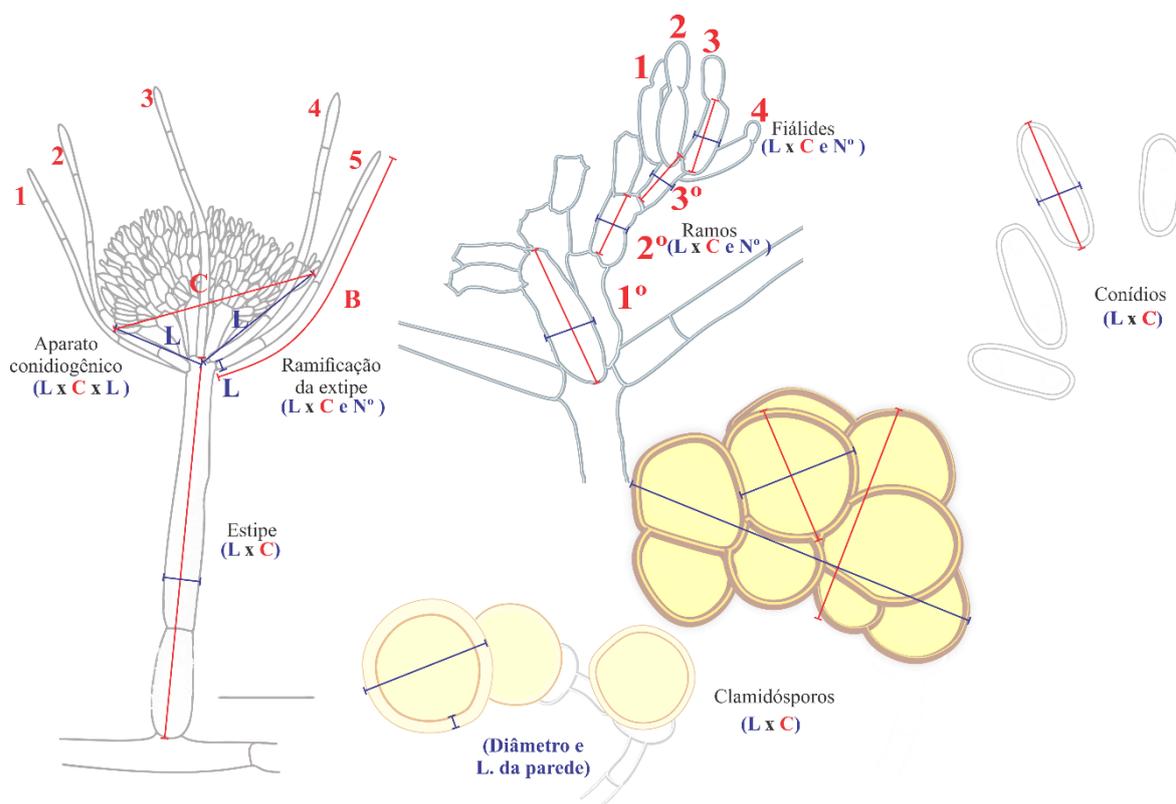


Figura 6. Marcadores morfológicos utilizados para a caracterização morfológica de cada isolado. Linhas em vermelho correspondem ao comprimento (C), linhas em azul correspondem a largura (L).

2.5. Teste de patogenicidade.

A patogenicidade das espécies encontradas foi avaliada utilizando frutos das espécies às quais os fitopatógenos foram inicialmente isolados. A partir das análises filogenéticas foram selecionados, de cada espécie fúngica, que possuíssem localidade e hospedeiro diferentes.

A obtenção do inóculo se deu pelo cultivo dos isolados em placas de Petri contendo meio de cultura MEA (Extrato de Malte-Ágar) e 20-50 palitos de dentes, previamente esterilizados e com a ponta cortada em bisel. As culturas foram incubadas por 7-10 dias à temperatura ambiente. Após o crescimento do fungo sobre os palitos, estes foram retirados com o auxílio de uma pinça esterilizada e colocados sobre os frutos perfurando sua superfície. Foram utilizados cinco frutos para cada isolado selecionado. Como testemunha

o mesmo número de frutos foi utilizado perfurando-os com palitos esterilizados sem a presença de fungo.

Os frutos foram mantidos em bandejas forradas com papel mata-borrão umedecidos com água destilada e autoclavada, em volume de 2,5 vezes o peso do papel, para manter uma alta umidade (90%), estes foram mantidos em temperatura ambiente por 7-14 dias e ao final do teste foi avaliada a presença ou ausência de sintomas. Quando presentes os sintomas, foi realizado o reisolamento do fungo para a confirmação de que constitui o mesmo organismo inoculado no início.

3. RESULTADOS

A partir da coleta de material sintomático foram obtidos 57 isolados distribuídos Distrito Federal (26), Minas Gerais (13), Goiás (11), Tocantins (5) e Piauí (2), em cinco famílias e nove espécies botânicas (Figura 7, Tabela 3). Todos os isolados foram depositados na Coleção de Culturas da Universidade de Brasília.

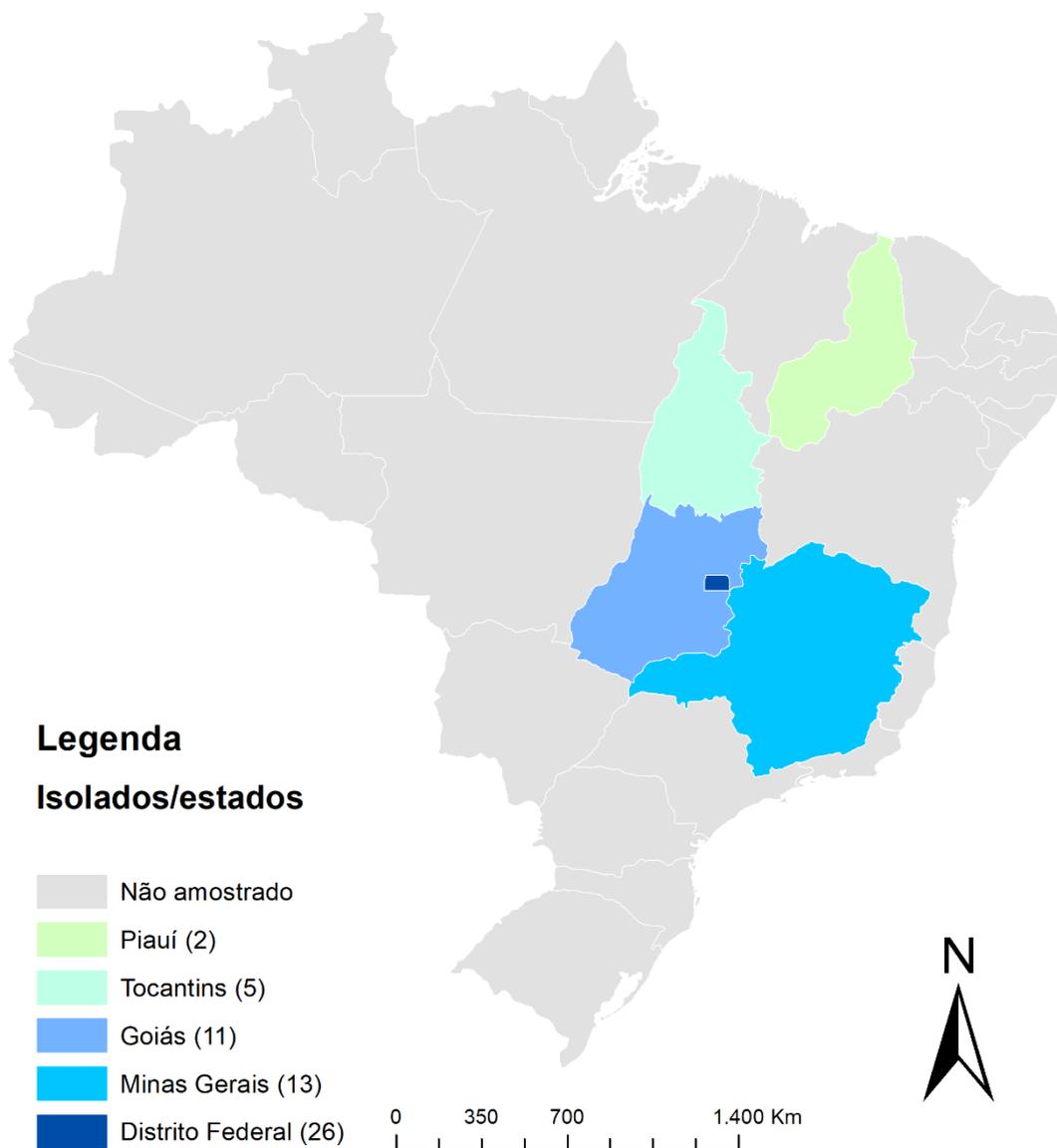


Figura 7. Distribuição (por Estado) dos isolados de *Glioscephalotrichum*.

3.1. Caracterização molecular

A partir da amplificação da região Fator de alongação (*Tef1a*) dos isolados foram obtidos amplicons de 710 pares de base (pb) compreendendo 54 taxa, em que destes, foram observados 553 sítios conservados e 140 sítios informativos a parcimônia. A matriz alinhada dos 54 taxa foi submetida a Inferência Bayesiana (IB), com GTR+G, sendo o modelo de substituição de nucleotídeos selecionado como o melhor para o conjunto de dados.

Com base na árvore filogenética foi possível identificar cinco clados distintos (Figura 6). O clado I tendo em sua maior predominância isolados obtidos a partir de frutos de pequi (*Caryocar brasiliensis*) dos cinco Estados. O Clado II com somente isolados de pequi de amostras provenientes do Estado de Minas Gerais e do Distrito Federal. O Clado III foi composto por dois isolados provenientes de frutos de palmeira locuba (*Dypsis madagascariensis*), coletados no Distrito Federal. O Clado IV foi formado por isolados advindos de frutos de palmeira locuba, pequi, seriguela (*Spondias purpurea*), cajazinho (*Spondias mombin*) e jerivá (*Syagrus romanzoffiana*). O Clado V com predominância de isolados provenientes de frutos de jambo amarelo (*Syzygium jambos*) coletados no Distrito Federal (Figura 8).

