



Ana Filipa
Polido Lopes

Caracterização de isolados de *Diaporthe* em
espécies florestais

DECLARAÇÃO

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



**Ana Filipa
Polido Lopes**

**Caracterização de isolados de *Diaporthe* em
espécies florestais**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica do Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves, Professor Auxiliar com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho aos meus pais que pouco percebem de fungos, mas que, ainda assim, são os meus maiores ensinadores.

o júri

presidente

Doutora Tânia Isabel Sousa Caetano
investigadora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

arguente

Prof. Doutora Ana Cristina de Fraga Esteves
professora auxiliar da Universidade Católica Portuguesa, Faculdade de Medicina Dentária

orientador

Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves
professor auxiliar com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Nesta etapa final foram várias as pessoas, que de forma direta ou indireta, me ajudaram na realização desta dissertação final e às quais não poderia deixar de agradecer.

Em primeiro lugar ao meu orientador Professor Artur Alves pela ajuda, pelas sugestões e disponibilidade em esclarecer todas as minhas dúvidas que foram surgindo ao longo da realização desta dissertação.

Ao Eduardo Batista pela ajuda e pelos inúmeros conselhos, pela compreensão e enorme paciência que sempre teve comigo desde o primeiro dia. O meu gigante obrigada.

À Doutora Anabela Lopes e à Doutora Liliana Santos pela disponibilidade e auxílio em diversas fases do estágio.

A todos os membros do MicroLab e FunPlantLab pela disponibilidade, que sempre se prontificaram a ajudar.

À Inês e ao Diogo, pela preocupação, amizade e companheirismo.

Aos meus amigos que, mesmo a largos quilómetros de distância, sempre demonstraram preocupação e por todos os momentos de descontração que me proporcionam.

Ao meu tio pelo incansável apoio.

Ao meu namorado, Daniel, por acreditar sempre, pela motivação e compreensão que tornou este período mais fácil.

Por último, o agradecimento mais sentido, que naturalmente endereço às pessoas que me possibilitaram a ingressão a este ciclo e às que mais me motivaram para a conclusão do mesmo, aos meus pais, Ana e João, e ao meu irmão Eduardo.

A todos, um muito obrigada!

palavras-chave

Eucalyptus globulus; eucalipto; *Pinus pinaster*; pinheiro-bravo; *Quercus suber*; sobreiro; fungos; *Diaporthe*; identificação; taxonomia.

resumo

As florestas possuem um alto valor patrimonial do ponto de vista ambiental e económico. Como tal, é de extrema importância a sua preservação e o constante estudo das espécies florestais e de toda a sua envolvente. Uma das ameaças a estas espécies são as doenças causadas por fungos, provocando lesões no hospedeiro, desde a podridão de frutos até à morte. O presente estudo pretende contribuir para um melhor conhecimento destes agentes patogénicos, caracterizando isolados de fungos encontrados nas espécies florestais *Eucalyptus globulus*, *Pinus pinaster* e *Quercus suber* em Portugal.

Neste estudo foi efetuada uma caracterização de um conjunto de isolados obtidos dos hospedeiros eucalipto, pinheiro-bravo e sobreiro, sintomáticos e assintomáticos, distribuídos por diversas zonas do país.

Inicialmente foi realizada uma tipagem por MSP-PCR, de forma a avaliar a diversidade genética presente na coleção de isolados. Após a obtenção dos perfis por MSP-PCR, foi criado um dendrograma de forma a facilitar o agrupamento dos isolados de acordo com a similaridade dos seus perfis. Deste modo, foram selecionados 18 isolados representativos de cada grupo para proceder à sua identificação inicial pela sequenciação da região ITS (Internal Transcribed Spacer) pertencente ao cluster ribossomal (rDNA). Pela análise das sequências da região ITS foi possível identificar 7 géneros de fungos diferentes, sendo eles *Diaporthe*, *Harknessia*, *Discula*, *Arcopilus*, *Epicoccum*, *Neofusicoccum* e *Gnomoniopsis*.

Devido à escassez de estudos do género fúngico *Diaporthe*, relativo a espécies florestais em Portugal, os isolados a ele pertencentes foram submetidos a uma análise multi-locus usando as sequências dos genes que codificam para o fator de alongamento da transcrição 1-alfa (*tef1- α*), β -tubulina (*tub2*), histona (*his3*) e calmodulina (*cal*).

De entre os isolados foram identificadas as espécies *D. rudis*, *D. foeniculina* e *D. malorum*. A análise filogenética multi-locus sugeriu a existência de três potenciais novas espécies. Como tal, procedeu-se à realização de testes de crescimento a diferentes temperaturas e à sua caracterização morfológica, assim como à respetiva descrição taxonómica detalhada.

Desta forma, o presente estudo representa a primeira comprovação da presença de fungos do género *Diaporthe* em eucalipto, pinheiro-bravo e sobreiro, em Portugal. A sua importância, enquanto agentes patogénicos destas espécies de interesse florestal, necessita ser esclarecida em estudos futuros.

keywords

Eucalyptus globulus; eucalyptus; *Pinus pinaster*; maritime pine; *Quercus suber*; cork oak; fungi; *Diaporthe*; identification; taxonomy.

abstract

Forests are very valuable resources from the environmental as well as the economical point of view. Hence, their preservation, study of forest species and overall environment is of utmost importance. One of the threats to those species are disturbances caused by fungi, that cause injuries in the host that can ultimately result in damages in fruits and consequently death. The present study aims to contribute to better knowledge of the pathogenic agents by characterizing fungal isolates found in the following forest species from Portugal: *Eucalyptus globulus*, *Pinus pinaster* and *Quercus suber*.

In this study it was made a characterization of a group of isolates obtained from *Eucalyptus globulus*, *Pinus pinaster* e *Quercus suber*, symptomatic and asymptomatic, with a wide distribution across the country.

Initially, a MSP-PCR typing approach was applied to evaluate the genetic diversity present in the collected isolates. The MSP-PCR profiles obtained were used to generate dendrograms to group isolates with similar profiles. From the dendrograms, 18 representative isolates were selected to undergo initial identification by sequencing the ITS (Internal Transcribed Spacer) region from the ribosomal cluster (rDNA). The ITS analysis resulted in the identification of 7 different genera: *Diaporthe*, *Harknessia*, *Discula*, *Arcopilus*, *Epicoccum*, *Neofusicoccum* and *Gnomoniopsis*.

Diaporthe was the most abundant genus present in the isolates and due to the scarcity of studies regarding this fungal genus in forest species in Portugal, the respective isolates were submitted to a multi-locus analysis using the following genes: translation elongation factor 1-alpha (*tef1- α*), β -tubulin (*tub2*), histone (*his3*) e calmodulin (*cal*).

The species *D. rudis*, *D. foeniculina* and *D. malorum* were identified from among the isolates. The multi-locus phylogenetic analysis suggested the existence of three potential new species. As such, growth tests at different temperatures and morphologic characterizations were performed on the potential new species as well as the respective detailed taxonomic description. The present study represents the first prove of the presence of fungi belonging to the genus *Diaporthe* in eucalyptus, maritime pine and cork oak in Portugal. Their importance as pathogenic agents in forest species needs to be further enlightened in future studies.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Floresta portuguesa.....	1
1.1.1. Eucalipto.....	3
1.1.2. Pinheiro-bravo.....	4
1.1.3. Sobreiro	5
1.2. <i>Diaporthe</i>	6
2. OBJETIVO	8
3. MATERIAIS E MÉTODOS	9
3.1. Recolha das amostras	9
3.2. Isolamento dos fungos	10
3.3. Armazenamento das culturas.....	10
3.4. Extração de DNA.....	10
3.5. Tipagem por MSP-PCR.....	11
3.6. Amplificação dos genes que codificam para as regiões ITS, <i>tef1-α</i> , <i>tub2</i> , <i>his3</i> e <i>cal12</i>	
3.7. Purificação do DNA.....	14
3.8. Sequenciação nucleotídica	15
3.9. Análise filogenética.....	15
3.10. Testes de crescimento.....	16
3.11. Caracterização morfológica.....	16
4. RESULTADOS	17
4.1. Recolha de amostras	17
4.2. Tipagem por MSP-PCR e amplificação de DNA	18
4.3. Caracterização molecular de isolados de <i>Diaporthe</i>	20
4.4. Testes de crescimento.....	29
4.5. Caracterização morfológica	31
5. DISCUSSÃO	36
6. CONCLUSÃO	40

7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	41
8. REFERÊNCIAS.....	42
9. ANEXOS	53
9.1. Preparação de soluções <i>stock</i> para extração de DNA.....	53
9.1.1. Tampão TES	53
9.1.2. NaCl	53
9.1.3. CTAB.....	53
9.1.4. NH ₄ OAc	54
9.1.5. Tampão TE	54
9.2. Preparação de meios	54
9.3. Preparação do gel de agarose	55
9.4. Condições de PCR	56
9.5. Dendrograma.....	57
9.6. Árvore filogenética de espécies <i>Diaporthe</i> com base nas sequências de ITS	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição da área total por espécie (ICNF, 2019)	1
Figura 2 - Pontos de recolha das amostras estudadas.....	9
Figura 3 - Árvore filogenética obtida pelo método de Máxima Verossimilhança usando o modelo Tamura-Nei (TN93+G) do género <i>Diaporthe</i> com base nas sequências <i>ITS</i> , <i>tef1-α</i> , <i>tub2</i> , <i>his3</i> e <i>cal</i>	22
Figura 4 - Curva de crescimento do isolado CAA950 durante 14 dias a diferentes temperaturas.....	29
Figura 5 - Curva de crescimento do isolado CAA953 durante 14 dias a diferentes temperaturas.....	30
Figura 6 - Curva de crescimento do isolado CAA954 durante 14 dias a diferentes temperaturas.....	30
Figura 7 – <i>Diaporthe</i> sp. CAA950. (A) Superfície da cultura no reverso da placa ao 7º dia de crescimento a 25 °C. (B) Superfície da cultura no reverso da placa ao 14º dia de crescimento a 25 °C. (C) Picnídios em ramos de <i>F. vulgare</i> . (D) Conídios alfa (a) e beta (b). Escala: 10 μ m	33
Figura 8 - <i>Diaporthe</i> sp. CAA953. (A) Superfície da cultura no reverso da placa ao 7º dia de crescimento a 15 °C. (B) Superfície da cultura no reverso da placa ao 14º dia de crescimento a 15 °C. (C) Picnídios em ramos de <i>F. vulgare</i> . (D) Conídios beta. Escala: 10 μ m	34
Figura 9 - <i>Diaporthe</i> sp. CAA954. (A) Superfície da cultura no reverso da placa ao 7º dia de crescimento a 25 °C. (B) Superfície da cultura no reverso da placa ao 14º dia de crescimento a 25 °C. (C) Picnídios em ramos de <i>F. vulgare</i> . (D) Conídios alfa. Escala: 10 μ m	35
Figura 10 - Dendrograma dos isolados pelo GelCompar II.....	55
Figura 11 - Árvore filogenética pelo método de Máxima Verossimilhança e modelo Kimura 2-parameter (K2 + G) do género <i>Diaporthe</i> com base nas sequências ITS.....	58

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos <i>primers</i> usados	13
Tabela 2 - Hospedeiros, localizações e sintomas dos isolados estudados inicialmente.....	17
Tabela 3 - Identificação dos isolados, pelo BLAST, através das sequências de ITS.....	19
Tabela 4 - Isolados de <i>Diaporthe</i> usados na análise de sequências multi-locus	21
Tabela 5 - Diferença de nucleótidos entre o isolado CAA950 e <i>D. cynaroidis</i> (CBS122676)	23
Tabela 6 - Diferença de nucleótidos entre o isolado CAA953 e <i>D. malorum</i> (CBS142383)	25
Tabela 7 - Diferença de nucleótidos entre o isolado CAA954 e <i>D. eres</i> (CBS138594).....	27
Tabela 8 - Preparação de TES	53
Tabela 9 - Preparação de NaCl	53
Tabela 10 - Preparação de CTAB	53
Tabela 11 - Preparação de NH ₄ OAc.....	54
Tabela 12 - Preparação de tampão TE	54
Tabela 13 - Preparação de meio PDA.....	54
Tabela 14 - Preparação de meio PDA para esporular	55
Tabela 15 - Preparação de meio com antibiótico	55
Tabela 16 - Preparação do gel de agarose	55
Tabela 17 - Temperatura de emparelhamento, número de ciclos e respectivos primers usados no PCR para cada isolado <i>Diaporthe</i>	56

LISTA DE ABREVIATURAS

PDA – *Potato Dextrose Agar*

TES – Tris-EDTA-SDS

SDS – Dodecil sulfato de sódio

CTAB – Brometo de Cetiltrimetilamónio

TE – Tris-EDTA

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

Tris – Trisaminometano

TAE – Tris Acetato EDTA

1. INTRODUÇÃO

1.1. Floresta portuguesa

A floresta constitui um dos mais valiosos patrimónios do nosso país e ocupa cerca de 3,3 milhões de hectares, traduzindo-se assim em 36 % do uso de solo em Portugal (ICNF, 2019).

As espécies mais frequentes, tal como ilustrado na figura 1, são *Eucalyptus globulus* (eucalipto), *Pinus pinaster* (pinheiro-bravo) e *Quercus suber* (sobreiro). Com uma presença ainda que mais reduzida, também é possível observar na floresta portuguesa as seguintes espécies: *Quercus ilex* (azinheira), *Pinus pinea* (pinheiro-manso), *Quercus faginea* (carvalho) e *Castanea sativa* (castanheiro) (ICNF, 2019).

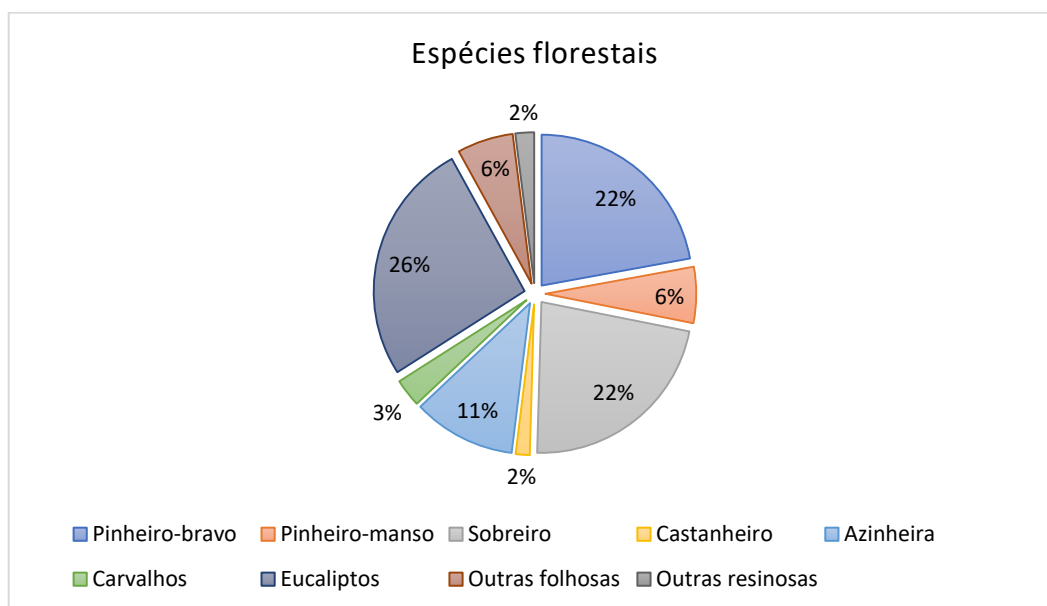


Figura 1- Distribuição da área total por espécie (ICNF, 2019)

As espécies florestais anteriormente referidas representam, pelos produtos florestais lenhosos e não lenhosos que se podem extrair delas, uma importante fonte de

rendimentos, refletindo-se anualmente em cerca de 2,5 % do Produto Interno Bruto em Portugal (ICNF, 2017). É sabido que os produtos florestais lenhosos despertam um primordial interesse face ao elevado nível económico que se consegue extrair da sua exploração, sendo que, cerca de 220 mil hectares da floresta estão a cargo de indústrias de pasta de papel. E ainda, em aproximadamente 1 milhão hectares prevalecem árvores autóctones, como o sobreiro, conhecido como “mina” de onde provém mais de metade da produção mundial de cortiça. De igual forma, a produção de madeira, através da exploração da plantação do pinheiro-bravo representa uma parcela importante na receita de algumas empresas (ICNF, 2013).

