

## **II. Fichas técnicas contendo justificativas para inclusão na lista e metodologias de identificação, preferencialmente moleculares**

### **II.1 *Aecidium glycines***

#### **Classificação taxonômica:**

Reino: Fungi  
Filho: Basidiomycota  
Classe: Pucciniomycetes  
Ordem: Pucciniales  
Família: Pucciniaceae  
Gênero: *Aecidium*  
Espécie: *Aecidium glycines*

#### **Motivo da inclusão na lista:**

O fungo *Aecidium glycines* pertence ao gênero *Aecidium*, da família Pucciniaceae, foi descrito pela primeira vez por Hennings em 1895 e não foi reclassificado taxonomicamente desde então, diferente do que vem ocorrendo com algumas outras espécies do gênero (Kakishima et al., 2018). Desde sua descoberta, *A. glycines* tem sido pouco estudado, principalmente por se tratar de um fungo que só afeta algumas espécies de soja e só foi identificado, até então, em locais muito restritos de alguns países africanos: Quênia, Uganda e Tanzânia. Assim, poucas informações acerca de suas principais características podem ser levantadas. Sabe-se que ele coloniza leguminosas da família Fabaceae, em especial soja, habitando principalmente a superfície inferior das folhas, onde causa manchas escuras de contornos irregulares, mas também no pecíolo e caule (CABI, 2021). Devido às esparsas informações acerca desse fungo, não há relatos, até então, de sua observação em território brasileiro. Entretanto, destaca-se que ele é considerado invasivo em sua área nativa e comprovado como invasivo também fora dela e como existem hospedeiros em outras regiões do mundo com condições ambientais semelhantes, *A. glycines* pode representar uma ameaça às plantas nativas ou agrícolas dessas regiões, se introduzido (CABI, 2021). Dentre essas regiões, inclui-se o Brasil, onde várias outras espécies do gênero *Aecidium*, tais como *A. amazonense*, *A. rionegrense*, *A. eriosematis* e *A. guareae*, foram isoladas como causadoras de ferrugens em folhas de plantas diversas no Amazonas e alguns estados do Norte e Nordeste (Freire et al., 2011; Carvalho et al., 2018) e que, adicionalmente, possui representantes nativos da família afetada por esse fitopatógeno.

#### **Método de identificação:**

Devido aos pouquíssimos estudos e dados disponíveis na literatura acerca do fungo *A. glycines*, ainda não há métodos de identificação moleculares disponíveis para essa espécie, inclusive por não haver sequências de DNA do mesmo depositadas no banco de dados GenBank, mas há sequências depositadas para vários outros membros do gênero. Dessa maneira, em um primeiro momento sugere-se que sempre que houver pedidos de registros de quaisquer outros microrganismos do gênero *Aecidium*, sejam utilizados métodos moleculares para determinar se eles pertencem a outras espécies do gênero. Em alguns trabalhos levantados, outros membros da família Pucciniaceae, inclusive *Aecidium*, puderam ser identificados a partir de sequências do gene que codifica o rRNA: subunidade

pequena (SSU) e subunidade grande (LSU) e regiões do espaçador transcrita interna (ITS), considerando as sequências de diferentes organismos do gênero depositados assim como de outros membros da família Pucciniaceae. Dentre eles, destaca-se e sugere-se, a utilização da abordagem descrita no trabalho de Jitjak & Sanoamung (2018), que utilizou, para essa identificação, diferentes conjuntos de *primers* para essas três regiões, os quais podem ser visualizados na tabela abaixo. Caso haja identificação positiva e sem ambiguidades com outras espécies do gênero, o registro fica garantido, mas caso isso não seja possível, características morfológicas devem ser apresentadas para confirmar que não se trata de *A. glycines*.

Dentre as características apresentadas é obrigatório que estejam contempladas informações dos aecídios (estrutura reprodutiva especializada), que em *A. glycines* são solitários e esparsos, e dos aeciosporos (esporos reprodutivos) que são subglobosos, angulares e de coloração amarela pálida (Hennings, 1895). Caso isso não seja feito ou não seja possível excluir, com base nas características morfológicas, a possibilidade do microrganismo se tratar de *A. glycines*, seu uso fica negado.