A partir da árvore de fator de alongação foram selecionados para uma abordagem multigênica 19 isolados de diferentes hospedeiros e regiões. Estes isolados foram comparados com espécimes de *Gliocephalotrichum* spp. disponíveis no GenBank (Tabela 1). A análise filogenética incluiu 68 taxa “ingroup” e *Calonectria candelabra* CPC1675 correspondendo como o “outgroup”. A matriz dos genes combinados consiste em 2098 caracteres totais, divididos entre as regiões fator de alongação (640pb), beta-tubulina (349pb), subunidade maior do ribossomo (570pb), histona-3 (536pb) e incluindo gaps. Do

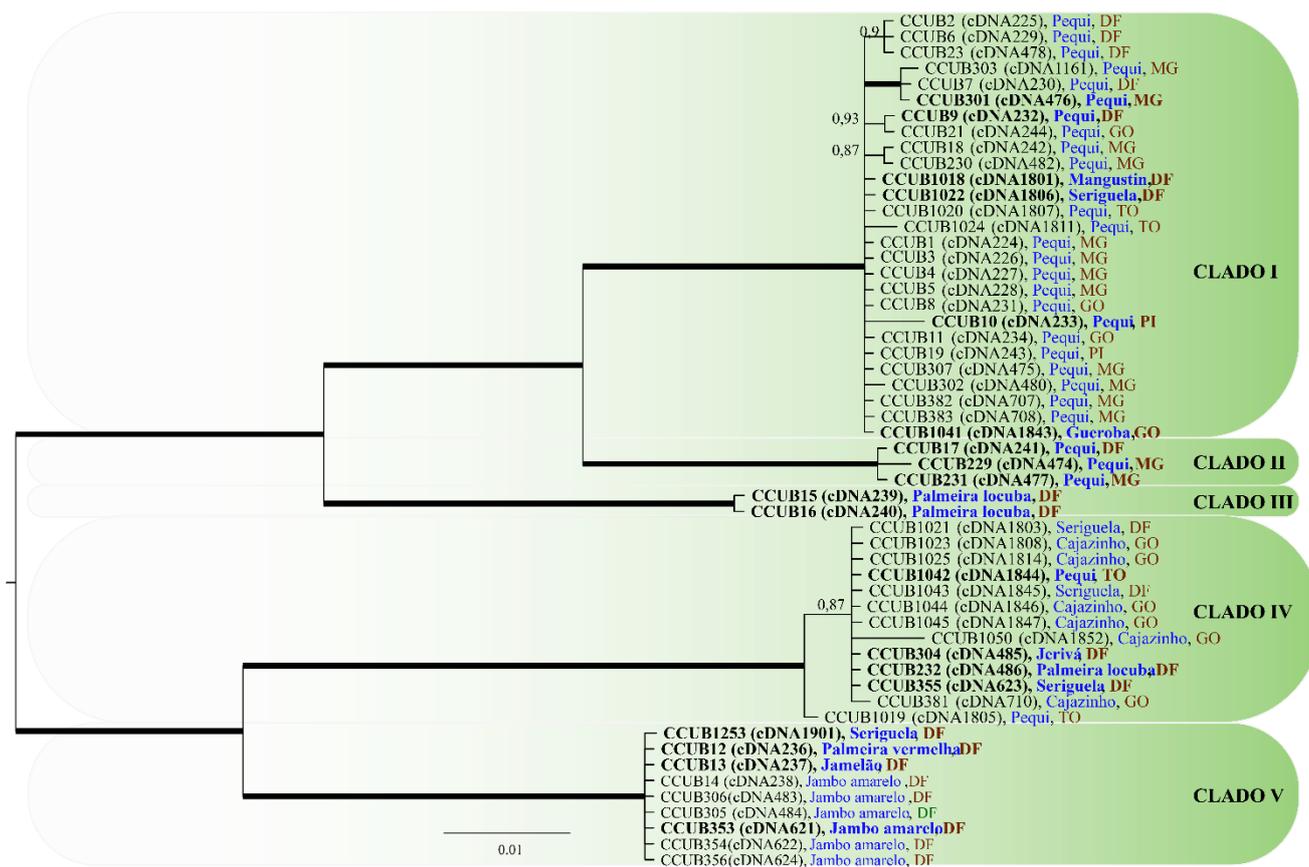


Figura 8. Árvore filogenética obtida por Inferência Bayesiana com sequências de Fator de alongação com 54 isolados de *Glioscephalotrichum* spp. com a indicação de hospedeiro e local de coleta respectivo. Isolados em destaque foram os selecionados para a análise multigênica. A probabilidade posterior é indicada acima dos nós e com as linhas mais grossas indicando probabilidade maior ou igual a 0,99 por análise de IB.

total de caracteres da matriz concatenada, 1411 sítios são conservados, 671 sítios variáveis e destes 547 informativos a parcimônia. Os modelos de substituição nucleotídica selecionados foram: GTR+G para *tefla* e *His3*, HKY+I+G para *tub* e SYM+I para LSU.

Na árvore filogenética multigênica de *Glioscephalotrichum* spp. é possível identificar que os isolados dos clados III e V deste estudo agruparam com as espécies *G. simplex* e *G. bulbilium*, o clado II teve um isolado agrupando junto *G. longibrachium* e os outros formando um grupo independente deste, indicando uma nova espécie, assim como os isolados dos clados I e IV (Figura 9).

Tabela 3. Isolados de *Gliocephalotrichum* usados nas análises filogenéticas.

Espécies	Isolados ^{1*}	GenBank ²				Substrato/hospedeiro	Local	Coletor	Referência
		BTUB	HIS3	ITS	TEF-1a				
<i>Gliocephalotrichum</i> sp. nov. 1	CCUB10	-	-	-	-	<i>Caryoca brasiliensis</i>	Piauí, Brasil	A.Reis	Este estudo
	CCUB1018	-	-	-	-	<i>Garcinia mangostana</i>	Distrito Federal, Brasil	A.Reis	Este estudo
	CCUB1022	-	-	-	-	<i>Spondias purpurea</i>	Distrito Federal, Brasil	A.Reis	Este estudo
	CCUB1041	-	-	-	-	<i>S. purpurea</i>	Goiás, Brasil	A.Reis	Este estudo
	CCUB301	-	-	-	-	<i>C. brasiliensis</i>	Minas Gerais, Brasil	A.Reis	Este estudo
	CCUB9	-	-	-	-	<i>C. brasiliensis</i>	Distrito Federal, Brasil	A.Reis	Este estudo
	CCUB1042	-	-	-	-	<i>C. brasiliensis</i>	Tocantins, Brasil	A.Reis	Este estudo
<i>G. bacillisporum</i>	CBS 250.91	KF513182	KF513323	KF513251	KF513405	Raiz de planta	Brazil	L. Pfenning	Lombard et al., 2014
	CBS 126572	DQ374413	KF513324	DQ374408	KF513406	Folhas em liteira	Guiana Francesa	C. Decock V. Robert	Lombard et al., 2014
	CBS 132042	DQ374414	KF513325	DQ374409	KF513407	Folhas em liteira	Guiana Francesa	C. Decock V. Robert	Lombard et al., 2014
<i>G. bulbilium</i>	CBS 118.68	KF513183	KF513327	KF513252	KF513409	Ar	Republica Africana Central	J. Nicot	Lombard et al., 2014
	CBS 562.75	KF513184	KF513328	KF513253	KF513410	<i>Flacourtia</i> sp.	Indonésia	I. Gandjar	Lombard et al., 2014
	CBS 451.92	KF513185	KF513329	KF513254	KF513411	<i>Clusia</i> sp.	Puerto Rico	W.R. Buck	Lombard et al., 2014
	CBS 104.95	KF513186	KF513330	KF513255	KF513412	Solo	Brazil	L. Pfenning	Lombard et al., 2014
	CBS 113467	KF513187	KF513331	KF513256	KF513413	Solo	Tailândia	M. Reblova	Lombard et al., 2014
	CPC 13577	KF513188	KF513332	KF513257	KF513414	<i>Nyssa sylvatica</i>	USA	T. Sutton	Lombard et al., 2014
	CPC 21866	DQ377830	KF513333	DQ374406	KF513415	Folhas em liteira	Guiana Francesa	C. Decock V. Robert	Lombard et al., 2014
	CPC 21867	DQ377829	KF513334	DQ374407	KF513416	Folhas em liteira	Guiana Francesa	C. Decock V. Robert	Lombard et al., 2014
	CPC 23321	KF513189	KF513335	KF513258	KF513417	<i>Nephelium lappaceum</i>	Puerto Rico	L.M. Serrato-Diaz	Lombard et al., 2014
	CPC 23322	KF513190	KF513336	KF513259	KF513418	<i>N. lappaceum</i>	Puerto Rico	L.M. Serrato-Diaz	Lombard et al., 2014
	CPC 23323	KF513191	KF513337	KF513260	KF513419	<i>N. lappaceum</i>	Puerto Rico	L.M. Serrato-Diaz	Lombard et al., 2014
	CPC 23324	KF513192	KF513338	KF513261	KF513420	<i>N. lappaceum</i>	Puerto Rico	L.M. Serrato-Diaz	Lombard et al., 2014

Espécies	Isolados	GenBank				Substrato/hospedeiro	Local	Coletor	Referência
		BTUB	HIS3	ITS	TEF-1a				
	CPC 23325	KF513193	KF513339	KF513262	KF513421	<i>N. lappaceum</i>	Puerto Rico	L.M. Serrato-Diaz	Lombard et al., 2014
	CPC 23334	KF513194	KF513340	KF513263	KF513422	<i>N. lappaceum</i>	México	L.M. Serrato-Diaz	Lombard et al., 2014
	CPC 23335	KF513195	KF513341	KF513264	KF513423	<i>N. lappaceum</i>	México	L.M. Serrato-Diaz	Lombard et al., 2014
	CPC 23336	KF513196	KF513342	KF513265	KF513424	<i>N. lappaceum</i>	México	L.M. Serrato-Diaz	Lombard et al., 2014
	CPC 23337	KF513197	KF513343	KF513266	KF513425	<i>N. lappaceum</i>	México	L.M. Serrato-Diaz	Lombard et al., 2014
	CPC 23339	KF513198	KF513344	KF513267	KF513426	<i>N. lappaceum</i>	México	L.M. Serrato-Diaz	Lombard et al., 2014
	CCUB13	-	-	-	-	<i>Syzygium cumini</i>	Distrito Federal, Brasil	A.Reis	Este estudo
	CCUB12	-	-	-	-	<i>Cyrtostachys renda</i>	Distrito Federal, Brasil	A.Reis	Este estudo
	CCUB1253	-	-	-	-	<i>S. purpurea</i>	Distrito Federal, Brasil	A.Reis	Este estudo
	CCUB353	-	-	-	-	<i>Syzygium jambos</i>	Distrito Federal, Brasil	A.Reis	Este estudo
<i>Gliocephalotrichum sp. nov. 1</i>	CCUB232	-	-	-	-	<i>D. madagascariensis</i>	Distrito Federal, Brasil	A.Reis	Este estudo
	CCUB355	-	-	-	-	<i>S. purpurea</i>	Distrito Federal, Brasil	A.Reis	Este estudo
	CCUB381	-	-	-	-	<i>Spondias mombin</i>	Brasil	A.Reis	Este estudo
<i>Gliocephalotrichum sp. nov. 2</i>	CCUB229	-	-	-	-	<i>C. brasiliensis</i>	Minas Gerais, Brasil	A.Reis	Este estudo
	CCUB231	-	-	-	-	<i>C. brasiliensis</i>	Minas Gerais, Brasil	A.Reis	Este estudo
<i>G. cylindrosporum</i>	CBS 902.70	DQ377841	KF513353	DQ366705	KF513435	Solo	Tailândia	C. Klinsukont	Lombard et al., 2014
	CBS 903.70	KF513208	KF513354	KF513277	KF513436	Solo	Tailândia	S. Chomchalow	Lombard et al., 2014
	CBS 904.70	DQ377842	KF513355	DQ366706	KF513437	Solo	Tailândia	S. Chomchalow W.Y. Zhuang Y. Nong	Lombard et al., 2014
<i>G. grande</i>	HMAS 98302	EU984072	-	EF121859	HM054075	Folhas em liteira	China		Lombard et al., 2014
<i>G. humicola</i>	CBS 135945	KF513209	KF513356	KF513278	KF513438	Solo	Taiwan	P.W. Crous	Lombard et al., 2014
	CBS 135946	KF513210	KF513357	KF513279	KF513439	Solo	Taiwan	P.W. Crous	Lombard et al., 2014
	CPC 23340	KF513211	KF513358	KF513280	KF513440	Solo	Taiwan	P.W. Crous	Lombard et al., 2014
	CPC 23344	KF513212	KF513359	KF513281	KF513441	Solo	Taiwan	P.W. Crous	Lombard et al., 2014
	CPC 23345	KF513213	KF513360	KF513282	KF513442	Solo	Taiwan	P.W. Crous	Lombard et al., 2014