Analisando noutra perspetiva, das florestas consegue-se ainda extrair uma grande diversidade de produtos florestais não lenhosos, tais como exemplo o mel, a forragem animal, os frutos, as ervas medicinais e os cogumelos, desempenhando igualmente, desta forma, um importante contributo económico (Croitoru, 2007). Além do exposto contribui ainda para o bem-estar das populações.

Nos últimos anos tem sido possível observar um aumento da área florestal muito devido ao investimento privado, aos programas de incentivo público de arborização em terrenos públicos e privados e à regeneração natural da própria floresta (ICNF, 2013). É importante referir que 92 % dos terrenos são constituídos por propriedades privadas e, muitas delas, de pequena escala, dificultando então a gestão das florestas e a implementação de políticas florestais (ICNF, 2017).

Muitas das perturbações encontradas nos ecossistemas florestais devem-se a fatores bióticos e abióticos. A forte influência dos fatores abióticos, como a temperatura e a precipitação, no desenvolvimento, na reprodução e na sobrevivência dos agentes bióticos, tende a afetar as populações existentes. Os cenários climáticos previstos para Portugal antecipam a diminuição de precipitação nos períodos de primavera, verão e outono e o aumento das temperaturas mínimas e máximas em todas as estações, consequentemente, prevê-se desta forma, um maior impacto dos patógenos florestais no futuro (Wingfield *et al.*, 2015; Soares *et al.*, 2017; Cardoso *et al.*, 2019).

Porém, também erros humanos podem ter consequências nocivas para a floresta, não só pelas consequências resultantes dos incêndios que tantas vezes assolam a floresta

portuguesa, como também pelo aumento da temperatura e escassez de água, causando assim um desequilíbrio dos recursos hídricos disponíveis (Pessoa et al., 2014). Estas secas a que as espécies florestais se encontram sujeitas poderão ser demasiado prolongadas e rigorosas, tornando-as ainda mais suscetíveis a insetos, pragas e fungos (Hanson & Weltzin, 2000).

1.1.1. Eucalipto

Pertencente à família das *Myrtaceae* e contendo mais de 800 espécies, o eucalipto (*Eucalyptus* spp.) com o avançar do tempo tem sido difundido fora da sua área nativa na Austrália. Introduzido no sul da Europa em meados do século XIX, atualmente encontra-se plantado em quase todas as partes do mundo (Alves et al., 2007a). Tomando como exemplo a espécie *Eucalyptus globulus*, uma das espécies de maior importância para a indústria de celulose onde, na Europa, a Península Ibérica detém mais de 80 % de 1,3 milhões de hectares florestais desta espécie (Catry et al., 2013; Cerasoli et al., 2016).

Muito usada para fins industriais, esta árvore demonstra ótima adaptação ao clima mediterrânico, visto que o fornecimento limitado de água e os nutrientes são os fatores limitantes com maior relevância para o desenvolvimento da espécie (Araújo et al., 1989).

Eucalyptus globulus é considerada uma espécie de crescimento rápido e com capacidades de criar caules após o corte a partir da base do seu tronco, possibilitando três a quatro cortes com períodos de, aproximadamente, 12 anos (Alves et al., 2007a).

Embora sejam consideradas árvores resistentes com grande capacidade de rebrotar, estas são vulneráveis a fungos patogénicos, sendo estes a maior causa de doenças nesta espécie (Alves et al., 2007a). O género *Teratosphaeria*, nomeadamente as espécies *T. gauchensis* e *T. zuluensis*, são exemplos de agentes patogénicos encontrados nesta espécie florestal, provocando sintomas como manchas foliares e cancro (Alves et al., 2007a; Crous et al., 2009; Aylward et al., 2019). Também *Neofusicoccum eucalyptorum*, *N. australe*, *Diplodia corticola* e *D. seriata* são espécies associadas ao eucalipto, sendo que as

espécies supracitadas de *Diplodia* foram detetadas em eucalipto pela primeira vez em Portugal (Barradas *et al.*, 2016).

O primeiro relato de *Mycosphaerella* em eucalipto fora da Austrália ocorreu, curiosamente, em Portugal com a descrição da espécie *M. molleriana* e, posteriormente a esta, outras onze espécies foram encontradas em Portugal, sendo estas *Teratosphaeria africana*, *Mycosphaerella walkeri*, *M. madeirae*, *M. communis*, *M. heimii*, *M. lateralis*, *M. marksii*, *T. nubilosa*, *T. parva*, *M. grandis* e *M. vespa* (Crous, 1998; Crous *et al.*, 2004a; Crous *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2009).

1.1.2. Pinheiro-bravo

Pinus pinaster é a espécie, pertencente ao género *Pinus* e à família *Pinaceae*, mais importante em Portugal, tanto a nível de área com mais de 714 mil hectares, como também a nível económico (Branco *et al.*, 2014). Segundo Loustau *et al.* (1995), a principal origem geográfica de *Pinus pinaster* foi registada na região mediterrânica, no entanto este facto é contestado por muitos alegando que a espécie foi introduzida em Portugal, tomando-a como uma espécie não-nativa (Santos & Almeida, 2007).

Desta espécie deriva matéria prima para fins industriais, diversos produtos como madeira manufaturada, paletes, resinas e tábuas, resultando daí uma receita de um total aproximado de 306 milhões de euros pelas exportações destes mesmos produtos (Mendes *et al.*, 2004).

Pinus pinaster apresenta resistência a solos pobres, contudo necessita de alguma luz e suporta mal os frios intensos. Relativamente ao seu tempo de vida, esta espécie pode atingir os 200 anos de vida, embora frequentemente atinja apenas entre 80 a 100 anos (Oliveira *et al.*, 1999).

As árvores desta espécie podem ser afetadas por insetos e nematodes, tais como, *Hylobius abietis* e *Bursaphelenchus xylophilus*, evidenciando como sintoma mais comum a descoloração das agulhas (Mota *et al.*, 1999; Zas *et al.*, 2005; Tóth, 2011). Este último, é o principal agente causador da doença da murchidão do pinheiro (*Pine Wilt Disease* – PWD)

que representa, para além do dano económico, um considerável dano ambiental resultando em perdas irreversíveis nos ecossistemas florestais e, conseqüentemente, na perda de biodiversidade (Mota *et al.*, 1999; Vicente *et al.*, 2012).

O cancro resinoso do pinheiro, possivelmente a doença mais destrutiva, é causado pelo fungo *Fusarium circinatum*, infectando os hospedeiros independentemente dos seus tempos de vida (Branco *et al.*, 2014). Este fungo é facilmente disseminado pelo vento, chuva, insetos e seres humanos (Martín-García *et al.*, 2019). Em Portugal têm sido tomadas medidas com intuito de evitar a propagação de *F. circinatum*, como a destruição de todos os lotes de plantas contaminadas e um controlo mais intensivo dos locais contaminados até às áreas circundantes, inclusive foi elaborado um plano de ação que visa a prospeção e erradicação de *F. circinatum* até 2020 (ICNF, 2018).

1.1.3. Sobreiro

Da família *Fagaceae* e de género *Quercus*, o sobreiro (*Quercus suber*) é conhecido pela sua produção de cortiça e é em território português que subsiste a maior extensão desta espécie no mundo (Silva & Catry, 2006). *Quercus suber* teve origem no Sul da Europa e Norte de África e é descrita como uma espécie de longa durabilidade, compreendida entre 200 e 250 anos (Varela, 2000; Gil & Varela, 2008).

Nas últimas três décadas tem sido registado um declínio de vigor no sobreiro devido a secas, às temperaturas altas, ao enfraquecimento da fertilidade dos solos e, ainda, a doenças e pragas (Branco *et al.*, 2014).

Em Portugal são diversas as doenças que podem comprometer esta espécie provocadas, por exemplo, por microrganismos oomicetes do género *Phytophthora*, nomeadamente *P. cinnamomi*, por fungos do género *Diplodia*, como *Diplodia corticola*, *D. quercivora* ou até do fungo *Biscogniauxia mediterranea* (Alves *et al.*, 2004; Branco *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2017; Smahi *et al.*, 2017).

Phytophthora cinnamomi foi considerado, durante muito tempo, como o principal agente patogénico dos sobreiros em Portugal, responsável pela mortalidade, afetando as

raízes e reduzindo a capacidade da árvore adquirir nutrientes e água, levando os sintomas a se assemelharem aos daqueles causados por seca (Moreira *et al.*, 2006; Branco *et al.*, 2014).

1.2. *Diaporthe*

O género *Diaporthe* pertence ao filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, classe Sordariomycetes e ordem Diaporthales (Milagres *et al.*, 2018).

As espécies de *Diaporthe* são predominantemente encontradas nos hospedeiros em regiões temperadas e tropicais (Udayanga *et al.*, 2011). São relatados como importantes patógenos, saprófitos e endófitos encontrados numa vasta gama de hospedeiros vegetais, como culturas agrícolas, árvores florestais e plantas ornamentais, incluindo hospedeiros de importância económica (Gomes *et al.*, 2013; Guarnaccia *et al.*, 2018). Nestes hospedeiros, estes fungos apresentam grande capacidade de causar podridão da raiz e da fruta, manchas foliares, cancos e, até mesmo, a morte (Santos *et al.*, 2017a; Milagres *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2018).

No ano de 1870, o género *Diaporthe* (ou *Phomopsis*, o seu estado assexuado) foi estabelecido por Nitschke (Wehmeyer, 1933). Originalmente, os critérios de identificação de espécies deste género baseavam-se na morfologia, nas características de cultura e na sua associação aos hospedeiros (Farr *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2014; Dissanayake *et al.*, 2017).

O hospedeiro é atualmente reconhecido como de menor importância no conceito de espécie, dado que espécies de *Diaporthe* têm a capacidade de infetar diversos hospedeiros, independentemente de estarem, ou não, relacionados taxonomicamente (Rehner & Uecker, 1994; Santos *et al.*, 2011).

A atribuição incorreta das espécies tem efeitos negativos no estudo do género, uma vez que a identificação exata das espécies é fundamental para o conhecimento da epidemiologia, para o controlo de doenças de plantas e para orientação de implementação de medidas fitossanitárias internacionais (Santos *et al.*, 2017b).

Atualmente pode afirmar-se que o estudo fundamentado apenas nos referidos procedimentos tradicionais não foram, de todo, os mais apropriados e seguros. Como consequência da adoção destes métodos, existe atualmente um elevado número de espécies propostas do género *Diaporthe* disponíveis no *Index Fungorum* (1072 e 989 para *Diaporthe* e *Phomopsis*, respetivamente) (<http://www.indexfungorum.org>, acedido a 22 de outubro de 2019).

A região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do *cluster* ribossomal foi formalmente proposta como *barcode* para identificação de fungos (Schoch *et al.*, 2012). Porém, eventuais mutações na sequência dos genes ribossomais e a existência de sequências idênticas de rDNA entre espécies com genomas diferentes pode conduzir a uma identificação incorreta (Santos *et al.*, 2017b). Estudos posteriores indicam até que para análise de *locus* único no género *Diaporthe*, o fator de alongamento da transcrição 1-alfa (*tef1- α*) será o melhor *locus* único como *barcode* fúngico (Santos *et al.*, 2017b).

De forma a solucionar esta problemática existente em redor da delimitação das espécies em *Diaporthe*, Santos *et al.* (2017b) comprovam que o uso de um conjunto de dados moleculares é a combinação ideal e mais segura para reavaliar a delimitação destas com maior resolução. Os estudos moleculares mais eficazes na delimitação de espécies de *Diaporthe* incluem as sequências dos *loci* ITS, fator de alongamento da transcrição 1-alfa (*tef1- α*), β -tubulina (*tub2*), histona (*his3*) e calmodulina (*cal*) (Udayanga *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2017a; Santos *et al.*, 2017b; Yang *et al.*, 2018).



2. OBJETIVO

Num estudo anterior em eucaliptos, pinheiros-bravos e sobreiros em Portugal continental, assintomáticos ou com necroses possivelmente associadas a espécies de Botryosphaeriaceae, foi obtido um conjunto de isolados que ocorreram regularmente em associação com espécies de Botryosphaeriaceae. O presente estudo teve como objetivo principal caracterizar esse conjunto de isolados. Adicionalmente este estudo focou, em particular, fungos pertencentes ao género *Diaporthe*, género este que está pouco estudado nos referidos hospedeiros em Portugal. Estes isolados foram caracterizados molecular e morfológicamente, evidenciado numa análise filogenética multi-*locus* e em estudos morfológicos, por testes de crescimento e observações de características micromorfológicas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Recolha das amostras

As 47 amostras de onde foram obtidos os isolados do presente estudo integram parte da colheita de vasta amostragem de um projeto de doutoramento realizado no Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

A recolha das amostras efetivada entre março e junho de 2018 foi realizada em plantações de *Eucalyptus globulus*, *Pinus pinaster* e *Quercus suber* distribuídas pelos distritos de Viana do Castelo, Bragança, Braga, Porto, Aveiro, Castelo Branco, Santarém, Setúbal, Évora, Beja e Faro, como mostra a figura 2. As amostras representavam cortes de ramos com, aproximadamente, 5 mm e após recolhidas foram guardadas a temperatura ambiente por 2 dias até serem inoculadas em meio PDA.

As localizações foram selecionadas de forma variável e, na sua maioria foram obtidos de hospedeiros que apresentavam sintomas de necroses nos ramos e nos troncos.

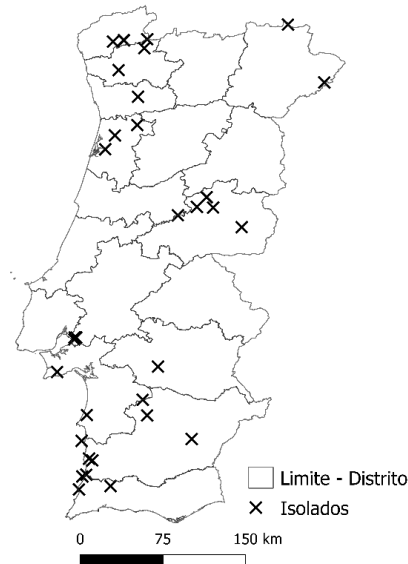


Figura 2 - Pontos de recolha das amostras estudadas

3.2. Isolamento dos fungos

O material vegetal foi colocado em hipoclorito de sódio a 5%, etanol a 96% e, por último, água estéril por um minuto cada, de modo a ser eficazmente esterilizado. Posteriormente a todos os processos de assepsia, foram colocados dois a cinco fragmentos de 5-10 mm em placas de Petri com meio PDA (Merck, Alemanha) e incubadas a 25 °C durante 7 dias.

As colónias de fungos foram repicadas até serem obtidos isolados com apenas um determinado tipo de morfologia. Assim, quando estabelecidas as culturas puras, estas foram cultivadas em placas de Petri contendo meio PDA (Merck, Alemanha) e incubadas durante 7 dias, a 25 °C.