Espécies	Isolados	GenBank				Substrato/hospedeiro	Local	Coletor	Referência
		BTUB	HIS3	ITS	TEF-1a				
<i>G. longibrachium</i>	CPC 23347	KF513214	KF513361	KF513283	KF513443	Solo	Taiwan	P.W. Crous	Lombard et al., 2014
	CBS 126571	DQ377835	KF513367	DQ278422	KF513449	Folhas em liteira	Guiana Francesa	C. Decock V. Robert C. Decock e V.	Lombard et al., 2014
	CBS 132043	DQ377836	KF513368	DQ278422	KF513450	Folhas em liteira	Guiana Francesa Distrito Federal, Brasil	Robert	Lombard et al., 2014
<i>G. mexicanum</i>	CCUB17	-	-	-	-	<i>C. brasiliensis</i>		A.Reis	Este estudo
	CBS 135947	KF513220	KF513369	KF513289	KF513451	<i>N. lappaceum</i>	México	L.M. Serrato-Diaz	Lombard et al., 2014
<i>G. microchlamydosporum</i>	CBS 135948	KF513221	KF513370	KF513290	KF513452	<i>N. lappaceum</i>	México	L.M. Serrato-Diaz	Lombard et al., 2014
	CBS 345.64	DQ374410	KF513371	DQ366699	KF513453	Solo	Zaire	J.A. Meyer	Lombard et al., 2014
	CPC 21862	DQ374411	-	DQ366700	KF513454	-	Zaire	-	Lombard et al., 2014
<i>G. nephelii</i>	CPC 21863	DQ374412	-	DQ366701	KF513455	-	África do Sul	-	Lombard et al., 2014
	CBS 135949	KF513222	KF513372	KF513291	KF513456	<i>N. lappaceum</i>	Guatemala	L.M. Serrato-Diaz	Lombard et al., 2014
	CBS 135950	KF513223	KF513373	KF513292	KF513457	<i>N. lappaceum</i>	Guatemala	L.M. Serrato-Diaz	Lombard et al., 2014
<i>G. ohioense</i>	CBS 567.73	DQ374415	-	DQ366707	KF513458	Solo <i>Eleaeocarpus angustifolius</i>	USA	L.H. Huang	Lombard et al., 2014
<i>G. queenslandicum</i>	CBS 112956	KF513224	KF513374	KF513293	KF513459	<i>E. angustifolius</i>	Austrália	I. Steer B. Paulus	Lombard et al., 2014
	CBS 114868	KF513225	KF513375	KF513294	KF513460	<i>E. angustifolius</i>	Austrália	I. Steer B. Paulus	Lombard et al., 2014
<i>G. simmonsii</i>	CBS 135951	KF513226	KF513376	KF513295	KF513461	<i>N. lappaceum</i>	Guatemala	L.M. Serrato-Diaz	Lombard et al., 2014
	CBS 135952	KF513227	KF513377	KF513296	KF513462	<i>N. lappaceum</i>	Guatemala	L.M. Serrato-Diaz	Lombard et al., 2014
	CBS 135953	KF513228	KF513378	KF513297	KF513463	<i>N. lappaceum</i>	Guatemala	L.M. Serrato-Diaz	Lombard et al., 2014
<i>G. simplex</i>	CBS 267.65	DQ377838	KF513379	DQ366702	KF513464	Solo	África do Sul	H.J. Swart	Lombard et al., 2014
	CBS 983.69	KF513229	KF513380	KF513298	KF513465	Solo	Brazil	C. Ram	Lombard et al., 2014
	CBS 511.81	KF513230	KF513381	KF513299	<i>KF513466</i>	<i>Musa</i> sp.	Nova Zelândia Distrito Federal, Brasil	H.J. Boesewinkel	Lombard et al., 2014
	CCUB15	-	-	-	-	<i>D. madagascariensis</i>	Brasil Distrito Federal, Brasil	A.Reis	Este estudo
<i>C.candelabrum</i>	CCUB16	-	-	-	-	<i>D. madagascariensis</i>	Brasil	A.Reis	Este estudo
	CPC1675								

¹CCUB: Coleção de Culturas da Universidade de Brasília, Brasília, CBS: Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Holanda; CPC: Coleção de trabalho de Pedro Crous hospedada no CBS.

²BTUB= β -tubulina, HIS3= Histona, ITS = Internal Transcription Spacer of Ribossomal, = TEF-1a = Fator de alongação.

* Exemplar tipo indicado em **negrito**.

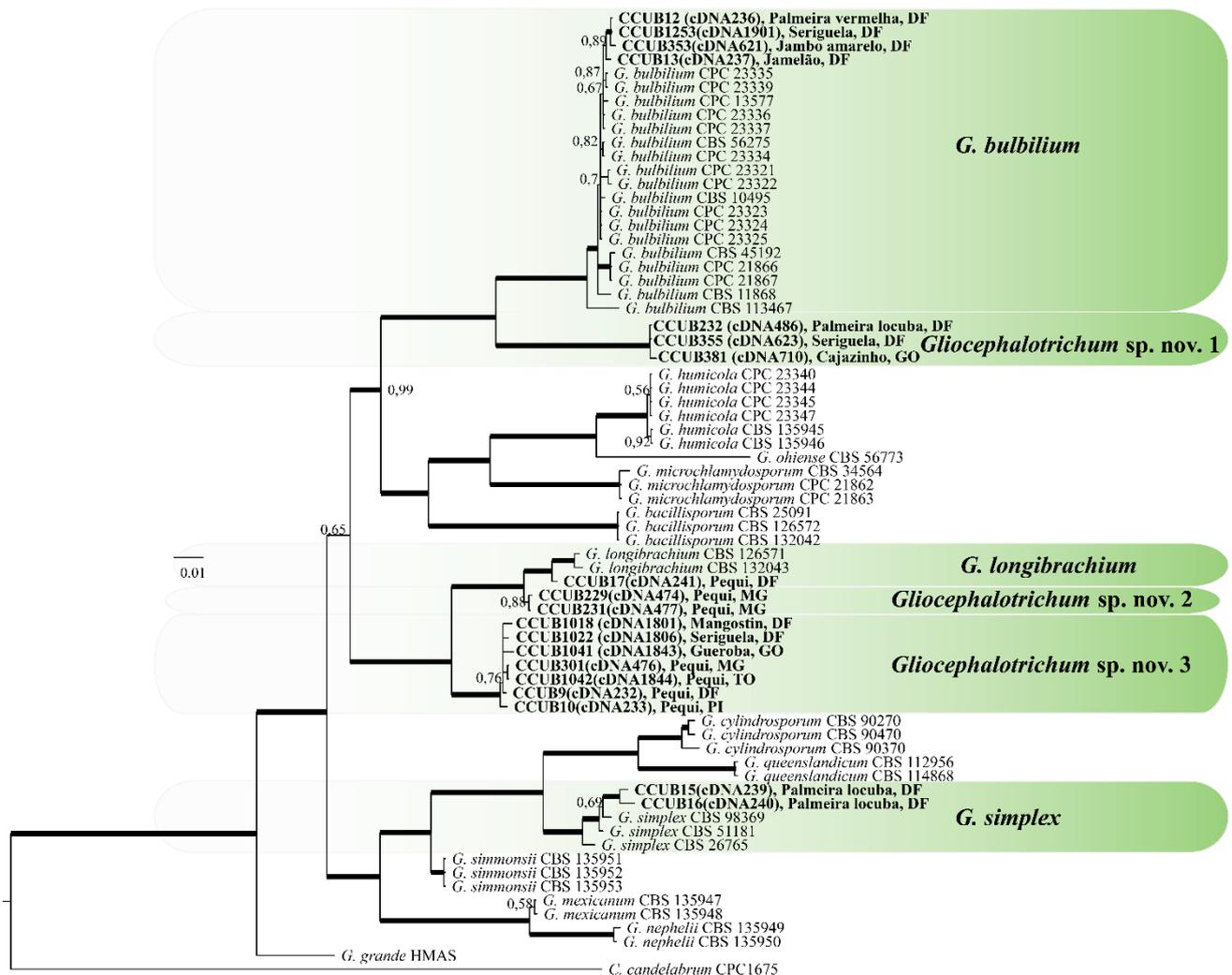


Figura 9. Árvore filogenética concatenada com sequências das regiões Fator de alongação, β -tubulina, LSU, ITS e Histona 3 obtida por Inferência Bayesiana. A probabilidade posterior é indicada acima dos nós e com as linhas mais grossas indicando probabilidade maior ou igual a 0,99 por análise de IB. A árvore foi enraizada com *Calonectria candelabrum* CPC1675. Os espécimes deste estudo estão destacados em negrito.

3.2. Caracterização morfológica

De acordo com as análises filogenéticas por Inferência Bayesiana foram indicados espécimes dos clados II, III e IV representando novas linhagens filogenéticas e confirmadas como novas espécies de *Gliosphaerotrichum* por observações morfológicas e três espécies já relatadas em outros trabalhos.

Gliocephalotrichum bulbilium J.J. Ellis Hesseltine., Bull. Torey Bot. Club 89: 21.

1962; Figura 10.

Conidióforos formados abundantemente, solitários, eretos, hialinos, emergindo a partir da hifa, consistindo de uma estipe e extensões da estipe emergindo logo abaixo dos ramos férteis, seguido de um aparato conidiogênico penicilado; estipe septada, hialina, pálida amarelada a amarela, com ornamentações na base, $175\text{--}233.5 \times 15\text{--}19 \mu\text{m}$, ramificação da estipe 1–4, diretamente saindo abaixo aparato conidiogênico em ângulos com progressiva flexão para cima, hialina, septada, $60\text{--}125 \mu\text{m}$ de comprimento, $4.5\text{--}10 \mu\text{m}$ de largura na base, terminando em uma vesícula levemente clavada a clavada. *Aparato conidiogênico* densamente penicilado, composto por sequência de ramos férteis, $21\text{--}46 \mu\text{m}$ de comprimento, $52\text{--}80.5 \mu\text{m}$ de largura; primeiro ramo asseptado, $23\text{--}41 \times 7\text{--}9.5 \mu\text{m}$; segundo ramo asseptado, $7\text{--}12 \times 3.5\text{--}5 \mu\text{m}$; cada um terminando na produção de 1–4 fiáides, cilíndricas, ligeiramente inchadas, hialinas, asseptadas, $7\text{--}11.5 \times 1.5\text{--}3.5 \mu\text{m}$, ápice com espessamento periclinal e coloração indistinta. *Conídio* hialino, liso, oblongo a elíptico, $6.5\text{--}7.5 \times 1.5\text{--}2.5 \mu\text{m}$ (média $6.5 \times 2 \mu\text{m}$), formando uma gota mucoide no ápice do conidióforo, tornando-se de amarelo a laranja de acordo com a idade. *Clamidósporos* formando agregados bubilóides imersos no meio, abundantes, marrom para marrom escuro, $40\text{--}81.5 \mu\text{m}$ de diâmetro, formado por células de parede estreita marrom transparente, lisa, globosa a obovoide, $20.5\text{--}28 \times 17\text{--}26 \mu\text{m}$; clamidósporos solitários ausentes. *Forma sexual* não observada.

Características da cultura – colônias de crescimento rápido (70 mm em 3 dias), pálida amarelada para ocre, com avesso da placa pálido amarelado a ocre; com pouco micélio aéreo formado, mas abundante conidióforos cobrindo toda a superfície do meio de cultura.

Espécimes examinadas – Águas Claras, Distrito Federal, Brasil, amostra de frutos de *Cyrtostachys renda*, junho de 2016, coletado e isolado por A. Reis, cultura CCUB12.

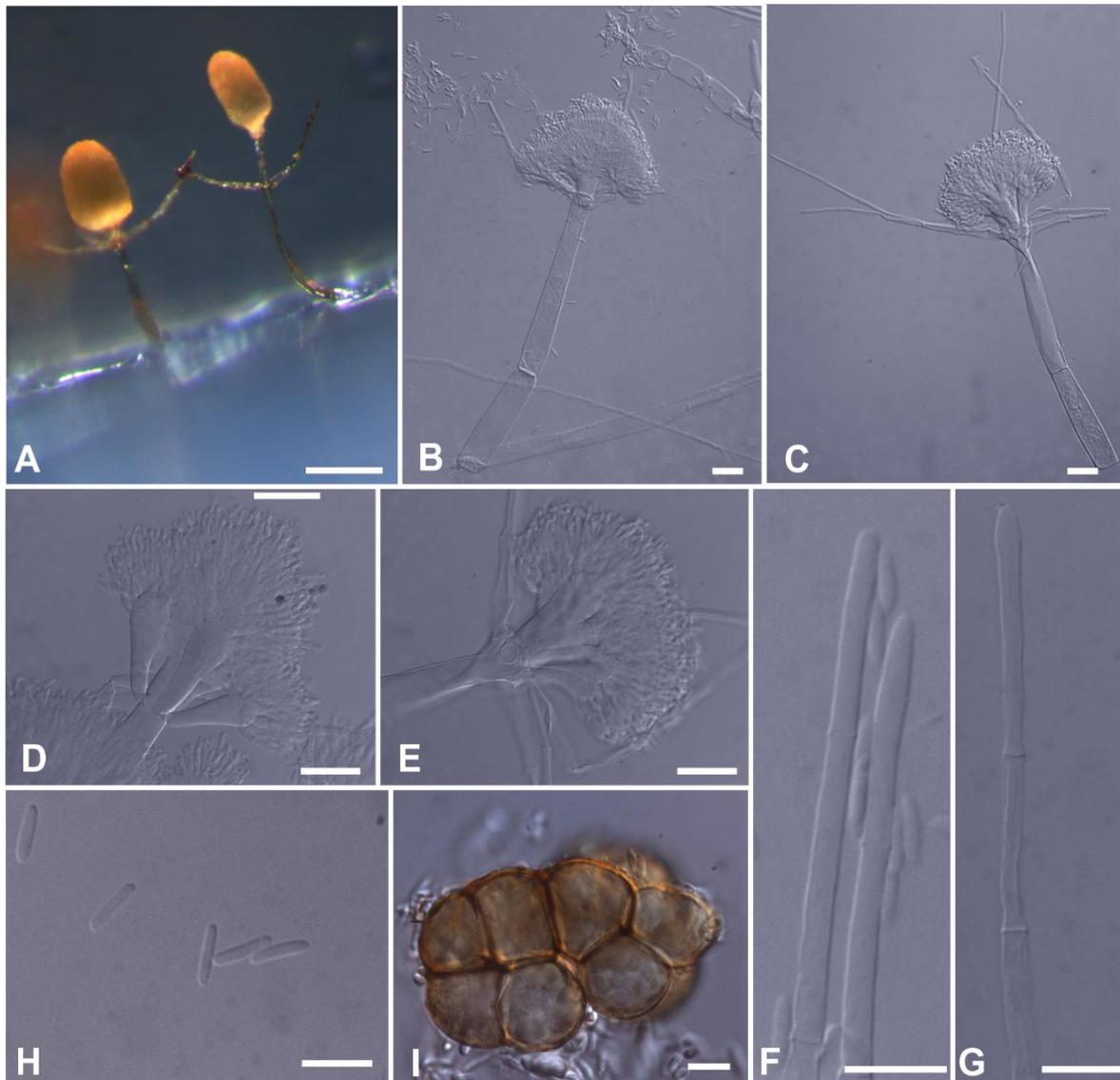


Figura 10. *Gliosphaerotrichum bulbilium* (CCUB12, cultura examinada). A. Conidióforos em SNA com folhas de cravo; B, C. Conidióforos; D, E. Conidióforos penicilados com ramos e fiálides; F, G. ápice da ramificação da estipe; H. Conídios; I, Clamidosporos. - Scale bars: A=0,1mm; B=20 μ m (se aplica a C-E); F=10 μ m (se aplica a G-J).

Gliosphaerotrichum sp. nov. 1 R. A. Fernandes, C. P. Almeida, A. Reis, D. B. Pinho-CCUB232; Figura 11.

Conidióforos formados abundantemente, solitários, eretos, hialinos, emergindo a partir da hifa, consistindo de uma estipe e extensões da estipe emergindo logo abaixo dos ramos férteis, seguido de um aparato conidiogênico penicilado; estipe septada, hialina, pálida amarelada a amarela, com ornamentações na base, $137.5-190 \times 7-10.5 \mu\text{m}$, ramificação da estipe 2-4, diretamente saindo abaixo aparato conidiogênico em ângulos com progressiva flexão para cima, hialina, septada, 78-191 μm de comprimento, 2.5-10 μm de largura na base, terminando em uma vesícula levemente clavada a clavada. *Aparato conidiogênico* densamente penicilado, composto por sequência de ramos férteis, 21-48 μm de comprimento, 21.5-78.5 μm de largura; primeiro ramo asseptado, $12.5-30.5 \times 4-8.5 \mu\text{m}$; segundo ramo asseptado, $6-13 \times 2-4.5 \mu\text{m}$; terceiro ramo asseptado, $6.5-7.5 \times 2-3.5 \mu\text{m}$, cada um terminando na produção de 4-8 fiálides, cilíndricas, ligeiramente inchadas, hialinas, asseptadas, $6.5-10 \times 1.5-3.0 \mu\text{m}$, ápice com espessamento periclinal e coloração indistinta. *Conídio* hialino, liso, sigmoide a elíptico, $(5.5 -)6.5-8(- 8.5) \times (1.5 -)2-3 \mu\text{m}$ (média $7 \times 2.5 \mu\text{m}$), formando uma gota mucoide no ápice do conidióforo, tornando-se de amarelo a laranja de acordo com a idade. *Clamidósporos* solitários, terminais, imersos no meio, abundantes, pálidos amarelados a amarelados, 24.5-31.5 μm de diâmetro, 1.5-3.5 μm de espessura de parede, globoso para subgloboso. *Forma sexual* não observada.

Características da cultura – colônias de crescimento rápido (70 mm em 3 dias), sem a formação de micélio aéreo e superficial, com muita esporulação, com colônias de coloração pálido amarelada a amarelada.

Espécimes examinadas – Águas Claras, Distrito Federal, Brasil, amostra de frutos de *Dypsis madagascariensis*, dezembro de 2016, coletado e isolado por A. Reis, (Holótipo CCUB232).

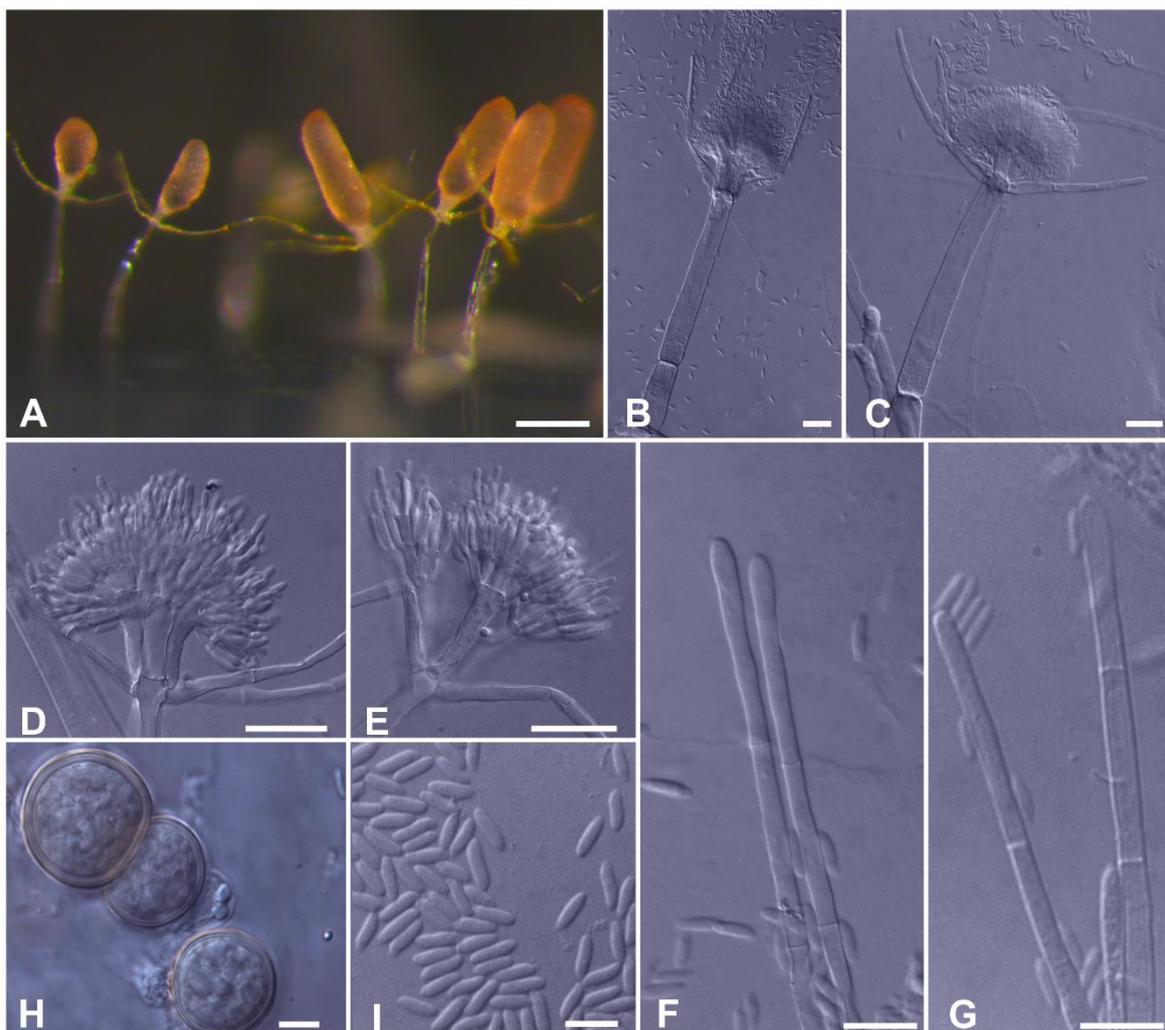


Figura 11. *Glioscephalotrichum* sp. nov. 1 (CCUB232, cultura tipo). A. Conidióforos em SNA com folhas de cravo; B, C. Conidióforos; D, E. Conidióforos penicilados com ramos e fiálides; F, G. ápice da ramificação da estipe; H. Clamidósporos; I. Conídios. - Scale bars: A=0,1mm; B=20 μ m (se aplica a C-E); F=10 μ m (se aplica a G-I).