Sempre que necessário, de forma a evitar contaminação bacteriana, os isolados foram cultivados em meio PDA com estreptomicina e tetraciclina (10 mg/mL) adicionados.

3.3. Armazenamento das culturas

Para armazenar as culturas já isoladas foram retirados cinco discos de micélio (5 mm de diâmetro) das colónias, transferidos para microtubos de 1,5 mL, contendo 800 µL de glicerol a 15 % e, após manter os microtubos à temperatura ambiente durante 24 horas foram, então, guardados a - 80 °C.

3.4. Extração de DNA

Após o cultivo em placas, foram retirados fragmentos de micélio e posteriormente colocados em microtubos com 500 µL de TES e armazenados a - 80 °C, para se poder proceder à extração de DNA. Para extração de DNA genómico dos fungos em estudo foi seguido de acordo com o protocolo de Möller (1992) com algumas modificações. O micélio foi transferido para os microtubos de 2 mL juntamente com 500 µL de TES. As amostras

foram agitadas e aquecidas a 100 °C durante 3 minutos e colocadas em gelo por 10 minutos. Posteriormente foi adicionado 10 µL de proteínase K (20 mg/mL) a cada amostra e incubadas a 65 °C durante 30 minutos. Decorrido este tempo foi adicionado 140 µL 5 M NaCl e 65 µL 10 % CTAB e, de seguida, procedeu-se a nova incubação a 65 °C durante 30 minutos. Adicionou-se 1 mL de clorofórmio e voltaram a incubar-se as amostras por 30 minutos em gelo. Posto isto, as amostras foram centrifugadas a 12 000 rpm, durante 10 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1.5 mL e adicionado 225 µL 5 M NH₄OAc com seguinte agitação e incubadas, de novo, em gelo com a mesma duração. Foram novamente centrifugadas a 12 000 rpm, durante 10 minutos a 4 °C e transferido o sobrenadante para novos microtubos. Após adição de 500 µL de isopropanol, foram incubadas em gelo por 30 minutos e após este tempo foram centrifugadas a 12 000 rpm durante 10 minutos, a 4 °C. Por último, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas, por duas vezes, com 1 mL de etanol 76 %, centrifugadas nas mesmas condições anteriores e descartados os sobrenadantes.

Os pellets de DNA, depois de secos, foram dissolvidos com 50 µL de TE e, de seguida, conservados a -20 °C.

3.5. Tipagem por MSP-PCR

As reações de MSP-PCR foram realizadas numa mistura contendo 15,75 µL de água ultrapura estéril, 6,25 µL de NZYTaQ 2x Green Master Mix (2,5 mM MgCl₂; 200 µM dNTPs; 0,2 U/µL DNA polimerase; NZYtechTM, Portugal) e 2 µL de *primer* (GTG)₅ e 1 µL de DNA. Após este procedimento, foram então introduzidos no termociclador BIO-RAD C1000 touchTM Thermal Cycler (EUA), cumprindo os seguintes parâmetros relativos ao *primer* (GTG)₅: uma desnaturação inicial a 95 °C durante 5 minutos; 29 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, *annealing* a 53 °C durante 1 minuto e a extensão por 72 °C durante 1 minuto e 30 segundos; por último, é terminada a amplificação com um alongamento final de 72 °C por 10 minutos (Alves *et al.*, 2007b).

Após o DNA amplificado, os produtos de PCR foram observados num gel de agarose 1,5 % imerso em tampão TAE 1X, carregado com 1 µL de marcador GeneRuler™ DNA Ladder Mix e 5 µL do produto de PCR. As condições para a separação por eletroforese foram a 80 V por 2 horas e 45 minutos. Posteriormente, o gel foi submerso numa solução de brometo de etídio por 20 minutos e, por último, lavado em água destilada durante 1 hora.

Os géis de agarose foram visualizados sob luz UV e a aquisição de imagem foi realizada utilizando o sistema GELDOC XR + (Bio-Rad, EUA).

Os perfis foram analisados e os isolados foram agrupados num dendrograma feito com o *software* GelCompar II (Applied Maths), calculado pelo coeficiente de Pearson, onde a reprodutibilidade foi calculada pela média das percentagens das semelhanças entre os isolados (ver anexo).

3.6. Amplificação dos genes que codificam para as regiões ITS, *tef1-α*, *tub2*, *his3* e *cal*

Após análise do dendrograma, selecionaram-se 18 isolados de DNA representativos que foram sujeitos a uma amplificação da região ITS. Para tal, a reação foi preparada contendo 15,75 µL de água ultrapura estéril, 6,25 µL de NZYtaq 2x Green Master Mix (2,5 mM MgCl₂; 200 µM dNTPs; 0,2 U/µL DNA polimerase; NZYtech™, Portugal), 1 µL de ITS5 (10 pmol/µl) e 1 µL de NL4 (10 pmol/µl) (White *et al.*, 1990; Vilgalys & Hester, 1990).

Os parâmetros definidos resumem-se em desnaturação inicial feita por 5 minutos, seguido de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, temperatura de emparelhamento de 50 °C, igualmente por 30 segundos, e extensão a 72 °C durante 1 minuto e 30 segundos. Por fim, o alongamento final realizado a 72 °C durante 10 minutos.

Quando amplificados foram observados em gel de agarose a 1,5 % em tampão TAE 1X. O primeiro poço de cada gel foi carregado com 1 µL de marcador GeneRuler™ DNA Ladder Mix (ThermoScientific, EUA) e os restantes poços com 5 µL do produto de PCR. As condições para a separação por eletroforese foram a 80 V por 1 hora. Posteriormente, o

gel foi submerso numa solução de brometo de etídio a 0,5 µg/mL por 5 minutos e, por último, lavado em água destilada durante 15 minutos.

Posteriormente foi feita uma seleção de 8 isolados, sendo eles correspondentes ao género *Diaporthe* do total dos 18 isolados anteriormente referidos. Para estes isolados foram realizadas amplificações dos genes que codificam para as regiões *tef1-α*, *tub2*, *his3* e *cal*. O gene *tef1-α* foi amplificado utilizando o conjunto de *primers* EF-728F/EF-986R (Alves *et al.*, 2008). Para o gene *tub2* foram usados os *primers* Bt2a/Bt2b (Glass & Donaldson, 1995; O'Donnell & Cigelnik, 1997). Relativamente ao gene *his3* os *primers* usados foram CYCH3F/H3-1BR (Glass & Donaldson, 1995; Crous *et al.*, 2004) e, por último, os *primers* CAL-228F/CAL-737R foram usados para amplificar o gene *cal* (Carbone & Kohn, 1999). Na tabela 1 estão descritas as sequências dos *primers* usados.

Tabela 1 - Sequência dos *primers* usados

Locus	Primer	Sequência 5'-3'
ITS	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
	NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG
<i>tef1-α</i>	EF-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG
	EF-986R	TACTTGAAGGAACCCTTACC
<i>tub2</i>	Bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTT
	Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC
<i>his3</i>	CYCH3F	AGGTCCACTGGTGGCAAG
	H3-1B	GCGGGCGCGAGCTGGATGTCCTT
<i>cal</i>	228F	GAGTTCAAGGAGGCCTTCTCCC
	737R	CATCTTTCTGGCCATCATGG

Para iniciar a amplificação, a desnaturação inicial a 95 °C é feita durante 5 minutos, seguindo-se a desnaturação a 94 °C por 30 segundos, as temperaturas de emparelhamento foram realizadas por 30 segundos entre 48 °C e 60 °C, a depender de cada isolado, e com números de ciclos a variar entre 30 e 35, passando por uma extensão a 72 °C durante 1

minuto e, finalizado por um alongamento a 72 °C com duração de 10 minutos (ver em anexo) (O'Donnell & Cigelnik, 1997; Alves *et al.*, 2007b; Alves *et al.*, 2008).

Posteriormente, através de eletroforese, os produtos foram separados em gel de agarose a 1,5 %, por 1 hora a 80 V usando como marcador GeneRuler DNA Ladder Mix, (ThermoScientific, EUA). Os géis, depois de corados em solução de brometo de etídio a 0,5 µg/mL por 5 minutos e pousados em água durante 15 minutos, foram visualizados sob luz UV e a aquisição de imagem realizada utilizando o sistema GELDOC XR + (Bio-Rad, EUA).

3.7. Purificação do DNA

De forma a obter-se os produtos puros da amplificação, procedeu-se à purificação do DNA, eliminando todos os constituintes da reação de amplificação. A purificação das amostras nos tubos recorreu-se ao kit NZYGelPure™, (Nzytech, Portugal), onde ao volume das reações foi-lhe adicionado uma quantidade 5 vezes superior a esse mesmo volume com *Binding Buffer* e, de imediato, centrifugadas. De seguida, foram transferidos 120 µL de cada mistura para cada coluna NZYTech e centrifugadas durante 1 minuto, com posterior sobrenadante descartado. Foram, ainda, acrescentados 600 µL de *Wash Buffer* e, de novo, centrifugadas por 2 vezes com igual duração à anterior e descartado o sobrenadante.

As colunas foram movidas para novos microtubos e adicionados 25 µL de água ultrapura estéril direcionada ao centro da coluna. Com fim a eluir o DNA, foram novamente centrifugadas em duplicado e, por último, foram adicionados 3 µL de água ultrapura estéril, 3 µL de *primer* específico a cada gene e 6 µL de DNA.

No final deste processo, as amostras depois de purificadas foram armazenadas a -20 °C.

3.8. Sequenciação nucleotídica

Com vista à obtenção das sequências nucleotídicas dos produtos de amplificação das regiões de ITS, fator de alongamento, β -tubulina, histona e calmodulina, as amostras em estudo, depois de purificadas, foram remetidas para a empresa *GATC Biotech*, na Alemanha.

3.9. Análise filogenética

As sequências nucleotídicas foram visualizadas e editadas de forma a obterem-se sequências completas dos isolados através do software FinchTV 1.4.0 e foi efetuada uma primeira análise de comparação de identidade na base de dados de sequências depositadas no GenBank, utilizando a ferramenta BLAST.

Todas as sequências comparadas nesta análise do género *Diaporthe*, tinham sequências disponíveis para os cinco *loci* e foram alinhadas com ClustalX v.2.0, de acordo com os parâmetros seguintes: “*Pairwise alignment parameters*” (*gap opening* = 10; *gap extension* = 0,1) e “*Multiple alignment parameters*” (*gap opening* = 10; *gap extension* = 0,2, *transition weight* = 0,5, *delay divergent sequences* = 25 %) (Thompson *et al.*, 1997).

O alinhamento foi editado e as sequências foram concatenadas recorrendo-se ao software SequenceMatrix e, por fim, utilizou-se o programa MEGA X com vista à obtenção de uma árvore filogenética pelo método de Máxima Verosimilhança (*Maximum Likelihood* (ML)). O programa MEGA X foi também utilizado para selecionar qual o modelo de evolução de DNA a usar na análise ML. Para avaliar a robustez da árvore filogenética gerada foram realizadas 1000 réplicas de *bootstrap*. Nesta análise foi usado como *outgroup* a espécie *Diaporthella corylina* (CBS 121124) (Vaidya *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2017a; Kumar *et al.*, 2018).

3.10. Testes de crescimento

Após a seleção dos isolados representando potenciais novas espécies de *Diaporthe*, foram inoculados em placas de Petri com meio PDA e incubadas a 25 °C até a colônia preencher toda a placa. Dessas culturas foram retirados discos de cada isolado de 0,5 cm de diâmetro e colocados no centro de placas de Petri contendo meio PDA.

Para cada isolado foram preparadas três réplicas em placas de Petri com meio PDA e incubadas a oito temperaturas diferentes (5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C e 40 °C). Os diâmetros de crescimento das colônias foram todos calculados com a mesma régua, em duas direções perpendiculares entre si, por um período de 14 dias.

3.11. Caracterização morfológica

Os isolados foram cultivados em meios PDA a $\frac{1}{2}$ e a $\frac{1}{4}$ e, ainda, em meio TWA (*Tap Water Agar*) com ramos de *Foeniculum vulgare* (autoclavado a 121 °C, 20 minutos, 1 bar) adicionados em cada placa para induzir à esporulação (Santos & Philips, 2009). As placas de Petri com as culturas foram seladas com Parafilm® e preservadas à temperatura ambiente por 1 mês. Para estes diferentes meios foram aplicadas diferentes exposições à temperatura ambiente. Os isolados receberam exposições solares indiretas e também foram submetidos a luz UV.

Os picnídios foram transferidos para uma lâmina de microscópio sob uma gota de água estéril e fixados com ácido láctico a 100%, com vista à observação dos caracteres micromorfológicos dos conídios, tais como o tamanho, a forma e a cor.

4. RESULTADOS

4.1. Recolha de amostras

Dos 47 isolados, 15 foram obtidos de *Eucalyptus globulus*, 9 de *Pinus pinaster* e os restantes 23 de *Quercus suber*. Estes foram obtidos a partir de ramos das três espécies florestais referidas, sintomáticas e assintomáticas (Tabela 2).

Tabela 2 - Hospedeiros, localizações e sintomas dos isolados estudados inicialmente

Isolado	Hospedeiro	Localização	Sintoma
15 β	<i>Eucalyptus globulus</i>	Fermelã	Necrose
21 β	<i>Eucalyptus globulus</i>	Oliveira de Azeméis	Necrose
29 β	<i>Eucalyptus globulus</i>	Gamarão de Baixo, Arouca	Necrose
87 α	<i>Eucalyptus globulus</i>	Picote, Miranda do Douro	Necrose
178 α	<i>Eucalyptus globulus</i>	Idanha a Nova	Necrose
237 β	<i>Eucalyptus globulus</i>	Samora Correia	Sem sintomas
256 β	<i>Eucalyptus globulus</i>	Samora Correia	Necrose
290 β	<i>Eucalyptus globulus</i>	Odivelas	Sem sintomas
293 α	<i>Eucalyptus globulus</i>	Ferreira do Alentejo	Necrose
368 α	<i>Eucalyptus globulus</i>	Vila Nova de Milfontes	Sem sintomas
406 α	<i>Eucalyptus globulus</i>	Odeceixe	Necrose
CAA950	<i>Eucalyptus globulus</i>	Gamarão de Baixo	Sem sintomas
CAA951	<i>Eucalyptus globulus</i>	Monte, Penafiel	Necrose
CAA952	<i>Eucalyptus globulus</i>	Esporões	Necrose
CAA953	<i>Eucalyptus globulus</i>	Simões, Ponte da Barca	Necrose
47 γ	<i>Pinus pinaster</i>	Touvedo, Salvador	Sem sintomas
58 α	<i>Pinus pinaster</i>	Gerês, Terras de Bouro	Necrose
119 α	<i>Pinus pinaster</i>	Tordosendo	Necrose
135 α	<i>Pinus pinaster</i>	Teixugas, Fundão	Sem sintomas
137 β	<i>Pinus pinaster</i>	Lavacolhos, Silvaes	Sem sintomas
265 α	<i>Pinus pinaster</i>	Casais da Serra, Setúbal	Sem sintomas
CAA949	<i>Pinus pinaster</i>	Fermelã	Sem sintomas

Tabela 2 - Hospedeiros, localizações e sintomas dos isolados estudados inicialmente (continuação)