Notas – *Glioscephalotrichum* sp. nov. 1 filogeneticamente representa um grupo irmão a *G. bulbilium*, morfológicamente ambos são similares, no entanto o primeiro se distingue por ter uma maior variação no comprimento da estipe, não apresentar variação no número de ramos, possuir conídios menores e mais largos (5.5 –)6.5–8(– 8.5) \times (1.5 –)2–3 μ m) e clamidósporos solitários nas terminações das hifas.

***Gliocephalotrichum* sp. nov. 2** R. A. Fernandes, C. P. Almeida, A. Reis, D. B. Pinho-CCUB231; Figura 12.

Conidióforos formados abundantemente, solitários, eretos, hialinos, emergindo a partir da hifa, consistindo de uma estipe e extensões da estipe emergindo logo abaixo dos ramos férteis, seguido de um aparato conidiogênico penicilado; estipe septada, hialina, levemente amarelado, $103\text{--}180.5 \times 8.5\text{--}12.5 \mu\text{m}$, ramificação da estipe 2–5, diretamente saindo abaixo aparato conidiogênico em ângulos com progressiva flexão para cima, hialina, septada, $127.5\text{--}191 \mu\text{m}$ de comprimento, $3.5\text{--}5.5 \mu\text{m}$ de largura na base, terminando em uma vesícula levemente clavada. *Aparato conidiogênico* densamente penicilado, composto por sequência de ramos férteis, $21.5\text{--}42.5 \mu\text{m}$ de comprimento, $30.5\text{--}64.5 \mu\text{m}$ de largura; primeiro ramo asseptado, $8\text{--}18.3 \times 3\text{--}5.5 \mu\text{m}$; segundo ramo asseptado, $5.5\text{--}9.5 \times 2\text{--}4.5 \mu\text{m}$; terceiro ramo asseptado, $6\text{--}9 \times 2\text{--}4.5 \mu\text{m}$, cada um terminando na produção de 5–8 fiálides, cilíndricas, ligeiramente inchadas, hialinas, asseptadas, $7\text{--}9.5 \times 1.5\text{--}2.5 \mu\text{m}$, ápice com espessamento periclinal e coloração indistinta. *Conídio* hialino, liso, cilíndrico para baciliforme, $7.5\text{--}8.5(-9) \times 1.5\text{--}2(-2.5) \mu\text{m}$ (média $8 \times 2 \mu\text{m}$), formando uma gota mucoide no ápice do conidióforo. *Clamidósporos* formados abundantemente, marrom para marrom escuro, superficial e imerso no meio, agregados, $207.5\text{--}388 \times 124.5\text{--}236 \mu\text{m}$, consistindo de células globosas a elipsoides individuais, marrom, lisas, $15\text{--}19.5 \times 12\text{--}17 \mu\text{m}$; clamidósporos solitários ausentes. *Forma sexual* não observada.

Características da cultura – colônias de crescimento rápido (70 mm em 3 dias), pálida amarelada tornando-se marrom escura após 10 dias, ocre, com avesso da placa pálido marrom escuro; sem micélio aéreo formado, mas abundante conidióforos cobrindo toda a superfície do meio de cultura.

Espécimes examinadas – Brasília de Minas, Minas Gerais, Brasil, amostra de frutos de *Caryocar brasiliensis*, dezembro de 2016, coletado e isolado por A. Reis, (Holótipo CCUB232).

Notas – *Gliocephalotrichum* sp. nov. 2 é muito similar morfológicamente a *G. longibrachium*, no entanto o primeiro se distingue por apresentar menor variação na ramificação da estipe ($127.5\text{--}191 \times 3.5\text{--}5.5 \mu\text{m}$), menor tamanho em aparato conidiogênico ($21.5\text{--}42.5 \times 30.5\text{--}64.5 \mu\text{m}$), menores fiálides ($7\text{--}9.5 \times 1.5\text{--}2.5 \mu\text{m}$) e em seus clamidósporos apresentam agregados composto por maior número de células individuais.

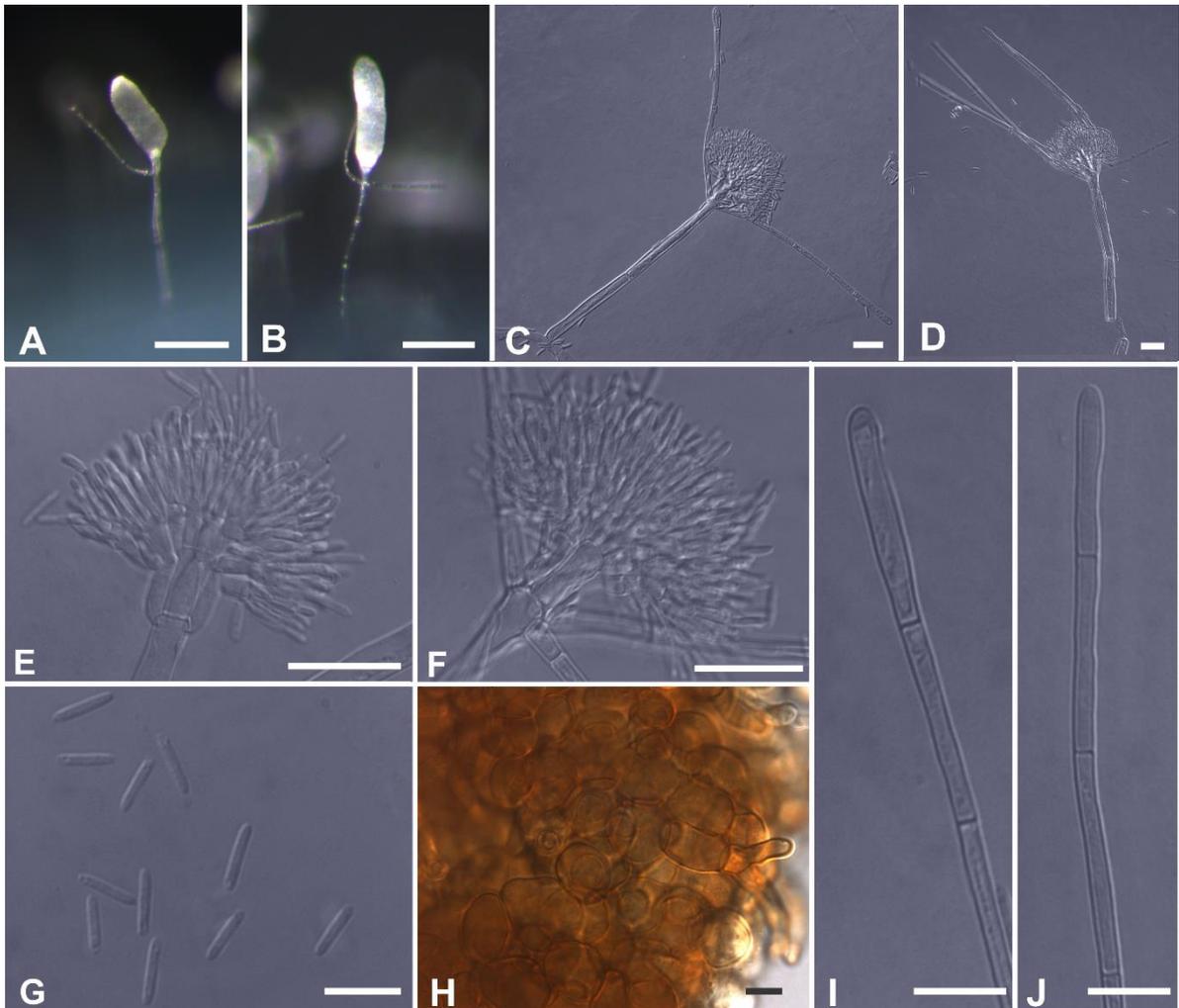


Figura 12. *Gliocephalotrichum* sp. nov. 2 (CCUB231, cultura tipo). A, B. Conidióforos em SNA com folhas de cravo; C, D. Conidióforos; E, F. Conidióforos penicilados com ramos e fiálides; G. Conídios; H. Clamidósporo; I-J. Ápice da ramificação da estipe. - escala: A-B=0,1mm; C=20 μm (se aplica a D-F); G=10 μm (se aplica a H-J).

Gliocephalotrichum sp. nov. 2 também se diferencia de *Gliocephalotrichum* sp. nov. 3, pela presença da ramificação da estipe.

***Gliocephalotrichum* sp. nov. 3** R. A. Fernandes, C. P. Almeida, A. Reis, D. B. Pinho-CCUB301; Figura 13.

Conidióforos formados abundantemente, solitários, eretos, hialinos, emergindo a partir da hifa, consistindo de uma estipe e extensões da estipe ausentes, seguido de um aparato conidiogênico penicilado; estipe septada, hialina, pálida amarelada a amarela, lisa, 282–420 × 11–18.5 µm. *Aparato conidiogênico* densamente penicilado, composto por sequência de ramos férteis, 30.5–99.5 µm de comprimento, 31.5–103.5 µm de largura; primeiro ramo asseptado, 39–64 × 5.5–9.5 µm; segundo ramo asseptado, 12–28 × 4.5–77.5 µm; ramos adicionais (-3) asseptados, 8–24.5 × 2.5–6 µm, cada um terminando na produção de 4-6 fiáides, cilíndricas, ligeiramente inchadas, hialinas, asseptadas, 5–12.5 × 2–4.5 µm, ápice com espessamento periclinal e coloração indistinta. *Conídio* hialino, liso, oblongo para elipsoidal, (5 –)6–10(– 12) × (2 –)3.0–4.5 µm (média 8 × 3 µm), formando uma gota mucoide no ápice do conidióforo, tornando-se de amarelo a laranja de acordo com a idade. *Clamidósporos* formando agregados bubilóides imersos e sobre o meio, abundantes, marrom para marrom escuro, 198–400.5 × 221.5–381.5 µm, formado por células globosas para elipsoidais, 19–28.5 × 14.5–22.5 µm; clamidósporos solitários ausentes. *Forma sexual* não observada.