CAA954	<i>Pinus pinaster</i>	Campo do Gerês	Sem sintomas
CAA956	<i>Pinus pinaster</i>	Janeiro de Baixo	Sem sintomas
50 α	<i>Quercus suber</i>	Grouro, Ponte da Barca	Sem sintomas
75 α	<i>Quercus suber</i>	Montesinho, Bragança	Necrose
242 β	<i>Quercus suber</i>	Samora Correia	Sem sintoma
244 β	<i>Quercus suber</i>	Samora Correia	Necrose
264 α	<i>Quercus suber</i>	Casais da Serra, Setúbal	Sem sintomas
309 β	<i>Quercus suber</i>	Mértola	Sem sintomas
331 α	<i>Quercus suber</i>	Valverde, Évora	Sem sintomas
356 β	<i>Quercus suber</i>	Santiago do Cacém	Necrose
374 α	<i>Quercus suber</i>	Vila Nova de Milfontes	Sem sintomas
374 β	<i>Quercus suber</i>	Vila Nova de Milfontes	Sem sintomas
375 δ	<i>Quercus suber</i>	Vila Nova de Milfontes	Necrose
384 β	<i>Quercus suber</i>	São Luís, Odemira	Necrose
384 γ	<i>Quercus suber</i>	São Luís, Odemira	Necrose
392 α	<i>Quercus suber</i>	Caçapeira, Odemira	Necrose
400 α	<i>Quercus suber</i>	São Miguel, Odeceixe	Sem sintomas
404 α	<i>Quercus suber</i>	Odeceixe	Sem sintomas
410 α	<i>Quercus suber</i>	Aljezur	Sem sintomas
411 α	<i>Quercus suber</i>	Aljezur	Necrose
413 α	<i>Quercus suber</i>	Aljezur	Necrose
427 β	<i>Quercus suber</i>	Alto de Baixo, Alferce	Necrose
428 α	<i>Quercus suber</i>	Alto de Baixo, Alferce	Necrose
429 α	<i>Quercus suber</i>	Alto de Baixo, Alferce	Necrose
CAA955	<i>Quercus suber</i>	Tordosendo	Necrose

4.2. Tipagem por MSP-PCR e amplificação de DNA

Pela interpretação dos resultados apresentados no dendrograma (ver em anexo) e observação de semelhanças entre perfis, foram selecionados 18 isolados representativos

para amplificação da região ITS, visando à determinação do gênero e da espécie a que estes pertenciam, quando possível. Relativamente aos isolados CAA953, CAA952, CAA956, CAA949, CAA954, CAA955, CAA951 e CAA950, estes foram identificados como membros do gênero *Diaporthe*. Por sua vez, as sequências dos isolados 178 α , 384 γ , 309 β , 47 γ , 29 β e 119 β mostraram elevadas similaridades com espécies pertencentes aos gêneros *Harknessia*, *Discula*, *Arcopilus*, *Epicoccum* e *Neofusicoccum*, respetivamente, como mostra a tabela 3.

Após a primeira identificação pela percentagem de identidades entre as sequências no BLAST, conclui-se que determinados isolados do gênero *Diaporthe* não apresentavam percentagem máxima de identidade quando comparadas a sequências já depositadas no GenBank.

Posto isto, os isolados foram selecionados para uma posterior caracterização mais pormenorizada, baseada numa análise filogenética multi-*locus* e, também, em estudos morfológicos.

Tabela 3 - Identificação dos isolados, pelo BLAST, através das sequências de ITS

Código	Espécie	Identidade (%)	Hospedeiro
119 α	<i>Neofusicoccum eucalyptorum</i> (CAA714)	100 %	<i>Pinus pinaster</i>
178 α	<i>Harknessia eucalyptorum</i> (CBS 113620)	99,50 %	<i>Eucalyptus globulus</i>
29 β	<i>Harknessia gibbosa</i> (CBS 120033)	99,67 %	<i>Eucalyptus globulus</i>
47 γ	<i>Epicoccum nigrum</i> (CBS 239.59)	100 %	<i>Pinus pinaster</i>
309 β	<i>Arcopilus aureus</i> (CBS 538.73)	100 %	<i>Quercus suber</i>
356 β	<i>Gnomoniopsis paraclavulata</i> (CBS 121912)	100 %	<i>Quercus suber</i>
384 γ	<i>Discula quercina</i> (CBS 115921)	100 %	<i>Quercus suber</i>
400 α	<i>G. paraclavulata</i> (CBS 121912)	100 %	<i>Quercus suber</i>
406 α	<i>G. paraclavulata</i> (CBS 121912)	99,62 %	<i>Eucalyptus globulus</i>
427 β	<i>G. paraclavulata</i> (CBS 121912)	100 %	<i>Quercus suber</i>
CAA949	<i>Diaporthe rudis</i> (CBS 113201)	100 %	<i>Pinus pinaster</i>
CAA950	<i>D. rudis</i> (CBS 143346)	97,92 %	<i>Eucalyptus globulus</i>

Tabela 3 - Identificação dos isolados, pelo BLAST, através das sequências de ITS (continuação)

CAA951	<i>D. malorum</i> (CAA735)	100 %	<i>Eucalyptus globulus</i>
CAA952	<i>D. rudis</i> (CBS 113201)	100 %	<i>Eucalyptus globulus</i>
CAA953	<i>D. passiflorae</i> (CAA735)	100 %	<i>Eucalyptus globulus</i>
CAA954	<i>D. eres</i> (UCCE1004B)	99 %	<i>Pinus pinaster</i>
CAA955	<i>D. foeniculina</i> (CBS 111554)	100 %	<i>Quercus suber</i>
CAA956	<i>D. rudis</i> (CBS 113201)	100 %	<i>Pinus pinaster</i>

4.3. Caracterização molecular de isolados de *Diaporthe*

Para todos os isolados de *Diaporthe* foram sequenciados os genes que codificam para o fator de alongamento de transcrição 1-alfa (*tef1- α*), β -tubulina (*tub2*), histona (*his3*) e calmodulina (*cal*), com elevado poder discriminatório para espécies do género *Diaporthe* (Santos *et al.*, 2017b).

Foi posteriormente realizada uma análise filogenética onde foram introduzidas todas as sequências dos isolados do género *Diaporthe* que se encontravam disponíveis para os 5 *loci* (tabela 4).

Na figura 3 está apresentada, de forma resumida pela extensa dimensão, a árvore da análise filogenética multi-*locus* dos isolados de *Diaporthe*.

Tabela 4 - Isolados de *Diaporthe* usados na análise de sequências multi-locus

Espécie	Isolado	Hospedeiro	ITS	<i>tef1-α</i>	<i>tub2</i>	<i>his3</i>	<i>cal</i>
<i>D. alleghaniensis</i>	CBS 495.72	<i>Betula alleghaniensis</i>	KC343007	KC343733	KC343975	KC343491	KC343249
<i>D. australafricana</i>	CBS 113487	<i>Vitis vinifera</i>	KC343039	KC343765	KC344007	KC343523	KC343281
<i>D. beckhausii</i>	CBS 138.27	<i>Viburnum sp.</i>	KC343041	KC343767	KC344009	KC343525	KC343283
<i>D. chamaeropsis</i>	CBS 454.81	<i>Chamaerops humilis</i>	KC343048	KC343774	KC344016	KC343532	KC343290
<i>D. citri</i>	AR3405	<i>Citrus sp.</i>	KC843311	KC843071	KC843187	KJ420881	KC843157
<i>D. cynaroidis</i>	CBS 122676	<i>Protea cynaroides</i>	KC343058	KC343784	KC344026	KC343542	KC343300
<i>D. eres</i>	CBS 138594	<i>Ulmus laevis</i>	KJ210529	KJ210550	KJ420799	KC343574	KJ434999
<i>D. foeniculina</i>	CBS 111553	<i>Foeniculum vulgare</i>	KC343101	KC343827	KC344069	KC343585	KC343343
<i>D. foeniculina</i>	CAA955	<i>Quercus suber</i>	-	-	-	-	-
<i>D. malorum</i>	CBS 142383	<i>Malus domestica</i>	KY435638	KY435627	KY435668	KY435648	KY435658
<i>D. malorum</i>	CAA951	<i>Eucalyptus globulus</i>	-	-	-	-	-
<i>D. passiflorae</i>	CBS 132527	<i>Passiflora edulis</i>	JX069860	KY435633	KY435674	KY435654	KY435664
<i>D. rudis</i>	CBS 113201	<i>Vitis vinifera</i>	KC343234	KC343960	KC344202	KC343718	KC343476
<i>D. rudis</i>	CAA949	<i>Pinus pinaster</i>	-	-	-	-	-
<i>D. rudis</i>	CAA952	<i>Eucalyptus globulus</i>	-	-	-	-	-
<i>D. rudis</i>	CAA956	<i>Pinus pinaster</i>	-	-	-	-	-
<i>D. vaccinii</i>	CBS 160.32	<i>Oxycoccus macrocarpos</i>	KC343228	KC343954	KC344196	KC343712	KC343470
<i>Diaporthe sp.1</i>	CAA950	<i>Eucalyptus globulus</i>	-	-	-	-	-
<i>Diaporthe sp.2</i>	CAA953	<i>Eucalyptus globulus</i>	-	-	-	-	-
<i>Diaporthe sp.3</i>	CAA954	<i>Pinus pinaster</i>	-	-	-	-	-

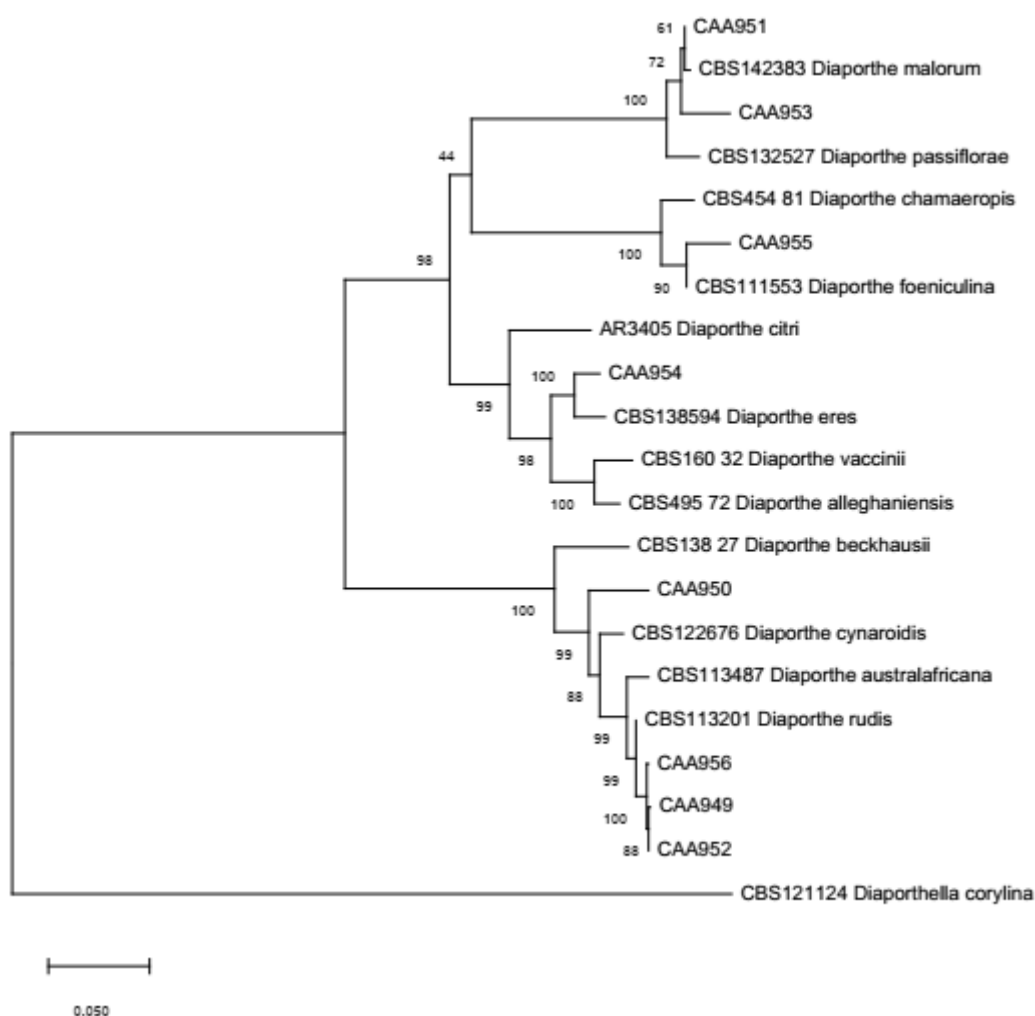


Figura 3 - Árvore filogenética obtida pelo método de Máxima Verossimilhança usando o modelo Tamura-Nei (TN93+G) do gênero *Diaporthe* com base nas sequências ITS, *tef1- α* , *tub2*, *his3* e *cal*.

Com base na informação obtida pela análise filogenética foi possível agrupar os isolados como CAA956, CAA949 e CAA952 filogeneticamente mais próximos de *D. rudis*; CAA953 e CAA951 de *D. malorum*, e, por fim, os isolados CAA950, CAA954 e CAA955 relacionados com *D. cynaroidis*, *D. eres* e *D. foeniculina*, respectivamente.

Para melhor interpretação dos resultados foram analisadas todas as posições dos nucleótidos dos oito isolados em estudo, depois de devidamente editadas, com vista a precisar a presença de todas as diferenças encontradas nos cinco *locus*. Foram elaboradas as tabelas 5, 6 e 7, evidenciando as maiores diferenças dos nucleótidos dos

três isolados quando comparados à espécie filogeneticamente mais próxima, usando as respectivas sequências depositadas no GenBank.

Tabela 5 - Diferença de nucleótidos entre o isolado CAA950 e *D. cynaroidis* (CBS122676)

Locus		Isolados	
		CAA950	<i>D. cynaroidis</i>
ITS	1	A	-
	33	-	C
	34	-	C
	63	C	T
	91	C	T
	96	C	T
	113	-	A
	114	-	T
	115	-	C
	384	G	A
	400	A	-
	402	G	A
	409	C	T
	483	C	T
<i>tef1-α</i>	14	G	A
	39	C	T
	41	A	C
	62	C	A
	157	C	A
	158	T	C
	205	C	-
	206	C	-
	207	A	-
	216	T	C
	230	A	G

Tabela 5 - Diferença de nucleótidos entre o isolado CAA950 e *D. cynaroidis* (CBS122676) (continuação)

<i>tef1-α</i>	246	G	A
	254	T	C
	266	T	A
	268	T	C
	269	C	-
	271	T	C
	273	C	T
<i>tub2</i>	6	C	G
	107	C	T
	120	C	G
	141	A	G
	161	T	C
	169	T	C
	209	T	C
	241	A	G
	251	C	T
	252	T	G
	273	C	T
	275	C	T
	284	-	G
	285	-	T
	286	-	G
	287	-	T
290	C	G	
<i>his3</i>	8	-	A
	57	T	C
	102	C	T
	152	C	T
	165	C	T
	169	A	G
	179	C	G

Tabela 5 - Diferença de nucleótidos entre o isolado CAA950 e *D. cynaroidis* (CBS122676) (continuação)

<i>his3</i>	200	T	C
	201	-	C
	202	-	A
	248	C	T
	308	T	G
	381	G	A
	390	G	C
	397	C	G
	408	A	G
	<i>cal</i>	4	T
38		A	T
39		T	G
157		A	G
166		G	A
168		T	C
170		A	G
183		G	A
185		G	A
222		A	G
348		G	A
365		G	A
375		A	G
407		G	A

Tabela 6 - Diferença de nucleótidos entre o isolado CAA953 e *D. malorum* (CBS142383)

Locus		Isolados	
		CAA953	<i>D. malorum</i>
ITS	6	-	T
	24	C	T
	60	-	T

Tabela 6 - Diferença de nucleótidos entre o isolado CAA953 e *D. malorum* (CBS142383) (continuação)

ITS	61	-	A
	62	A	C
	76	C	T
	77	-	C
	78	-	A
	79	-	G
	82	T	C
	85	T	C
	91	C	T
	92	G	A
	93	-	C
	94	-	T
	107	A	T
	121	T	C
	135	A	G
	136	C	T
	137	C	T
	144	-	T
	152	A	C
	153	C	A
	157	G	A
	159	T	A
	169	-	A
	383	C	G
	384	G	-
	385	C	-
388	G	A	
<i>tef1-α</i>	65	C	A
	185	C	T
	188	C	T
<i>cal</i>	91	C	A

Tabela 7 - Diferença de nucleótidos entre o isolado CAA954 e *D. eres* (CBS138594)

Locus		Isolados	
		CAA954	<i>D. eres</i>
ITS	45	C	T
	48	T	C
	49	C	T
	88	C	T
	131	A	C
	133	T	C
<i>tef1-α</i>	47	A	C
	106	C	A
<i>tub2</i>	8	-	C
	29	C	T
	137	T	G
	143	C	T
	156	G	A
	188	T	C
	230	T	C
	247	T	C
	253	G	A
	255	C	T
	259	T	A
	265	T	A
	269	C	T
	309	G	A
	311	C	G
	312	C	T
	322	T	C
418	C	T	
<i>his3</i>	1	C	A
	39	G	C
	157	C	T
	289	C	T

Tabela 7 - Diferença de nucleótidos entre o isolado CAA954 e *D. eres* (CBS138594) (continuação)

<i>his3</i>	352	T	C
	379	C	T
	380	C	T
	386	C	T
	393	-	A
	394	-	C
	395	-	G
	396	-	C
	397	-	G
	398	-	A
	399	-	C
	400	-	G
	401	-	C
	<i>cal</i>	5	C
52		C	T
104		T	C

É de realçar, ao examinar a tabela e a árvore filogenética simultaneamente, o facto dos isolados CAA950, CAA953 e CAA954 possuírem diferenças nucleotídicas muito diferentes, sendo que CAA950 apresenta 79 nucleótidos diferentes relativamente a *D. cynaroidis*, enquanto que CAA953 possui 34 nucleótidos desiguais a *D. malorum* e CAA954 difere em 46 nucleótidos quando comparado às sequências de *D. eres*.

Estas diferenças são consideráveis em quase todas as sequências dos *loci*, levantando a hipótese de poderem ser considerados potenciais novas espécies pertencentes do género *Diaporthe*.

4.4. Testes de crescimento

No decorrer de 14 dias foram registadas todas as medições relativas ao diâmetro de crescimento de micélio dos três isolados quando sujeitos às diferentes oito temperaturas. Foram realizadas três réplicas de cada isolado para cada temperatura (Figuras 4, 5 e 6).

Para os isolados CAA950 e CAA954 a temperatura ótima de crescimento foi 25 °C, ao passo que CAA953 apresentou melhor crescimento a 15 °C. É de realçar que o isolado CAA953 apresentou um crescimento muito lento, nunca conseguindo atingir a totalidade da placa de Petri nos 14 dias de estudo e, para além disso, o crescimento do micélio apresentou sempre formas muito assimétricas, o que levou então a ser medido o seu raio ao invés do diâmetro, como foi feito nos outros dois isolados.

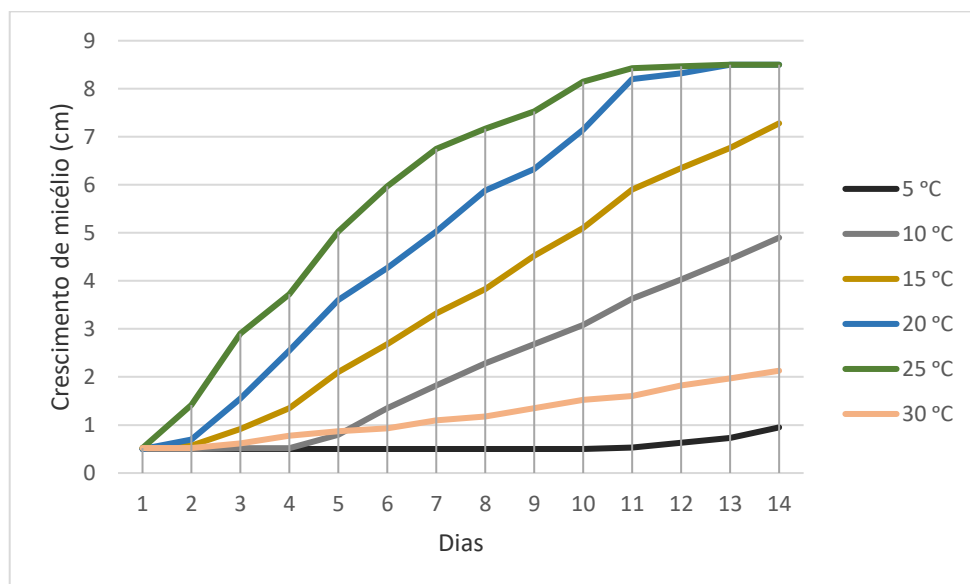


Figura 4 - Curva de crescimento do isolado CAA950 durante 14 dias a diferentes temperaturas

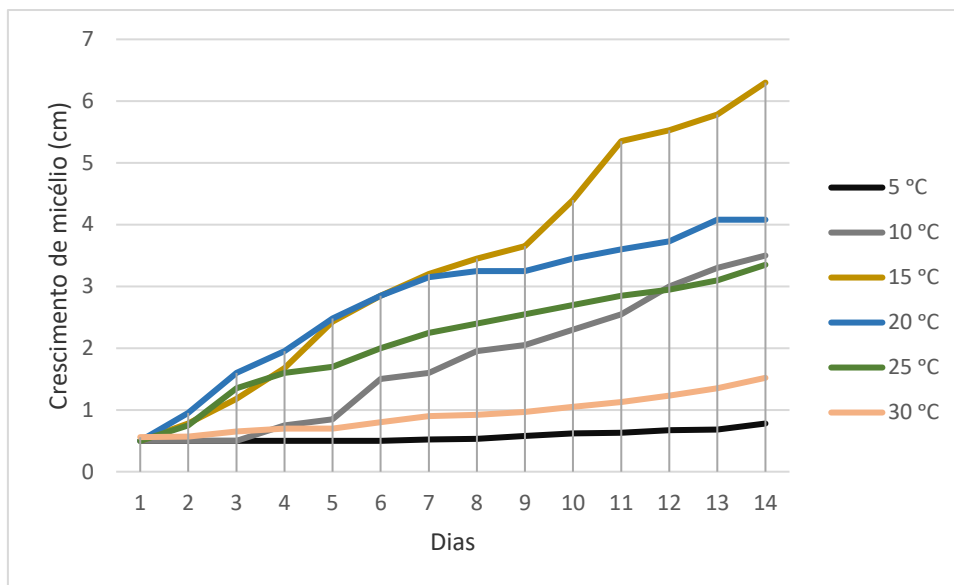


Figura 5 - Curva de crescimento do isolado CAA953 durante 14 dias a diferentes temperaturas

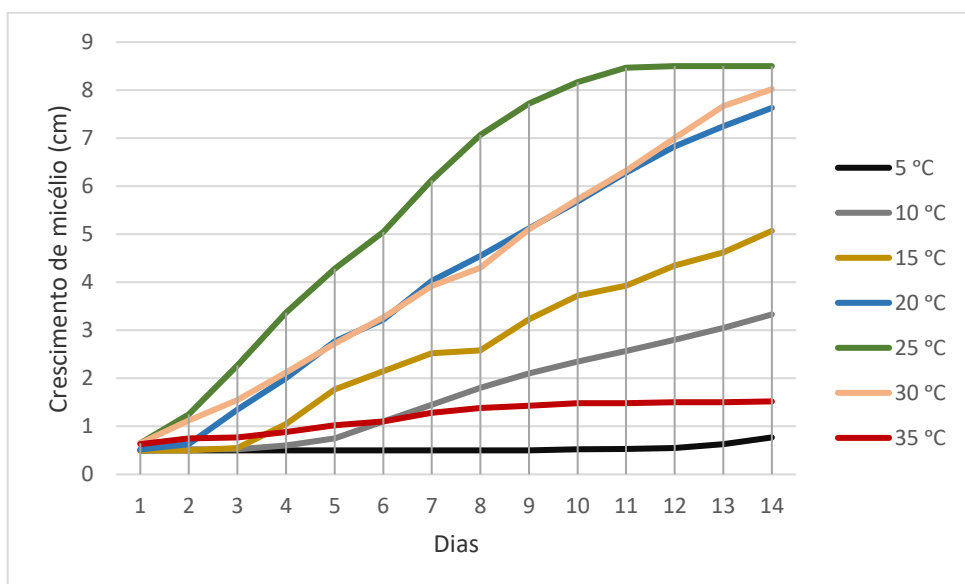


Figura 6 - Curva de crescimento do isolado CAA954 durante 14 dias a diferentes temperaturas

A 35 °C e 40 °C, os isolados CAA950 e CAA953 não exibiram qualquer crescimento, enquanto que CAA954 só não cresceu a 40 °C, apresentando capacidade de crescimento quando sujeitos a 35 °C.

As placas submetidas à temperatura de 5 °C apresentaram um crescimento muito reduzido, embora que, aquando da colocação destas à temperatura ambiente

exibiram um maior crescimento, inclusive o micélio preencheu a área da placa até à margem. Porém as placas incubadas a 40 °C, após o período de 14 dias, foram igualmente colocadas à temperatura ambiente não se observando qualquer crescimento.

4.5. Caracterização morfológica

Os picnídios foram observados com o estereomicroscópio Nikon SMZ1500 (Nikon, Japão) e, por sua vez, os conídios foram analisados com o microscópio Nikon eclipse 80i (Nikon, Japão) equipado com contraste interferencial (DIC).

As fotografias foram obtidas usando câmaras Nikon Sight DS-Fi1 (Nikon, Japão) e Nikon Sight DS-Ri1 (Nikon, Japão) para os picnídios e esporos, respetivamente (Figuras 7, 8 e 9).

Diaporthe sp. CAA950

Diaporthe sp. CAA950 apresenta picnídios superficiais, expelindo um líquido castanho. Conídios alfa em placas de PDA a $1/4$ com ramos de *Foeniculum vulgare* (média \pm DP = $3,6 \pm 0,4 \times 1,7 \pm 0,3 \mu\text{m}$, n = 100). Os conídios beta em placas de PDA a $1/4$ com ramos de *Foeniculum vulgare* (média \pm DP = $30 \pm 10,1 \times 3,4 \pm 0,7 \mu\text{m}$, n = 10) (Figura 7).

Características da cultura: O micélio foi disperso a partir do centro da placa de Petri apresentando uma colónia castanho escuro. Exibiu um melhor crescimento a 25 °C, preenchendo a totalidade da placa ao 11º dia, enquanto que a 20 °C a placa foi totalmente ocupada ao 13º dia. O seu crescimento à temperatura ótima é, em média, de 7 mm/dia. Esta espécie não obteve qualquer crescimento a 35 e 40 °C.

Localização: Gamarão de Baixo, Arouca, Portugal.

Coordenadas GPS: 40.955, -8.224.

Hospedeiro: *Eucalyptus globulus*.

Diaporthe sp. CAA953

Diaporthe sp. CAA953 apresenta picnídios superficiais e conídios brancos e castanhos. Conídios beta em placas de PDA a $1/4$ com ramos de *Foeniculum vulgare* (média \pm DP = $20,6 \pm 4 \times 1,5 \pm 0,13 \mu\text{m}$, n = 10) (Figura 8).

Características da cultura: O micélio foi disperso a partir do centro da placa de Petri apresentando uma colónia castanho muito esbatido. Exibiu um melhor crescimento a 15 °C, nunca conseguindo atingir a placa na sua totalidade durante os 14 dias de teste. O seu crescimento à temperatura ótima é, em média, de 4 mm/dia. Esta espécie não obteve qualquer crescimento a 35 e 40 °C.

Localização: Simões, Ponte da Barca, Portugal.

Coordenadas GPS: 41.791, -8.469.

Hospedeiro: *Eucalyptus globulus*.

Diaporthe sp. CAA954

Diaporthe sp. CAA954 apresenta picnídios superficiais, expelindo um líquido de cor amarela. Os conídios alfa em placas de PDA a $1/4$ com ramos de *Foeniculum vulgare* (média \pm DP = $13,9 \pm 1,4 \times 5,6 \pm 0,7 \mu\text{m}$, n = 100). (Figura 9).

Características da cultura: O micélio foi disperso a partir do centro da placa de Petri apresentando inicialmente uma colónia castanho muito pálido que escureceu ao longo do tempo de crescimento. Exibiu um melhor crescimento a 25 °C, atingindo completamente a placa ao 12º dia. O seu crescimento à temperatura ótima é, em média, de 8 mm/dia. Esta espécie não obteve qualquer crescimento a 40 °C.

Localização: Campo do Gerês, Portugal.

Coordenadas GPS: 41.818, -8.125.

Hospedeiro: *Pinus pinaster*.

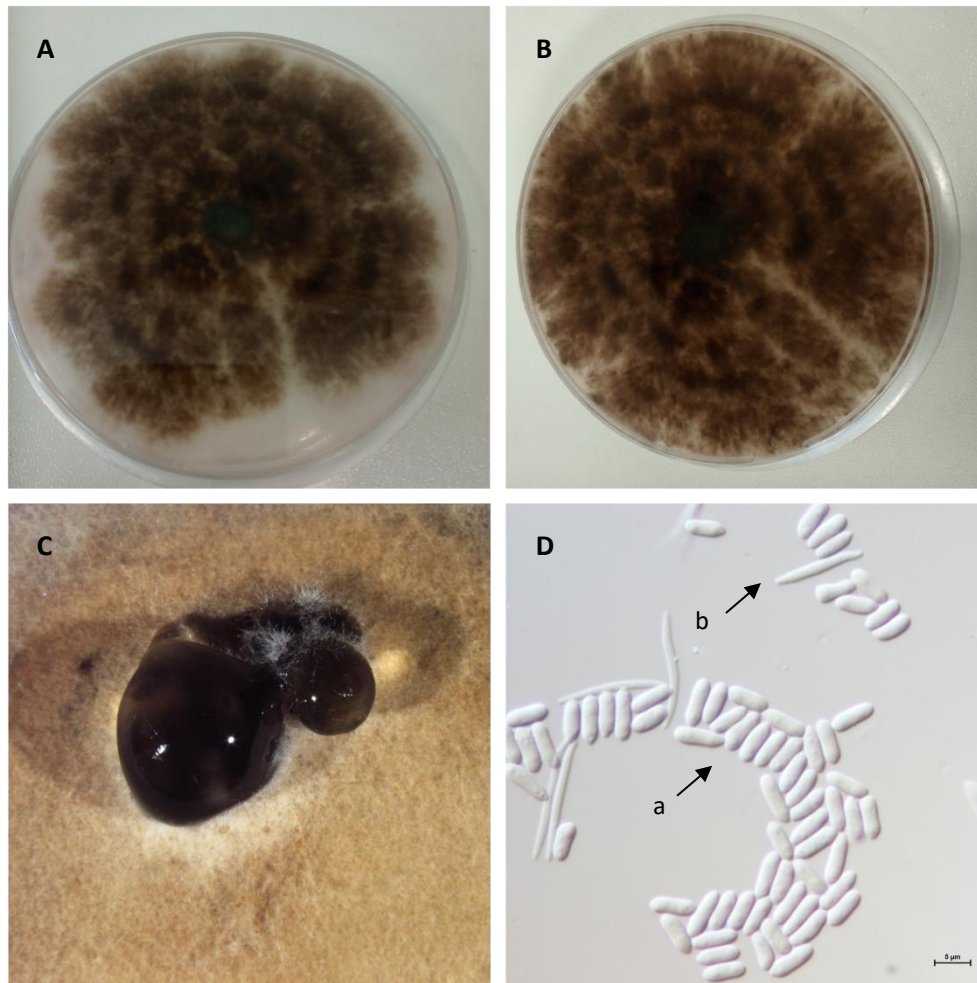


Figura 7 – *Diaporthe* sp. CAA950. (A) Superfície da cultura no reverso da placa ao 7º dia de crescimento a 25 °C. (B) Superfície da cultura no reverso da placa ao 14º dia de crescimento a 25 °C. (C) Picnídios em ramos de *F. vulgare*. (D) Conídios alfa (a) e beta (b). Escala: 10 µm