Características da cultura – colônias de crescimento rápido (70 mm em 4 dias), pálida amarelada para ocre, com avesso da placa pálido amarelado a ocre escuro; sem micélio aéreo formado, mas abundante conidióforos cobrindo toda a superfície do meio de cultura e pontuações escuras correspondendo aos clamidósporos.

Espécimes examinadas – Montes Claros, Minas Gerais, Brasil, amostra de frutos de *Caryocar brasiliensis*, janeiro de 2017, coletado e isolado por A. Reis, (Holótipo CCUB301).

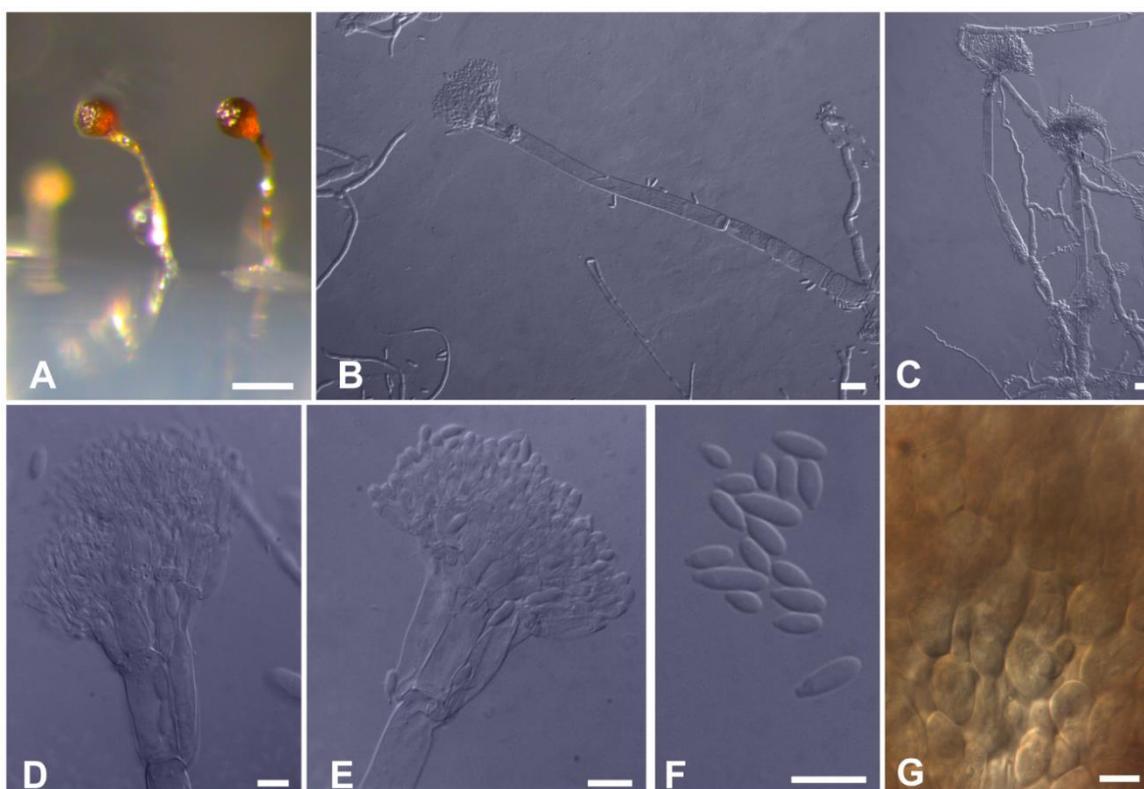


Figura 13. *Glioccephalotrichum* sp. nov. 3 (CCUB301, cultura tipo). A. Conidióforos em SNA com folhas de cravo; B, C. Conidióforos; D, E. Conidióforos penicilados com ramos e fiálides; F. conídios; G. Clamidósporos bulbilóides. - Scale bars: A=0,1mm; B=20 μ m (se aplica a C); D=10 μ m (se aplica a E-G).

Notas – *Glioccephalotrichum* sp. nov. 3 é filogeneticamente próximo a *G. longibrachium*, mas se distingue deste por não apresentar ramificação da estipe, ter número de ramos no conidióforo igual a 2 (-3), menor variação no número de fiálides (4-6) e conídios deste são oblongos para elipsoidais, de tamanho (5 -)6-10(-12) \times (2 -)3.0-4.5 μ m, enquanto que em *G. longibrachium* estes são cilíndricos para baciliformes, com tamanho de (6.5-) 8.0-10.5(-12.5) \times 3 (1.5-)1.5-2.0(-2.5) μ m.

3.3. Patogenicidade

Foram escolhidos sete espécimes, de diferentes clados de *Gliocephalotrichum*, correspondendo a diferentes hospedeiros. Estes espécimes foram utilizados para inocular os hospedeiros originais (a partir do qual foi obtido) e em inoculações cruzadas (utilizando distintos hospedeiros). Todos os isolados foram patogênicos independente de terem sido, ou não, isolados do hospedeiro inoculado, observando intensa esporulação e crescimento micelial sobrepondo o sintoma de podridão em frutos aos 10 dias após a inoculação. Adicionalmente, os frutos da testemunha permaneceram sadios.

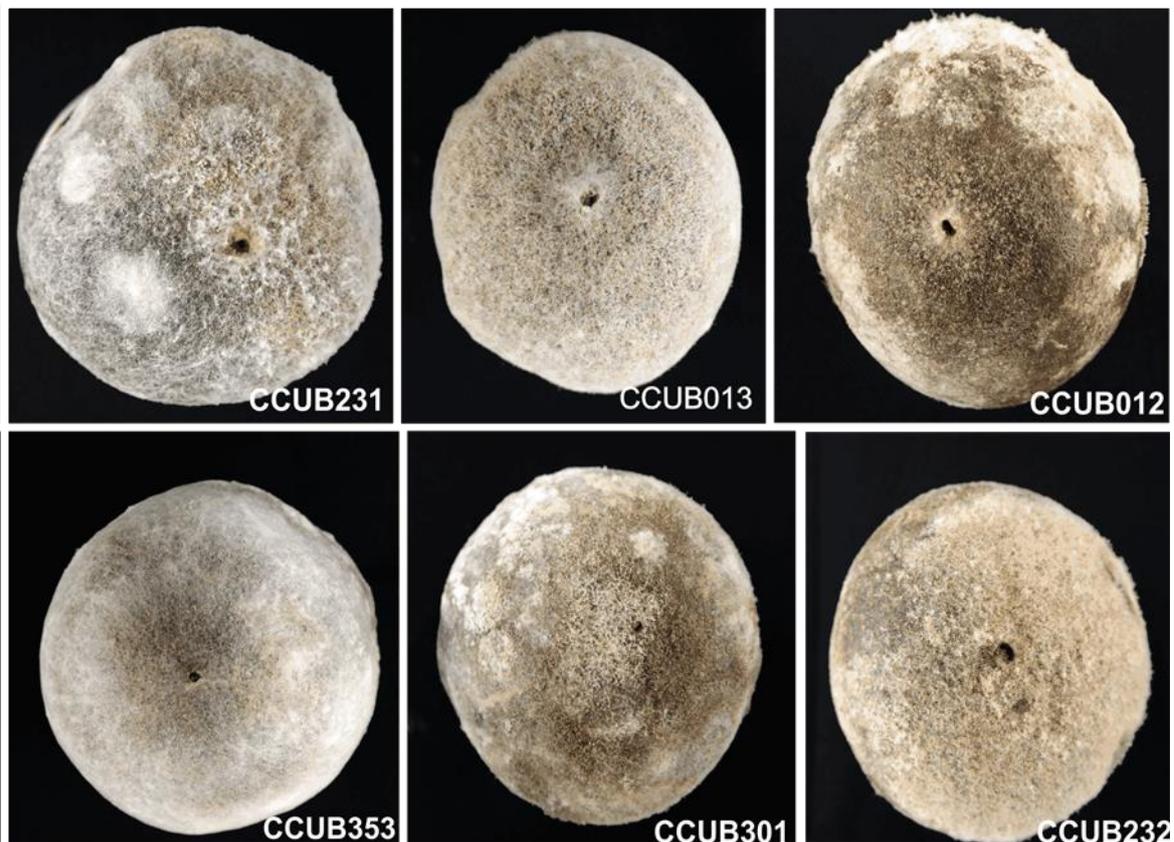


Figura 14. Frutos de *Caryocar brasiliensis* inoculados com diferentes espécies de *Gliocephalotrichum*, após 10 dias de inoculados, mostrando intensa esporulação e micélio cotonoso na superfície do fruto.

Foram inoculados os isolados de *G. bulbilium* CCUB12 (*Cyrtostachys renda*), CCUB13 (*Syzygium cumini*) e CCUB353 (*Syzygium jambos*), *Gliocephalotrichum* sp. nov. 1 CCUB232 (*Dypsis madagascariensis*), *Gliocephalotrichum* sp. nov. 2 CCUB231

(*Caryocar brasiliensis*) e *Gliocephalotrichum* sp. nov. 3 CCUB301 (*C. brasiliensis*). Estes isolados começaram a induzir sintomas quatro dias após a inoculação, aos dez dias os frutos já se encontravam tomados por intensa esporulação e micélio cottonoso (Figura 14). O reisolamento das espécies de *Gliocephalotrichum* confirmou que estes são os agentes causais de podridão de frutos em *C. brasiliensis*.

Para *Spondias purpurea* (seriguela) utilizados os isolados de *G. bulbilium* CCUB13 e CCUB353, *Gliocephalotrichum* sp. nov. 1 - CCUB232, *Gliocephalotrichum* sp. nov. 2 - CCUB231 e *Gliocephalotrichum* sp. nov. 3 - CCUB301. Os sintomas começaram ser expressos nos frutos cinco dias após a inoculação, assim como em Pequi os sintomas foram mascarados pelo intenso crescimento do fungo. Entretanto, nota-se que, no desenvolvimento



Figura 15. Frutos de *Spondias purpurea* inoculados com diferentes espécies de *Gliocephalotrichum*, dez dias após a inoculação, mostrando intensa esporulação e micélio cottonoso na superfície do fruto.

da doença, os frutos começam a murchar após a inoculação com os diferentes isolados. Aos dez dias após a inoculação os frutos já se encontravam tomados por intensa esporulação e

micélio cotonoso (Figura 15). O reisolamento das espécies de *Gliocephalotrichum* confirmaram que este são os agentes causais da podridão de frutos em seriguela.

4. DISCUSSÃO

Análises morfológicas e moleculares de culturas de *Gliocephalotrichum* spp. provenientes de vários substratos e localidades, mostraram a ocorrência de três espécies até então não relatadas, *Gliocephalotrichum* sp. nov. 1, *Gliocephalotrichum* sp. nov. 2 e *Gliocephalotrichum* sp. nov. 3, bem como outras três espécies já previamente caracterizadas. Em estudos anteriores, Decoock et al. (2006) descreveram a espécie de *G. longibrachium* vivendo saprofiticamente em folhas de angiospermas na Guiana Francesa, não havendo nenhum relato em outra região do mundo ou em outra planta hospedeira. Desta forma, o isolado presente neste estudo representa o primeiro relato desta espécie no Brasil bem como o primeiro relato induzindo podridão de fruto de pequi.