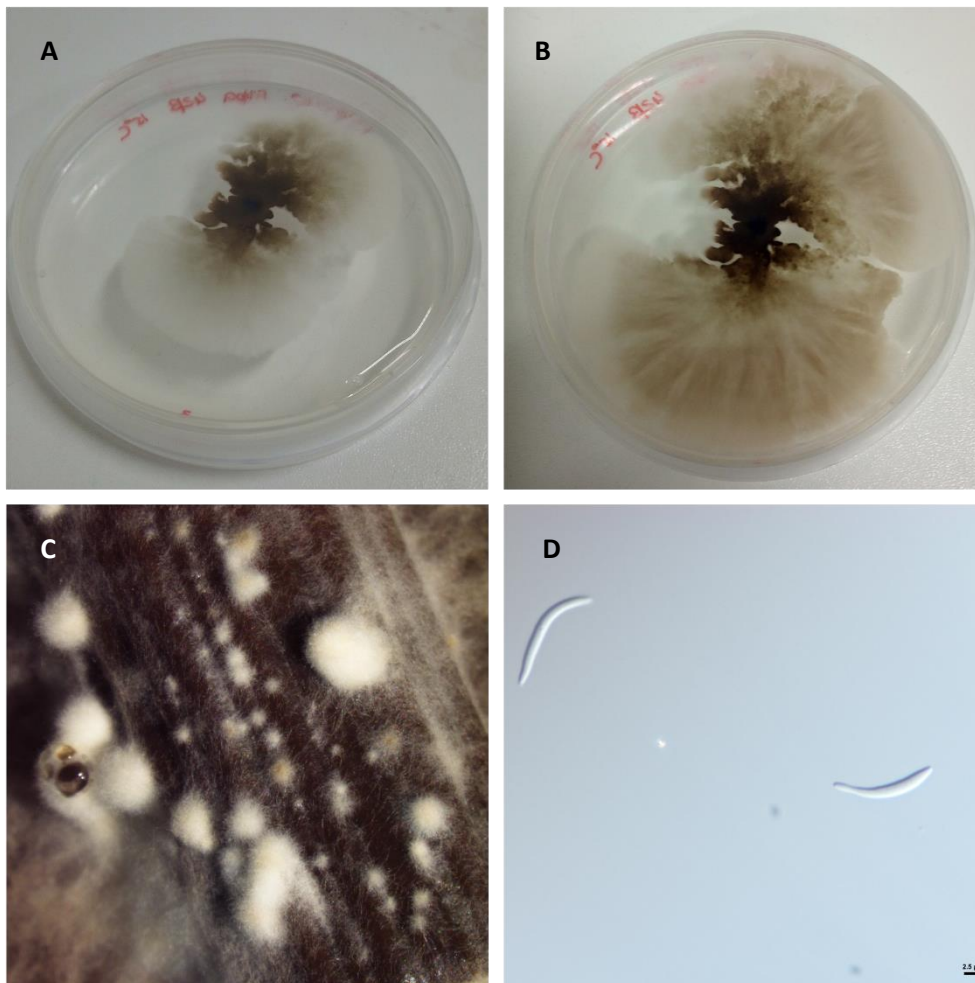


Figura 8 - *Diaporthe* sp. CAA953. (A) Superfície da cultura no reverso da placa ao 7º dia de crescimento a 15 °C. (B) Superfície da cultura no reverso da placa ao 14º dia de crescimento a 15 °C. (C) Picnídios em ramos de *F. vulgare*. (D) Conídios beta. Escala: 10 µm

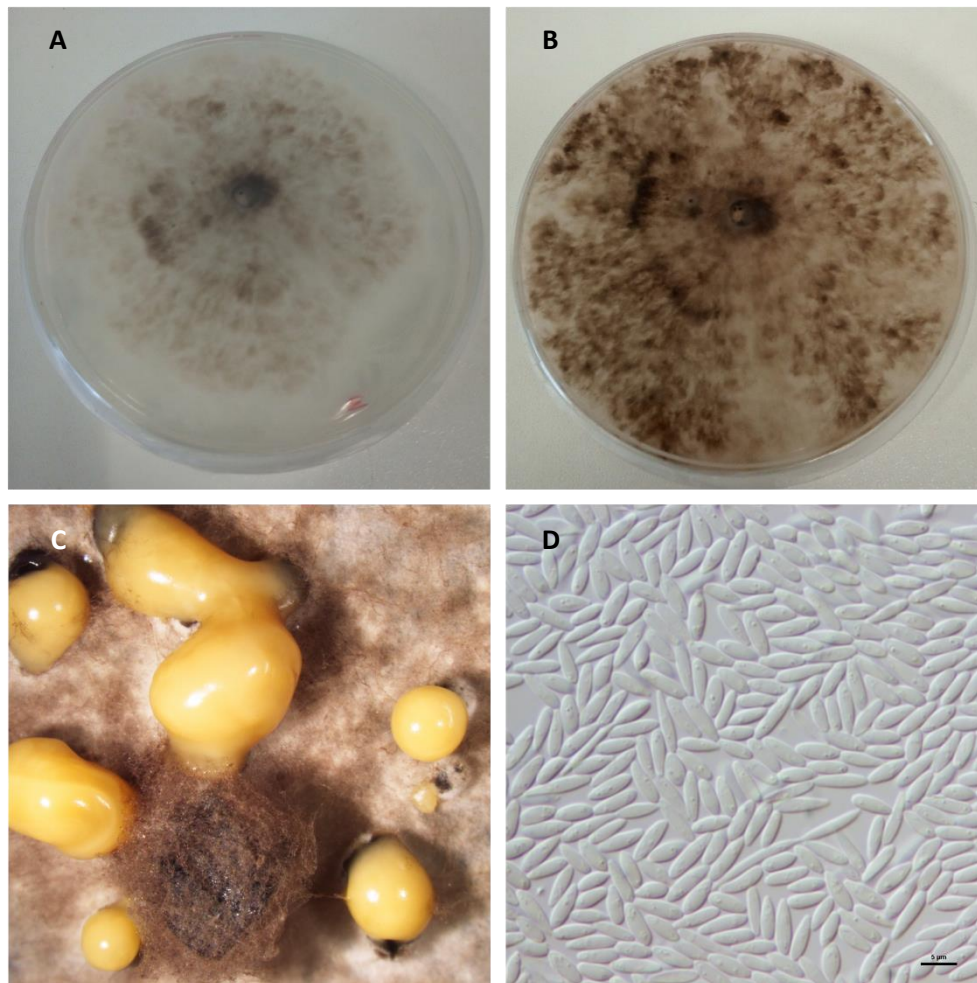


Figura 9 - *Diaporthe* sp. CAA954. (A) Superfície da cultura no reverso da placa ao 7º dia de crescimento a 25 °C. (B) Superfície da cultura no reverso da placa ao 14º dia de crescimento a 25 °C. (C) Picnídios em ramos de *F. vulgare*. (D) Conídios alfa. Escala: 10 µm

5. DISCUSSÃO

A diversidade de espécies fúngicas é um tema muito discutido, porque apesar de estarem descritas cerca de 100 000 espécies, estima-se que a diversidade de fungos varia de centenas de milhares a mais de um milhão de espécies. Desta forma, é sugerido que as espécies que se encontram descritas traduzem apenas uma pequena fração da totalidade existente (Arnold *et al.*, 2001; Thanh *et al.*, 2019).

No presente estudo foram caracterizados isolados fúngicos de amostras recolhidas de três espécies florestais (*Eucalyptus globulus*, *Pinus pinaster* e *Quercus suber*) de diferentes zonas de Portugal continental, com vista à realização de um estudo focado na diversidade fúngica presente nestes hospedeiros. Foi nesse mesmo sentido que as amostras recolhidas foram isoladas e, mais tarde, foi realizada uma tipagem de todos os isolados deste trabalho.

Quando realizada uma identificação primária baseada na sequência da região ITS, foram encontrados isolados pertencentes aos géneros *Diaporthe* (44,44 %), *Harknessia* (11,11 %), *Discula* (5,55 %), *Arcopilus* (5,55 %), *Epicoccum* (5,55 %), *Neofusicoccum* (5,55 %) e, por último, *Gnomoniopsis* (22,22 %).

O género *Harknessia* é comumente associado a diversos hospedeiros e a primeira espécie foi relatada na África do Sul, em folhas de *Eucalyptus* sp. (Crous *et al.*, 1993). No ano de 2012, em Portugal, foi associado a *Eucalyptus globulus* (Crous *et al.*, 2012). *Discula quercina* é um fungo patogénico responsável por doenças em sobreiros, causando manchas foliares castanho escuras que formam lesões necróticas. Está evidenciada a capacidade que esta espécie patogénica possui em atuar como endófito, não exibindo sinais claros da sua presença (Maddau *et al.*, 2011).

Relativamente ao género *Arcopilus*, este já foi associado relativamente à sua presença em folhas e caules de *Vitis vinifera*, ao ar e à poeira e ainda é conhecido pelo importante papel biotecnológico que possui pela produção de metabolitos com características terapêuticas (Wang *et al.*, 2016; Dwibedi & Saxena, 2018).

Com um maior número de habitats, *Epicoccum nigrum* além de encontrado em *Eucalyptus globulus*, *Pinus pinaster*, *Quercus suber* e espécies florestais, foi igualmente detetado em solos, papel, têxteis, insetos e no ar (Arenal *et al.*, 1999). *Neofusicoccum* é um género fúngico encontrado num largo leque de plantas em Portugal, como em

Eucalyptus globulus, *Pinus pinaster*, *Pinus pinea*, *Ferula communis*, *Pyracantha coccinea*, *Quercus robur*, *Acacia longifolia* e *Fraxinus excelsior* (Alves *et al.*, 2013; Lopes *et al.*, 2016). A saber o género ainda não foi descrito em *Quercus suber*.

Está relacionada a presença de *Gnomoniopsis* em plantas *Fagaceae*, *Rosaceae* e *Onagraceae*, podendo atuar como endófitos ou patógenos. Os primeiros relatos foram descritos em *Rubus chamaemorus*, *Comarum palustre* e *Potentilla* sp., na Finlândia e na Suíça, por M. Monod em 1977 (Walker *et al.*, 2010).

Após a identificação primária dos isolados foi possível direcionar o foco do trabalho unicamente para o género *Diaporthe*, uma vez que a sua presença seria pouco conhecida relativamente a estes hospedeiros florestais específicos em Portugal.

O género *Diaporthe* é conhecido por causar doenças em diversas espécies florestais, sendo fulcral o estudo deste género e a procura em saber de que forma atuam nos mais diversos hospedeiros (Santos *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2017a). É sabido que dentro de uma espécie os caracteres fenotípicos podem ser variáveis e que mais de uma espécie pode colonizar um determinado hospedeiro, tal como uma única espécie pode associar-se a diferentes hospedeiros (Chen *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2018).

Várias são as espécies de *Diaporthe* encontradas em Portugal com associação a diversos hospedeiros. São exemplos *D. angelicae* e *D. foeniculacea*, encontrados em *Foeniculum vulgare*, popularmente denominado por funcho, *D. viticola*, *D. pyracanthae* e *D. malorum* detetados em *Vitis vinifera* (videira), em ramos de *Pyracantha coccinea* (piracanta) e em *Malus domestica* (macieira), respetivamente (Gomes *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2017a). Também a espécie *D. neotheicola* já foi detetada noutros hospedeiros em Portugal, em *Hydrangea macrophylla*, conhecida como hortênsia, *Euphorbia pulcherrima*, vulgarmente chamada de poinsétia, assim como em *Prunus dulcis* e *Prunus armeniaca*, amendoeira e damasqueiro, por sua ordem (Diogo *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010).

Segundo a base de dados de U. S. National Fungus Collections, está registada a presença de *Diaporthe eucalypti* em *Eucalyptus globulus* na Califórnia (acedido a 6 de outubro de 2019).

Até então, a saber, nenhuma espécie de *Diaporthe* em Portugal foi associada a *Eucalyptus globulus*, *Pinus pinaster* ou *Quercus suber*.

A sequenciação da região ITS no estudo de *Diaporthe* é bastante útil na discriminação de isolados ao nível do género, no entanto mostra-se insuficiente quando o pretendido passa pela identificação de espécie de um determinado isolado (Santos *et al.*, 2017b). Como tal, para os isolados selecionados foram sequenciados os genes que codificam para o fator de alongamento da transcrição 1-alfa (*tef1- α*), β -tubulina (*tub2*), histona (*his3*) e calmodulina (*cal*).

Feita a análise filogenética multi-*locus* dos isolados de *Diaporthe*, os isolados CAA950, CAA953 e CAA954 formaram clades distintas na árvore filogenética, separando-os das espécies *D. cynaroidis*, *D. malorum* e *D. eres*, respetivamente, exibindo altos valores de *bootstrap*: 99 %, 72 % e 100 %, por sua ordem.

Dando continuidade ao estudo destes três isolados representando potenciais novas espécies, quando os seus nucleótidos foram pormenorizadamente comparados aos nucleótidos das espécies filogeneticamente mais próximas, encontraram-se diferenças bastante expressivas, reforçando essa mesma ideia de que se tratam de novas espécies do género *Diaporthe*.

No que toca a CAA950, ao comparar detalhadamente às sequências da espécie *D. cynaroidis*, este isolado apresentou 79 nucleótidos diferentes, distribuídos em 14, 18, 17, 16 e 14 nucleótidos distintos nas regiões de ITS, *tef1- α* , *tub2*, *his3* e *cal*, respetivamente.

Ao isolado CAA953 foram encontrados 34 nucleótidos distintos das sequências de *D. malorum*, espécie filogeneticamente mais próxima deste isolado. Estão repartidos em 30 nucleótidos diferentes na sequência da região de ITS, 3 na sequência referente à região de *tef1- α* e, por último, apenas 1 na região *cal*.

Por fim, o isolado CAA954 foi comparado com a sua espécie mais próxima, *D. eres*, foram detetadas, ao todo, 46 diferenças nos nucleótidos, divididos entre 6, 2, 18, 17 e 3 por esta ordem nas regiões de ITS, *tef1- α* , *tub2*, *his3* e *cal*.

Relativamente ao crescimento dos fungos em placa, o micélio do isolado CAA950 preencheu toda a placa a 20 °C e 25 °C no final do período de medições e apresentou capacidade de crescer a 15 °C e 10 °C, embora o crescimento quando sujeito a esta última temperatura tenha sido menor.

Em relação ao isolado CAA953, foi observado especialmente um maior crescimento de micélio a 15 °C, mesmo não tendo sido suficiente para o preenchimento

total da placa, no entanto está em concordância com o intervalo de temperatura ótima de crescimento de *D. malorum* entre 13 °C a 20 °C (Santos *et al.*, 2017a). Outro facto distinto dos outros isolados estudados foi o caso de ser perceptível um maior crescimento a 10 °C do que o observado a 20 °C e 25 °C. Ambos os factos são pouco frequentes em fungos, nomeadamente no género *Diaporthe*, visto que a temperatura ótima de crescimento da maioria das espécies de *Diaporthe* encontra-se entre os 20 °C e os 25 °C (Santos *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2017).