No Brasil são conhecidas três espécies de *Gliocephalotrichum* (LOMBARD *et al.*, 2014). No entanto, a amostragem e o número de isolados ainda são muito reduzidos. Por exemplo, *G. bulbilium* até o momento deste estudo, somente um espécime (coletado em 1995) tinha sido relatado em solo brasileiro, sendo formalmente publicado quase duas décadas depois por Lombard et al. (2014).

A partir do presente estudo, espécimes de *G. bulbilium* foram encontrados no Distrito Federal em frutos de palmeira, seriguela, jambo amarelo e jamelão, constituindo o primeiro relato desta espécie causando podridão de frutos nestas hospedeiras. Apesar da patogenicidade de isolados ser relatada no Brasil somente em 2018, em outros países a espécie já é conhecida como agente causal de doenças em *Nephelium lappaceum* no México e Porto Rico. Lombard et al. (2014) relatam que estes frutos possam ter vindo contaminados dos Estados Unidos uma vez que se tratavam de produtos de importação.

Gliocephalotrichum simplex é outra espécie relatada no Brasil, tendo ocorrência restrita a poucos estados. No Brasil, *G. simplex* foi isolado de amostras de solo na Bahia e no Pará nos anos de 1969 e 2011, respectivamente, e somente publicados em trabalhos de

Lombard et al. (2014). No presente trabalho foi possível identificar uma nova ocorrência desta espécie no Distrito Federal em palmeira locuba, representando o primeiro relato desta espécie como agente causal de uma doença em uma espécie vegetal no Brasil. No entanto, no mundo já se encontram relatos desta espécie relacionados a podridão de frutos em *Lasmenia* sp. no Hawaii (NISHIJIMA e FOLLETT, 2002), *N. lappaceaum* na Guatemala e Porto Rico, *Musa* sp. na Nova Zelândia, *Miconia* sp. na Venezuela e *Flacourtia* sp. na Indonésia (LOMBARD *et al.*, 2014).

A caracterização morfológica das espécies conhecidas de *Gliocephalotrichum* não foi possível para os espécimes agrupados juntamente com *G. simplex*, isso foi devido ao fato dos isolados trabalhados neste estudo não produzirem nenhuma estrutura assexuada ou sexuada em meio de cultura recomendados para a caracterização morfológica do gênero.

Observando a morfologia dos espécimes de *G. bulbilium* no presente trabalho e a descrição feita por Ellis e Hesseltine (1962) a única característica morfológica que ficou diferente da descrição original da espécie foi a ramificação da estipe, onde os espécimes do presente estudo (60-125 × 4.5-10 µm) foram menores que a descrição original (100-250 µm). Quanto às outras características morfológicas avaliadas neste estudo os intervalos de tamanho e formato ficaram dentro dos limites estabelecidos por Ellis e Hesseltine (1962). Uma das hipóteses para esta pequena diferença entre espécimes de uma mesma espécie pode estar relacionada com o meio de cultura utilizado. No presente trabalho foi empregado o meio SNA com folhas de cravo, recomendado por Lombard et al. (2014), enquanto que o meio utilizado por Ellis e Hesseltine (1962) foi V8. Outro ponto que pode explicar essa diferença é o fato dos marcadores morfológicos utilizados na primeira descrição, em 1962, serem diferentes dos padrões morfológicos preconizados por Lombard et al. (2014).

As três espécies propostas no presente trabalho serão descritas seguindo as normas do Código Internacional de Nomenclatura de Algas, Fungos e Plantas. A primeira espécie

proposta *Gliocephalotrichum* sp. nov. 2, foi encontrada em um único hospedeiro e de ocorrência restrita a Minas Gerais. Outra espécie também encontrada em frutos de pequi, *Gliocephalotrichum* sp. nov. 1, também foi isolada em frutos de pequi nos Estados de Minas Gerais, Tocantins, Piauí e no Distrito Federal, bem como em frutos de gueroba (coletados em Goiás), seriguela e mangostin (coletados no Distrito Federal). *Gliocephalotrichum* sp. nov. 1, foi isolada de amostras coletadas em vários Estados brasileiros e em frutos de cajazinho, seriguela, pequi, palmeira locuba e jerivá.

Apesar da probabilidade posterior do ramo que sustenta *Gliocephalotrichum* sp. nov. 2 não ser maior que 0,95 pela Inferência Bayesiana, é proposto que esta seja uma nova espécie devido as grandes diferenças morfológicas desta com o seu grupo irmão *G. longibrachium*. Comparando a morfologia de ambas as espécies se nota, que pela descrição original feita por Decock et al. (2006) o espécime avaliado por estes autores possuía crescimento mais lento, maiores dimensões de estipe, ramificação da estipe, aparato conidiogênico, fiálides, conídios e menores clamidósporos em relação a espécie proposta no presente trabalho (*Gliocephalotrichum* sp. nov. 2).

Em relação à patogenicidade destas espécies, todos os isolados foram capazes de causar doença independente do hospedeiro inicial, mostrando assim que as espécies tratadas neste estudo têm potencial de serem patogênicas a uma ampla gama de hospedeiros. De fato, Lombard et al. (2014), em que, encontraram, de maneira similar, diferentes espécies de *Gliocephalotrichum* em um mesmo hospedeiro. No presente estudo, somente no pequizeiro, foram encontradas quatro espécies do gênero *Gliocephalotrichum* em diferentes localidades. Isso ressalta que em uma mesma doença podem ser encontradas mais de uma espécie de patógenos causando sintomas similares, mostrando que a identificação com base apenas na sintomatologia resultar em erros de diagnóstico.

Tambem foi observada uma mesma espécie fúngica causando podridão de frutos em diferentes hospedeiros. Nishijima et al. (2012) relatam que em um mesmo fruto de Rambutan foram encontradas duas espécies de *Gliocephalotrichum*, relatando que este gênero pode ter importância econômica para esse hospedeiro no Hawaii. No Brasil, alguns dos frutos relatados como hospedeiros de espécies de *Gliocephalotrichum* apresentam um apelo social, sobretudo por fazerem parte da cultura regional de alguns estados, como no caso do Pequi. Neste contexto, maiores pesquisas quanto a diversidade e distribuição desse grupo de patógenos e os danos que eles patógeno pode causar, ainda devem ser melhor investigados com mais detalhes.

As análises filogenéticas e morfológicas para o gênero *Gliocephalotrichum* permitiram observar a presença de quatro distintos grupos de espécies, sendo que a morfologia de esporos, o mais forte indicativo para a definição dos diferentes grupos (Figura 16). Decock et al. (2006) comentam que a posição das ramificações da estipe poderia ser um bom marcador morfológico para distinguir espécies de *Gliocephalotrichum*. Wiley e Simmons (1971) utilizaram a posição da ramificação da estipe na estipe para discriminar dois grupos informais de espécies até então conhecidas na época:, um composto por *G. bulbilium* e *G. microclamydosporum* e o outro englobando as espécies *G. simplex* e *G. cylindrosporum*.

O grupo I composto por *G. bulbilium* e *Gliocephalotrichum* sp. nov. 1, compartilham o formato oblongo para elipsoide dos conídios, mas diferem pelo tipo de clamidósporo formado, onde o primeiro é um agregado bulbiloide e o segundo, forma clamidósporos solitários nas pontas das hifas. O grupo II (composto por quatro espécies) possui formato de conídios e de clamidósporos similares, estes sendo elipsoides e clamidósporos solitários em formato globoso a subgloboso. O grupo III composto por *G. longibrachium*, *Gliocephalotrichum* sp. nov. 2 e *Gliocephalotrichum* sp. nov. 3 possuem

em comum os conídios baciliformes tendendo ligeiramente para cilíndricos e agregados bulbiloides. O último grupo é composto pelo maior número de espécies e possui a maior diversidade de formas de clamidósporos, desde simples intercalares, terminais a agregados bulbiloides, no entanto, estas espécies compartilham a forma dos conídios, com pouca variação, apresentando forma cilíndrica a ligeiramente elipsoide.

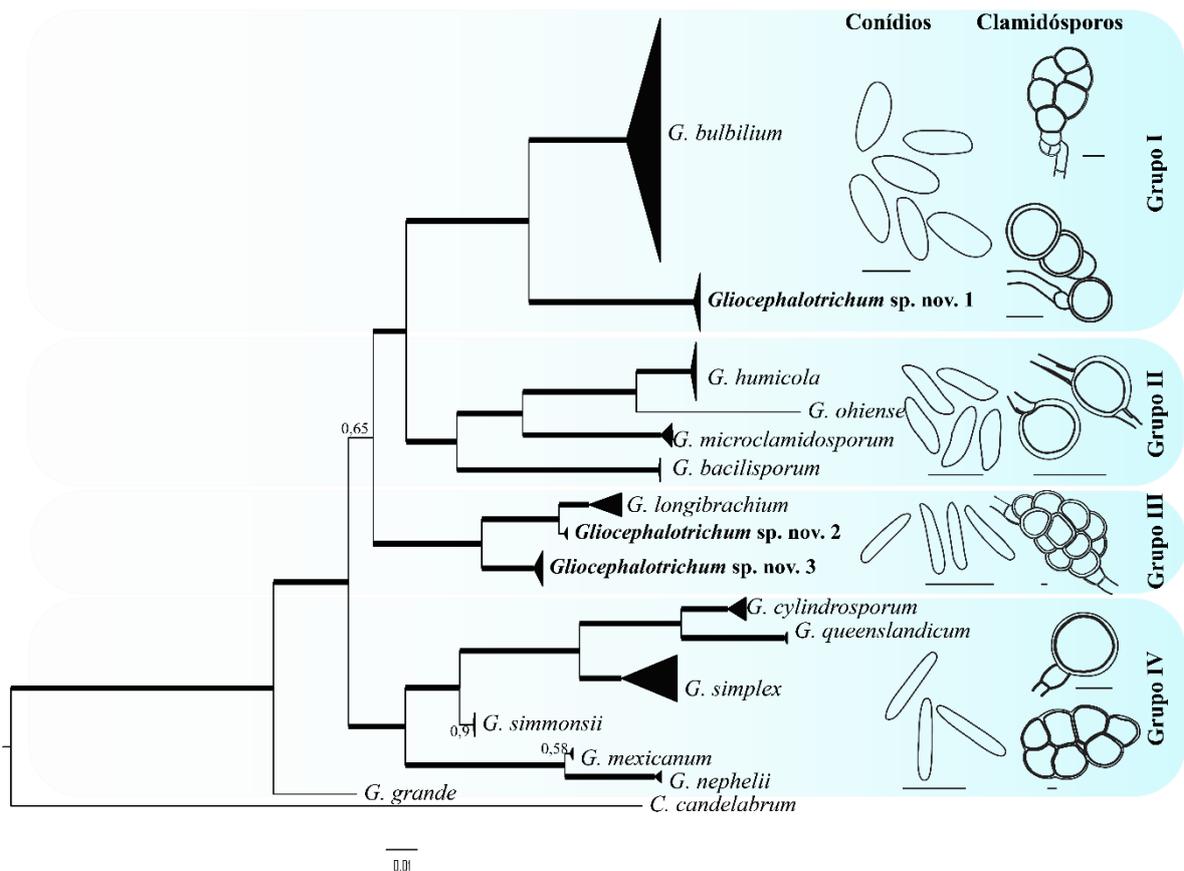


Figura 16. Árvore filogenética obtida por Inferência Bayesiana com separação dos grupos, exemplificando a morfologia compartilhada para cada grupo dentro do gênero *Glioscephalotrichum*. Barras conídios iguais a 10 μm , barras de clamidósporos igual a 20 μm .