Por último, o isolado CAA954, a 25 °C e ao fim do 12º dia, já foi possível observar o crescimento máximo de micélio, ocupando a totalidade da placa de Petri. É de notar, também, que exibiu melhores condições de crescimento a 30 °C que a 20 °C, contrariamente ao observado em *D. eres* (Thomidis & Michailides, 2009).

De todos os procedimentos com vista à esporulação, os melhores resultados obtidos passaram pelos isolados cultivados em meio PDA a ¼ envolvidos em *F. vulgare*, sujeitos a exposição solar indireta por 1 mês.

Muitas espécies de fungos são consideradas específicas de um determinado hospedeiro, porém, no presente estudo, as espécies de *Diaporthe* analisadas não possuem registo de presença em *Eucalyptus globulus*, *Pinus pinaster* e *Quercus suber* em Portugal e poucas são as espécies encontradas, nestes mesmos hospedeiros, em outros locais do mundo.

Posto isto, a continuidade da presente abordagem relativa à diversidade fúngica em Portugal é necessária e merece uma contínua investigação, não apenas nestas três espécies florestais aqui estudadas, mas também em diferentes hospedeiros de tantos que compõem a opulenta floresta do nosso país.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou alguma diversidade fúngica em espécies florestais de Portugal continental referente a *Eucalyptus globulus*, *Pinus pinaster* e *Quercus suber*. Após identificação foram encontrados sete géneros diferentes, sendo estes *Diaporthe*, *Harkessia*, *Discula*, *Arcopilus*, *Epicoccum*, *Neofusicoccum* e *Gnomoniopsis*.

Entre os géneros anteriormente referidos foram estudados os isolados de *Diaporthe* que, ao que sabemos, não existem descrições da sua presença nas espécies florestais estudadas em Portugal. Foram identificadas três potencialmente novas espécies. A maioria dos restantes isolados em estudo pertenciam a *D. rudis*, *D. malorum* e *D. foeniculina*.

Os três isolados relativos às espécies potencialmente novas foram caracterizados através de métodos moleculares e morfológicos. Estes isolados apresentaram-se intimamente relacionados com as espécies *D. cynaroidis*, *D. malorum* e *D. eres*, mas distintas filogeneticamente pela razão de possuírem elevadas diferenças nucleotídicas.



7. PERSPECTIVAS FUTURAS

No futuro é fundamental a realização de testes de patogenicidade, de forma a estimar o potencial patogénico das espécies de *Diaporthe* encontradas neste estudo. Assim, será possível melhorar o conhecimento deste género relativamente à forma como atuam e causam danos nas espécies florestais alvo, bem como o seu potencial impacto.

Visando uma análise mais ampla e aprofundada, deverá ter-se em consideração a continuidade da pesquisa realizada no presente estudo, através de um número superior de amostragens, pesquisando assim a distribuição atual de *Diaporthe* em Portugal.

Futuramente é sugerida, também, a continuidade da caracterização molecular e do estudo dos caracteres morfológicos dos restantes isolados obtidos.

8. REFERÊNCIAS

- Alves A., Correia A., Luque J., Phillips A. (2004) *Botryosphaeria corticola*, sp. nov. on *Quercus* species, with notes and description of *Botryosphaeria stevensii* and its anamorph, *Diplodia mutila*. *Mycologia*, 96, 598–613.
- Alves, A. M., Pereira, J. S. & Silva, J. M. N. (2007a). O Eucaliptal em Portugal – Impactes Ambientais e Investigação Científica. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa, Portugal.
- Alves, A., Phillips, A. J. L., & Henriques, I. (2007b). Rapid differentiation of species of Botryosphaeriaceae by PCR fingerprinting. *Research in Microbiology*, 158, 112–121.
- Alves, A., Crous, P. W., Correia, A. & Phillips, A. J. L. (2008). Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity*, 28, 1–13.
- Alves, A., Barradas, C., Phillips, A. J. L., & Correia, A. (2013). Diversity of Botryosphaeriaceae species associated with conifers in Portugal. *European Journal of Plant Pathology*, 791–804.
- Araújo, C., Pereira, J. S., & Ericsson, T. (1989). Aboveground biomass production in an irrigation and fertilization field experiment with *Eucalyptus globulus*. *Forest Tree Physiology*, 46, 526-528.
- Arenal, F., Platas, G., & Martí, J. (1999). Evaluation of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for assessing the genetic variability of isolates of the fungus *Epicoccum nigrum*. *Journal of Applied Microbiology*, 87, 898–906.

- Arnold, A. E., Maynard, Z., & Gilbert, G. S. (2001). Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity. *The British Mycological Society*, 105, 1502–1507.
- Aylward, J., Roets, F., Dreyer, L. L. & Wingfield, M. J. (2019). *Teratosphaeria* stem canker of *Eucalyptus*: two pathogens, one devastating disease. *Molecular Plant Pathology*, 20, 8-19.
- Barradas, C., Phillips, A. J. L., Alves, A., Correia, A., Diogo, E., & Bragança, H. (2016). Diversity and potential impact of Botryosphaeriaceae species associated with *Eucalyptus globulus* plantations in Portugal. *European Journal of Plant Pathology*, 146, 245–257.
- Branco, M., Bragança, H., & Sousa, E. (2014). Pests and Diseases in Portuguese Forestry: Current and New Threats. *World Forests*, 19, 117-154.
- Carbone, I., & Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer set for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91(3), 553–556.
- Cardoso, R. M., Soares, P. M. M., Lima, D. C. A. & Miranda, P. M. A. (2019). Mean and extreme temperatures in a warming climate: EURO CORDEX and WRF regional climate high-resolution projections for Portugal. *Climate Dynamics*, 52, 129-157.
- Catry, F. X., Moreira, F., Tujeira, R., & Silva, J. S. (2013). Forest Ecology and Management Post-fire survival and regeneration of *Eucalyptus globulus* in forest plantations in Portugal. *Forest Ecology and Management*, 310, 194–203.
- Cerasoli, S., Caldeira, M. C., Pereira, J. S., Caudullo, G., & Commission, E. (2016). *Eucalyptus globulus* and other eucalypts. *European Atlas of Forest Tree Species*, 90-91.

- Chen, S., Morgan, D. P., Pathology, P., & Agricultural, C. K. (2014). Phylogeny, morphology, distribution and pathogenicity of Botryosphaeriaceae and Diaporthaceae from English Walnut in California. *Plant Disease*, 98(5), 636-652.
- Costa, D., & Teresa, L. (2017). Sustain – Endophytes for a growing world. Programme and abstract book 28th-29th August 2017.
- Croitoru, L. (2007). Valuing the non-timber forest products in the Mediterranean region. *Ecology Economics*, 3, 2–9.
- Crous P. W. (1998) *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs associated with leaf spot diseases of *Eucalyptus*. *Mycologia Memoir* 21, 1–170.
- Crous P. W., Groenewald J. Z., Mansilla J. P., Hunter G. C. & Wingfield M. J. (2004a) Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on *Eucalyptus*. *Studies in Mycology*, 50, 195–214.
- Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Risède, J., Simoneau, P., & Nigel, L. (2004b). *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaeropedunculate vesicles. *Studies in Mycology*, 415–430.
- Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Summerell, B. A., Wingfield, B. D., & Wingfield, M. J. (2009). Co-occurring species of *Teratosphaeria* on *Eucalyptus*. *Persoonia*, 22, 38–48.
- Crous, P. W., Summerell, B. A., Shivas, R. G., Carnegie, A. J., & Groenewald, J. Z. (2012). A re-appraisal of *Harknessia* (Diaporthales), and the introduction of Harknessiaceae fam. nov. *Persoonia*, 49–65.
- Crous P. W., Wingfield M. J., Mansilla J. P., Alfenas A. C. & Groenewald J. Z., (2006). Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on *Eucalyptus* II. *Studies in Mycology*, 55, 99–131.

- Crous, P. W., Wingfield, M. J., & Raj, T. R. N. (1993). *Harknessia* species occurring in South Africa. *Mycological Society of America*, 85(1), 108–118.
- Díaz, G. A., Latorre, B. A., Lolas, M., Ferrada, E., Naranjo, P. & Zoffoli, J. P. (2017). Identification and characterization of *Diaporthe ambigua*, *D. australafricana*, *D. novem*, and *D. rudis* causing a postharvest fruit rot in kiwifruit. *Plant Disease*, 101(8), 1402–1410.
- Diogo, E. L. F., Santos, J. M., & Phillips, A. J. L. (2010). Phylogeny, morphology and pathogenicity of *Diaporthe* and *Phomopsis* species on almond in Portugal. *Fungal Diversity*, 44, 107–115.
- Dissanayake, A. J., Phillips, A. J. L., Hyde, K. D., Yan, J. Y. & Li X. H. (2017). The current status of species in *Diaporthe*. *Mycosphere*, 8, 1106–1156.
- Dwibedi, V., & Saxena, S. (2018). *Arcopilus aureus*, a Resveratrol-Producing Endophyte from *Vitis vinifera*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 186, 46-495.
- Farr, D. F., Castlebury, L. A., Rossman, A. Y., & Farr, D. F. (2015). Morphological and molecular characterization of *Phomopsis vaccinii* and additional isolates of *Phomopsis* from blueberry and cranberry in the eastern United States. *Mycological Society of America*, 94, 494–504.
- Gao, Y., Liu, F., Duan, W., Crous, P. W., & Cai, L. (2017). *Diaporthe* is paraphyletic. *IMA Fungus*, 8(1), 153–187.
- Gil, L., & Varela, M. C. (2008). Cork oak – *Quercus suber*. *Biodiversity International*. Roma, Itália.
- Glass, N. L., & Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *American Society for Microbiology*, 61(4), 1323–1330.

- Gomes, R. R., Glienke, C., Videira, S. I. R., Lombard, L., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2013). *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia*, 1–41.
- Guarnaccia, V., Groenewald, J. Z., Woodhall, J., Armengol, J., & Cinelli, T. (2018). *Diaporthe* diversity and pathogenicity revealed from a broad survey of grapevine diseases in Europe. *Persoonia*, 40, 135–153.
- Hanson, P. J., & Weltzin, J. F. (2000). Drought disturbance from climate change: response of United States forests. *The Science of the Total Environment*, 262, 205–220.
- ICNF. Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (2013). Adaptação das florestas às alterações climáticas. Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território.
- ICNF. Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (2017). Perfil florestal. Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território.
- ICNF. Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (2018). Prospecção e monitorização do cancro resinosos do pinheiro. Departamento de Gestão de Áreas Públicas e de Proteção Florestal.
- ICNF. Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (2019). 6º Inventário Florestal Nacional.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549.

- Lopes, A., Barradas, C., Ajl, P., & Alves, A. (2016). Diversity and phylogeny of *Neofusicoccum* species occurring in forest and urban environments in Portugal. *Mycosphere*, 7, 906–920.
- Loustau, D., Crepeau, S., Guye, M. G., Sartore, M., & Saur, E. (1995). Growth and water relations of three geographically separate origins of maritime pine (*Pinus pinaster*) under saline conditions. *Tree Physiology*, 15, 569–576.
- Maddau, B. L., Perrone, C., Andolfi, A., Spanu, E., Linaldeddu, B. T., & Evidente, A. (2011). Phytotoxins produced by the oak pathogen *Discula quercina*. *Forest Pathology*, 41, 85–89.
- Martín -García, J., Zas, R., Solla, A., Woodward, S., Hantula, J., Vainio, E. J., Mullett, M., Morales -Rodríguez, C., Vannini, A., Martínez -Álvarez, P., Pinto, G., Alves, A., Amaral, J., Wingfield, M. J., Fourie, G., Steenkamp, E. T., Ahumada, R., Šerá, B., Sanz -Ros, A. V., Raposo, R., Elvira -Recuenco, M., Iturrirxa, E., Gordon, T. R. & Diez, J. J. (2019). Environmentally friendly methods for controlling pine pitch canker. *Plant Pathology*, 68, 843-860.
- Mendes, A. M. S. C., Feliciano, D., Tavares, M. & Dias, R. (2004). The Portuguese forests country level report delivered to the EFFE Project, Evaluating financing of forestry in Europe. Universidade Católica do Porto.
- Milagres, C. A., Belisário, R., Silva, M. A., Lisboa, D. O., Pinho, D. B., & Furtado, G. Q. (2018). A novel species of *Diaporthe* causing leaf spot in *Pachira glabra*. *Tropical Plant Pathology*.
- Moller, E. M., Bahnweg, G., Sandermann, H., & Geiger, H. H. (1992). A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research*, 20(22), 6115–6116.

- Moreira, A. C., Medeira, C., Maia, I., Quartin, V., Matos, M. C. & Cravador, A. (2006). Studies on the association of the *Quercus suber* decline disease with *Phytophthora cinnamomi* in Portugal. *Bol. Inf. CIDEU*, 31–38.
- Mota, M. M. M., Raasch, H. B., Ravo, M. A. B., Enas, A. C. P., Urge, W. B., Ister, R. M. E. & Ousa, E. S. (1999). First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology*, 1, 727–734.
- O'Donnell, Kerry & Cigelnik, E. (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7(1), 103–116.
- Oliveira, A., Moura, P., Pinto, M. & Providência, F. M. (1999). Boas práticas florestais para o Pinheiro bravo. Centro PINUS, Associação para a valorização da floresta de pinho. Porto.
- Pessoa, F., Lidon, F., & Reboredo, F. (2014). Drought Effects on Portuguese Forest Cover. *World Forests*, 67–96.
- Rehner SA, Uecker FA. (1994). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer phylogeny and host diversity in the coelomycetes *Phomopsis*. *Canadian Journal of Botany* 72: 1666–1674.
- Santos, C. & Almeida, J. A. (2014) Spatial Characterization of Maritime Pine Productivity in Portugal. *World Forests*, 185-217.
- Santos, J. M., & Phillips, A. J. L. (2009). Resolving the complex of *Diaporthe* (*Phomopsis*) species occurring on *Foeniculum vulgare* in Portugal. *Fungal Diversity*, 34, 111–125.

- Santos, J. M., Correia, V. G., Phillips, A. J. L., & Spatafora, J. W. (2010). Primers for mating-type diagnosis in *Diaporthe* and *Phomopsis*: their use in teleomorph induction in vitro and biological species definition. *Fungal Biology*, 114(2–3), 255–270.
- Santos, J. M., Vrandecic, K., Cosic, J., Duvnjak, T., & Phillips, A. J. L. (2011). Resolving the *Diaporthe* species occurring on soybean in Croatia. *Persoonia*, 27, 9–19.
- Santos, L., Ajl, P., Pw, C., & Alves, A. (2017a). *Diaporthe* species on *Rosaceae* with descriptions of *D. pyracanthae* sp. *Mycosphere*, 8, 485–511.
- Santos L, Alves A, Alves R. (2017b). Evaluating multi-locus phylogenies for species boundaries determination in the genus *Diaporthe*. *PeerJ*, 5: e3120.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 6241-6246.
- Silva, J. S., & Catry, F. (2006). Forest fires in cork oak (*Quercus suber* L.) stands in Portugal. *International Journal of Environmental Studies*, 63, 37–41.
- Silva M, Machado H, Phillips AJL (2009) *Mycosphaerella* species occurring on *Eucalyptus globulus* in Portugal. *European Journal of Plant Pathology*, 125, 425–433.
- Smahi, H., Chouih, S., Arkam, M., Franceschini, A., Bt, L., & Ajl, P. (2017). Molecular characterization and pathogenicity of *Diplodia corticola* and other *Botryosphaeriaceae* species associated with canker and dieback of *Quercus suber* in Algeria. *Mycosphere*, 8(2), 1261-1272.

- Soares P. M. M, Cardoso R. M., Lima D. C. A., Miranda P. M. A. (2017). Future precipitation in Portugal: high-resolution projections using WRF model and EURO-CORDEX multi-model ensembles. *Climate Dynamics*, 49, 2503-2530.
- Thanh, V. N., Thuy, N. T., Huong, H. T. T., Hien, D. D., Hang, D. T. M., Anh, D. T. K., Hüttner, S., Larsbrink, J. & Olsson, L. (2019). Surveying of acid-tolerant thermophilic lignocellulolytic fungi in Vietnam reveals surprisingly high genetic diversity. *Scientific Reports*, 1–12.
- Thomidis, T. & Michailides, T. J., (2009). Studies on *Diaporthe eres* as a new pathogen of peach trees in Greece. *Plant Disease*, 93, 1293–1297.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24), 4876–4882.
- Tóth, Á. (2011). *Bursaphelenchus xylophilus*, the pinewood nematode: its significance and a historical review. *Acta Biologica Szegediensis*, 55(2), 213–217.
- Udayanga, D., & Liu, X. (2012). A multi-locus phylogenetic evaluation of *Diaporthe* (*Phomopsis*). *Fungal Diversity*, 157–171.
- Udayanga, D., Liu, X., McKenzie, E. H. C., Chukeatirote, E., Bahkali, A. H. A., & Hyde, K. D. (2011). The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. *Fungal Diversity*, 50, 189–225.
- Vaidya, G., Lohman, D. J., & Meier, R. (2011). SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics*, 27, 171–180.

- Varela, M. C. (2000). Handbook of the EU concerted action on cork oak. INIA – Estação Florestal Nacional. Portugal.
- Vicente, C., Espada, M., Vieira, P., & Mota, M. (2012). Pine Wilt Disease: a threat to European forestry. *European Journal of Plant Pathology*, 89–99.
- Vilgalys, R., & Hester, M. (1990). Rapid Genetic Identification and Mapping of Enzymatically Amplified Ribosomal DNA from Several *Cryptococcus* Species. *Journal of Bacteriology*, 172(8), 4238–4296.
- Walker, D. M., Castlebury, L. A., Rossman, A. Y., Sogonov, M. V, White, J. F., & Rossman, A. Y. (2010). Systematics of genus *Gnomoniopsis* (Gnomoniaceae, Diaporthales) based on a three gene phylogeny, host associations and morphology. *Mycological Society of America*, 102, 1479–1496.
- Wang, X. W., Houbraken, J., Groenewald, J. Z., Meijer, M., Andersen, B., Nielsen, K. F., Crous P. W. & Samson, R. A. (2016). Diversity and taxonomy of *Chaetomium* and chaetomium-like fungi from indoor environments. *Studies in Mycology*, 84, 145–224.
- Wehmeyer LE (1933) The genus *Diaporthe* Nitschke and its segregates. *University of Michigan Press, Ann Arbor*.
- White, T., J., Bruns, T. D., Lee, S. B. & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 315–322.
- Wingfield, M. J., Brockerhoff, E. G., Wingfield, B. D. & Slippers, B. (2015). Planted forest health: The need for a global strategy. *Science*, 349, 832-836

Yang, Q., Fan, X., Guarnaccia, V., & Tian, C. (2018). High diversity of *Diaporthe* species associated with dieback diseases in China, with twelve new species. *MycKeys*, 39, 97–149.

Zas, R., Sampedro, L., Prada, E., Fernandez-Lopez, J., 2005. Genetic variation of *Pinus pinaster* Ait. seedlings in susceptibility to *Hylobius abietis* L. *Ann. Forest Science*, 62, 681–688.

9. ANEXOS

9.1. Preparação de soluções *stock* para extração de DNA

9.1.1. Tampão TES

Tabela 8 - Preparação de TES

Tampão TES	
Tris 1M; pH=8	10 mg
EDTA 5M; pH=8	2 mg
SDS 10%	20 mg
Água destilada	Até perfazer 100 mL

Após a adição de todos os componentes e da água destilada, procede-se à autoclavagem a 121 °C, por 20 minutos.

9.1.2. NaCl

Tabela 9 - Preparação de NaCl

NaCl	
NaCl	29,22 g
Água destilada	50 mL

Após a adição de todos os componentes e da água destilada para perfazer 100 mL, procede-se à autoclavagem a 121 °C, por 20 minutos.

9.1.3. CTAB

Tabela 10 - Preparação de CTAB

CTAB	
CTAB	10 g
Água destilada	100 mL

Após a adição de todos os componentes procede-se à autoclavagem a 121 °C, por 20 minutos.

9.1.4. NH₄OAc

Tabela 11 - Preparação de NH₄OAc

NH ₄ OAc	
NH ₄ OAc	38,54 g
Água destilada	80 mL

Após a adição de todos os componentes procede-se à autoclavagem a 121 °C, por 20 minutos.

9.1.5. Tampão TE

Tabela 12 - Preparação de tampão TE

TE	
Tris- HCL 1M; pH=8	1 mL
EDTA 0,5M; pH=8	200 µL

Após a adição de todos os componentes e da água destilada a perfazer 100 mL, procede-se à autoclavagem a 121 °C, por 20 minutos.

9.2. Preparação de meios

Tabela 13 - Preparação de meio PDA

Meio PDA para crescimento (Para 1 L de meio)	
PDA	39 g

Após a adição do componente e da água destilada a perfazer 1 L, procede-se à autoclavagem a 121 °C, por 20 minutos.

Tabela 14 - Preparação de meio PDA para esporular

Meio PDA para esporular (Para 1 L de meio)	
PDA	9,76 g
Agar	11,26 g

Após a adição dos componentes e da água destilada a perfazer 1 L, procede-se à autoclavagem a 121 °C, por 20 minutos.

Tabela 15 - Preparação de meio com antibiótico

Meio com antibiótico (Para 0,6 L de meio)	
Tetraciclina	6 mL
Streptomicina	600 µL

Após a adição dos componentes e da água destilada a perfazer 0,6 L, procede-se à autoclavagem a 121 °C, por 20 minutos.

9.3. Preparação do gel de agarose

Tabela 16 - Preparação do gel de agarose

Gel de agarose	
Agarose 1,5 %	1,35 g
TAE 1x	90 mL

Após a adição dos componentes, o frasco é colocado no micro-ondas a descongelar por 8 minutos. Após o arrefecimento é vertido no suporte até solidificar.

9.4. Condições de PCR

Tabela 17 - Temperatura de *emparelhamento*, número de ciclos e respectivos *primers* usados no PCR para cada isolado *Diaporthe*

	<i>tef1-α</i>	<i>tub2</i>	<i>his3</i>	<i>cal</i>
CAA949	48 °C 35x 728F/986R	56 °C 30x Bt2a/Bt2b	60 °C 30x CYCH3F/H3-IB	53 °C 35x CAL-228F/CAL-737R
CAA950	48 °C 35x 728F/986R	54 °C 35x Bt2a/Bt2b	56 °C 35x CYCH3F/H3-IB	48 °C 35x CAL-228F/CAL-737R
CAA951	50 °C 35x 728F/986R	56 °C 30x Bt2a/Bt2b	60 °C 30x CYCH3F/H3-IB	53 °C 30x CAL-228F/CAL-737R
CAA952	48 °C 35x 728F/986R	56 °C 30x Bt2a/Bt2b	60 °C 30x CYCH3F/H3-IB	53 °C 30x CAL-228F/CAL-737R
CAA953	48 °C 35x 728F/986R	56 °C 30x Bt2a/Bt2b	60 °C 30x CYCH3F/H3-IB	53 °C 30x CAL-228F/CAL-737R
CAA954	48 °C 35x 728F/986R	56 °C 35x Bt2a/Bt2b	56 °C 35x CYCH3F/H3-IB	48 °C 35x CAL-228F/CAL-737R
CAA955	52 °C 35x 728F/986R	56 °C 30x Bt2a/Bt2b	60 °C 30x CYCH3F/H3-IB	
CAA956	52 °C 35x 728F/986R	56 °C 30x Bt2a/Bt2b	60 °C 30x CYCH3F/H3-IB	53 °C 30x CAL-228F/CAL-737R

9.5. Dendrograma

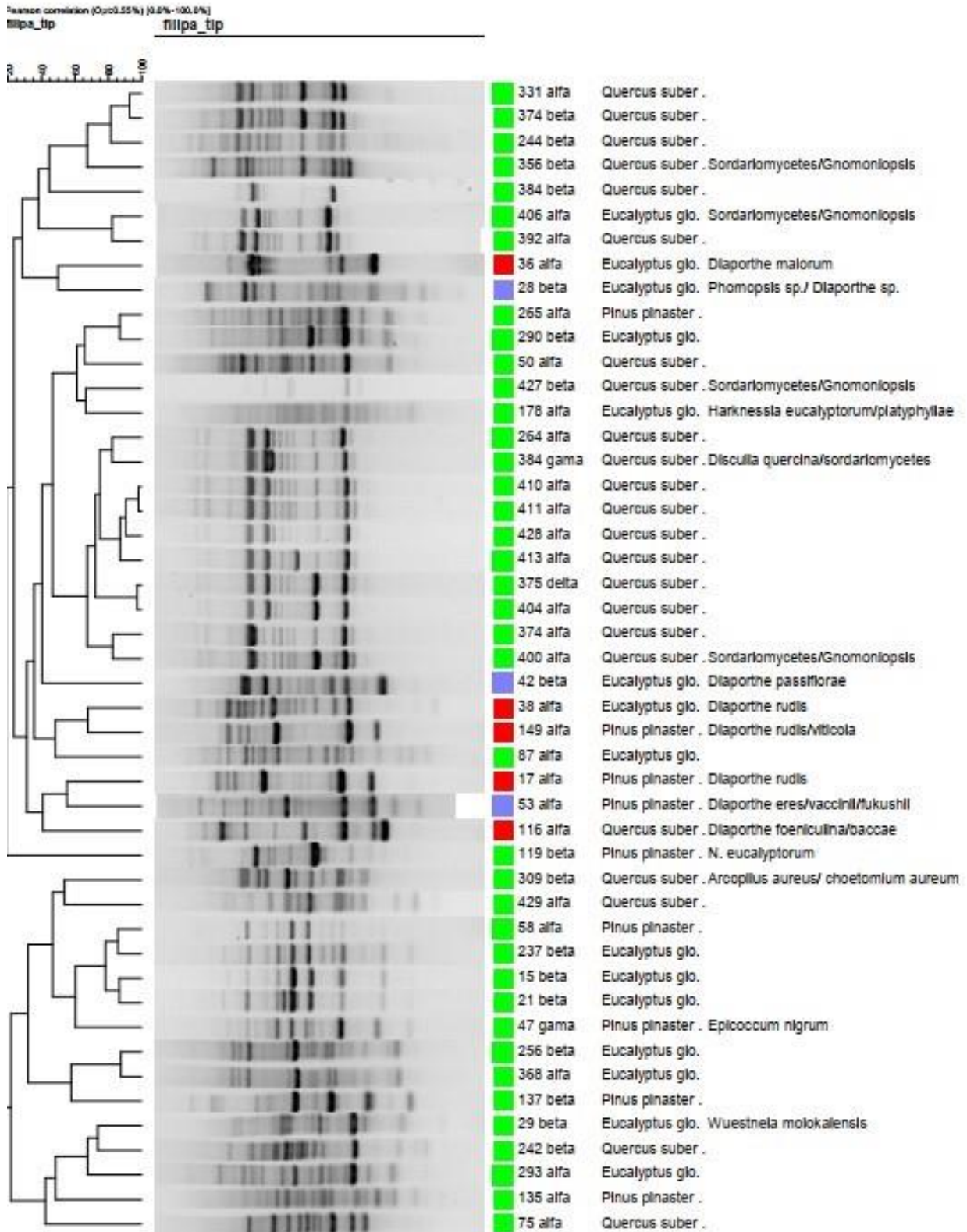


Figura 10 - Dendrograma dos isolados pelo GelCompar II

9.6. Árvore filogenética de espécies *Diaporthe* com base nas sequências de ITS

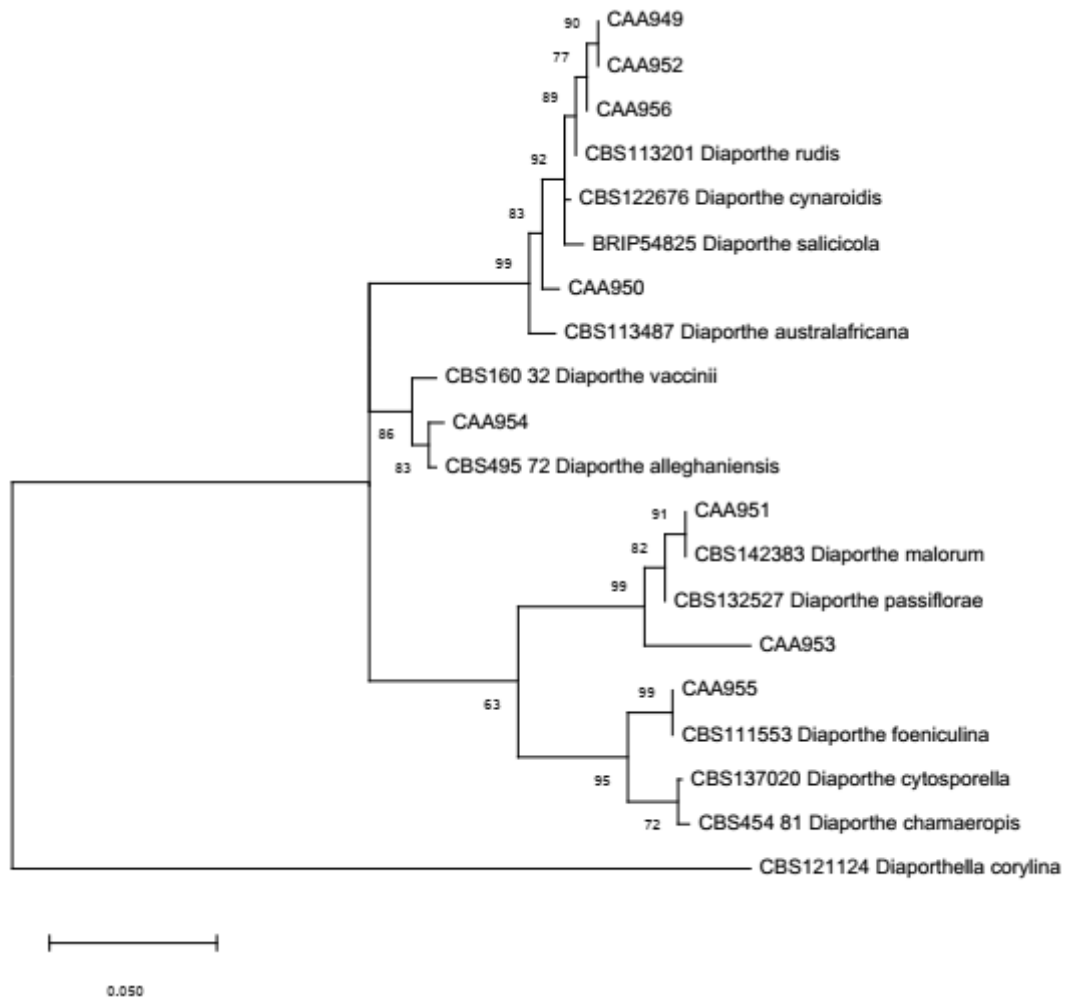


Figura 11 - Árvore filogenética pelo método de Máxima Verossimilhança e modelo Kimura 2-parameter (K2 + G) do gênero *Diaporthe* com base nas sequências ITS