Este tipo de classificação, observando inicialmente marcadores morfológicos, é importante para direcionar estudos em laboratórios que ainda não possuem ferramentas moleculares, bem como direcionar trabalhos moleculares visando a redução de gastos quando se trabalha com gêneros com maior número de amostragem.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um total de 54 espécimes de *Gliocephalotrichum* foram coletados a partir de podridões de frutos de nove plantas hospedeiras pertencentes a cinco famílias botânicas. Três novas espécies serão propostas de acordo com as regras do Código Internacional de Nomenclatura de Algas, Fungos e Plantas para isolados obtidos no Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais, Piauí e Tocantins. A descrição da morfologia de *G. bulbilium* foi expandida. Adicionalmente, *G. longibracium* foi encontrado pela primeira vez no Brasil, enquanto jambo amarelo (*Syzygium jambos*), jamelão (*Syzygium cumini*), palmeira locuba (*D. madascariensis*), palmeira vermelha (*Cyrtostachys renda*) e seriguela (*Spondias purpurea*) foram identificados como hospedeiros de *G. bulbilium* e *G. simplex*;

A árvore filogenética obtida por comparações de sequências da região fator de alongação confirma os resultados da caracterização morfológica, onde todos os espécimes obtidos nesse estudo foram identificados como *Gliocephalotrichum*. Além disso, comprova-se que existe uma diversidade de espécies de *Gliocephalotrichum* no Brasil.

Todas as espécies de *Gliocephalotrichum* causaram podridão em pequi e seriguela independente do hospedeiro inicialmente coletado.

Esse é o primeiro estudo mais abrangente sobre *Gliocephalotrichum* no Brasil. Estudos complementares são necessários para: (i) coletar um número maior de indivíduos, (ii) examinar os espécimes combinando caracteres morfológicos e moleculares, (iii) detalhar a descrição dos espécimes considerados como novas espécies, e (iv) relatar as novas ocorrências para o hospedeiros/substratos ou o novos registros de distribuição geográfica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G.; **Métodos em fitopatologia**, 2^a ed. Viçosa: Editora UFV, 2016.

ALFENAS, R. F.; LOMBARD, L.; PEREIRA, O. L.; ALFENAS, A. C.; CROUS, P. W. Diversity and potential impact of *Calonectria* species in *Eucalyptus* plantations in Brazil. **Studies in Mycology**, v. 80, p. 89-130, 2015.

CONSTANTELOS, C.; DOYLE, V. P.; LITT, A.; OUDEMANS, P. V. First report of *Gliocephalotrichum bulbilium* causing cranberry fruit rot in New Jersey and Massachusetts. **Plant Disease**, v. 95, n. 5, p. 618, 2011.

CROUS, P. W. **Taxonomy and pathology of *Cylindrocladium* (*Calonectria*) and allied genera**. Sant Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society, 2002.

CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z.; RISÈDE, J. M.; SIMONEAU, P.; HYWEL-JONES, N. L. *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaeropedunculate vesicles. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 415-430, 2004.

DECOCK, C.; HURET, S.; CHARUE, P. Anamorphic fungi from French Guyana: two undescribed *Gliocephalotrichum* species (Nectriaceae, Hypocreales). **Mycologia**, v. 98, n. 3, p. 488-498, 2006.

ELLIS, J. J.; HESSELTINE, C. W.; A new genus of Moniliales having penicilli subtended by sterile arms. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 89, n. 1, p. 21-27, 1962.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1323-1330, 1995.

HOOG, G. D.; ENDE, A. H. G. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous Basidiomycetes. **Mycoses**, v. 41, n. 5-6, p. 183-189, 1998.

HUANG, L.H.; SCHMITT, J. A. *Gliocephalotrichum ohiense*, a new species from Ohio soil, **Mycologia**, v. 65, n. 4, p. 948-952, 1973.

INTAN SAKINA, M. A.; LATIFFAH, Z. First report of *Gliocephalotrichum bacillisporum* causing fruit rot of rambutan (*Nephelium lappaceum*) in Malaysia. **Plant Disease**, v. 97, n. 8, p. 1110, 2013.

JACOBS, K.; BERGDAHL, D. R.; WINGFIELD, M. J.; HALIK, S.; SEIFERT, K. A.; BRIGHT, D. E. WINGFIELD, B. D. *Leptographium wingfieldii* introduced into North America and found associated with exotic *Tomicus piniperda* and native bark beetles. **Mycological research**, v. 108, n. 4, p. 411-418, 2004.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT Multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 772-780, 2013.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; STALPERS, J. A. **Dictionary of the Fungi**, CABI. Wallingford, UK, 396 p. 2008.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, p. 1870-1874, 2016.

LOMBARD, L.; CROUS, P. W.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Species concepts in *Calonectria* (*Cylindrocladium*). Em: R. A. SAMSON, ed. **Systematics of Calonectria: a genus of root, shoot and foliar pathogens**. 01 ed. Utrecht, The Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center, p. 1-14, 2010.

LOMBARD, L.; SERRATO-DIAZ, L. M.; CHEEWANGKOON, R.; FRENCH-MONAR, R. D.; DECOCK, C.; CROUS, P. W. Phylogeny and taxonomy of the genus *Gliocephalotrichum*. **Persoonia**, v. 32, p. 127-140, 2014.

LOMBARD, L.; VAN DER MERWE, N. A.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Generic concepts in Nectriaceae. **Studies in mycology**, v. 80, p. 189-245, 2015.

LOMBARD, L.; WINGFIELD, M. J.; ALFENAS, A. C.; CROUS, P. W.; The forgotten *Calonectria* collection: pouring old wine into new bags. **Studies in Mycology**, v. 85, p. 159-198, 2016.

MCNEILL, J.; BARRIE, F. R.; BUCK, W. R.; DEMOULIN, V.; GREUTER, W.; HAWKSWORTH, D. L.; HERENDEEN, P. S.; KNAPP, S.; MARHOLD, K.; PRADO, J.; PRUD'HOMME VAN REINE, W. F.; SMITH, G. F.; WIERSEMA, J. H. **International code of nomenclature for algae, fungi, and plants** (Melbourne Code). [Regnum Vegetabile no. 154] A.R.G. Gantner Verlag. KG, 2012.

MILLER, M.A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees" in Proceedings of the Gateway **Computing Environments Workshop** (GCE), 14 Nov. 2010, New Orleans, LA pp 1 - 8.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chein reaction. **Methods in Ezymology**, v. 55, p. 335-350, 1987.

NIREBURG, H. I. A simplified method for identifying *Fusarium* spp. occurring on wheat. **Canadian Journal of Botany**, v. 59, p. 1599- 1609, 1981.

NISHIJIMA, K. A.; FOLLETT, P. A.; BUSHE, B. C.; NAGAO, M. A. First report of *Lasmenia* sp. and two species of *Gliocephalotrichum* on rambutan in Hawaii. **Plant Disease**,v. 86, n. 1, p. 71-71, 2002.

NYLANDER, J. A. A. MrModeltest v.2 - Programme distributed by the author.

Evolutionary Biology Center, 2004.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E.; NIRENBERG, H. I. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, p. 465-493, 1997.

PHAM, N. Q.; BARNES, I.; CHEN, S.; PHAM, T. Q.; LOMBARD, L.; CROUS, P. W.; WINGFIELD, M. J. New species of *Cylindrocladiella* from plantation soils in South-East Asia. **MycoKeys**, v. 32, p. 1-24, 2018.

PEERALLY, A. The classification and phytopathology of *Cylindrocladium* species. **Mycotaxon**. v. 40, p. 323-366, 1991.

POSADA, D.; BUCKLEY, T. R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. **Systematic biology**, v. 53, n. 5, p. 793-808, 2004.

RANNALA, B.; YANG, Z. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. **Journal of molecular evolution**, v. 43, n. 3, p. 304-311, 1996.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3.2.5: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, p. 1572-1574, 2014.

ROSSMAN, A. Y.; SAMUELS, G. J. *Leuconectria clusiae* gen. nov. and its anamorph *Gliocephalotrichum bulbilium* with notes on *Pseudonectria*. **Mycologia**, v. 85, n. 4, p. 685-704, 1993.

ROSSMAN, A. Y.; SAMUELS, G. J.; ROGERSON, C. T.; LOWEN, R. Genera of Bionectriaceae, Hypocreaceae and Nectriaceae (Hypocreales, Ascomycetes). **Studies in Mycology**, v. 42, p. 1-248, 1999.

Rossmann, A. Y., Seifert, K. A., Samuels, G. J., Minnis, A. M., Schroers, H. J., Lombard, L., Crous, P. W., Pöldmaa, K.; Cannon, P. F.; Summerbell, R. C.; Geiser, D. M.; Zhuang, W.; Hirooka, Y.; Herrera, C.; Salgado-Salazar, C.; Chaverri, P. Genera in Bionectriaceae, Hypocreaceae, and Nectriaceae (Hypocreales) proposed for acceptance or rejection. **IMA fungus**, v. 4, n. 1, p. 41-51, 2013.

SANGCHOTE, S. PONGPISUTTA, R. Fruit rots of mangosteen and their control. Em: L. M. COATES, P. J. HOFMAN G. I. JOHNSON, eds. **Disease Control and Storage Life Extension in Fruit**. Canberra, Australia: Australian Center for International Agricultural Research, p. 81-86, 1997.

SERRATO-DIAZ, L. M.; LATONI-BRALIOWSKY, E. I.; GOENAGA, R.; FRENCH-MONAR, R. D. First report of *Gliocephalotrichum bulbilium* and *G. simplex* causing fruit rot of rambutan in Puerto Rico. **Plant Disease**, v. 96, n. 8, p. 1225, 2012.

SINGH, S. K.; YADAV, L. S.; SINGH, P. N.; SHARMA, R.; MUKHERJEE, G. Additions to *Gliocephalotrichum* species (anamorphic Hypocreales) from fruit litter of the medicinal plant *Terminalia chebula* in the Western Ghats, India. **Mycoscience**, v. 53, n. 5, p. 391-395, 2012.

SIVAPALAN, A.; HARNDAN, F.; ZAIN, R. M. Fungi associated with postharvest fruit rots of *Durio graveolens* and *D. kutejensis* in Brunei Darussalam. **Australasian Plant Pathology**. v. 27, n. 4, p. 274-277, 1998.

WILEY, B.J.; SIMMONS, E. G. *Gliocephalotrichum*, new combinations and a new species. **Mycologia**. v. 63, n. 3, p. 575-585, 1971.

ZUANG, W. Y.; NONG, Y.; LUO, J. New species and new Chinese records of
Bionectriaceae and Nectriaceae (Hypocreales, Ascomycetes) from Hubei, China. **Fungal
Diversity**. v. 24, p. 347-357, 2007.