<b>Gene/região</b>	<b>Sequências dos primers (<i>forward/reverse</i>)</b>	<b>Referência</b>
SSU	NS1: 5' – GTAGTCATATGCTTGTCTC – 3' NS4: 5' – CTTCCGTCAATTCCCTTAAG – 3'	White et al., 1990
LSU	NL1: 5' – GCATATCAAATAAGCGGAGGAAAAG – 3' NL4: 5' – GGTCCGTGTTCAAGACGG – 3'	Reynolds & Taylor, 1993
ITS	ITS1rustF10d: 5' – TGAACCTGCAGAAGGATCATT – 3' ITS1rustR3c: 5' – TGAGAGCCTAGAGATCCATTGTTA – 3'	Barnes & Szabo, 2007

### **Referências Bibliográficas:**

- Barnes, C. W., & Szabo, L. J. (2007). Detection and identification of four common rust pathogens of cereals and grasses using real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 97(6), 717-727.
- CABI Dataset: *Aecidium glycines*. Disponível em <https://www.cabi.org/isc/datasheet/108965> Acesso em: 29 de janeiro de 2021.
- Carvalho, A. C. D., Sotão, H. M. P., & França, I. F. D. (2018). Fungos causadores de ferrugens (Pucciniales) em plantas da Reserva Florestal Adolpho Ducke, Amazônia Central, Brasil. *Rodriguésia*, 69(2), 663-672.
- Freire, F., Martins, M. V. V., & Cardoso, J. E. (2011). Doenças emergentes da ata ou pinha (*Annona squamosa* L.) no estado do Ceará. Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E).
- Hennings P, 1895. [English title not available]. (Pilze Ostafrikas) In: Die Pflanzenwelt Ostafrikas und der Nachbargebiete [ed. by Engler A] Berlin, Germany: D. Reiwer, 48-61.

Jotjak, W., & Sanoamung, N. (2018). Phylogenetic trees of aecial-stage rust fungus, *Puccinia paederiae* (Ditel) Gorlenko causing gall on *Paederia linearis* Hook f. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*, 15(10), 739-752.

Kakishima, M., Ji, J., & Kasuya, T. (2018). *Puccinia neovelutina* nom. nov., a replaced name for *Aecidium elaeagni* and its new aecial host from Japan. *Phytotaxa*, 336(2), 197-200.

Reynolds, D. R., & Taylor, J. W. (1993). The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics. CAB international.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.

## **II.2 *Apiognomonia errabunda***

### **Classificação taxonômica:**

Reino: Fungi  
Filo: Ascomycota  
Classe: Sordariomycetes  
Ordem: Diaporthales  
Família: Gnomoniaceae  
Gênero: *Apiognomonia*  
Espécie: *Apiognomonia errabunda*

### **Motivo da inclusão na lista:**

*Apiognomonia errabunda* é vista, na verdade, como um complexo de espécies fitopatogênicas que causam a doença antracnose foliar, provocando manchas foliares, decadência de broto, cancros e morte de galhos em uma ampla variedade de plantas (Bahnweg et al., 2005). Dentre as principais espécies do complexo, destaca-se *A. errabunda* stricto sensu, *A. quercina* e *A. tiliae*. Este fitopatógeno afeta folhas de plantas dos gêneros *Castanea*, *Fraxinus*, *Acer*, *Platanus*, *Juglans* e principalmente *Fagus sylvatica* (faia europeia), causando manchas foliares e morte de ramos. *A. quercina* causa essencialmente manchas foliares e morte de brotos em plantas de carvalho e *A. tiliae* afeta predominantemente a espécie *Tilia europaea* (Bahnweg et al., 2005; CABI, 2021). Os fungos do complexo *A. errabunda* ocorrem principalmente na América do Norte e Europa e o nível e gravidade da infecção aumentam em períodos de frio e muita chuva, pois condições quentes e secas reduzem drasticamente sua população (Bahnweg et al., 2005; Olbrich et al., 2010). Eles são considerados espécies invasoras nessas regiões e apresentam várias características de invasibilidade, tais como alta produção e disseminação de esporos, facilidade de adaptação a uma ampla variedade de climas e condições, além de possuir extensa gama de hospedeiros (CABI, 2021). Adicionalmente, estes fungos causam grande impacto econômico porque muitas das espécies de árvores afetadas são utilizadas para produção de madeira. Dessa maneira, mesmo que em seus países de origem esse complexo não seja considerado um patógeno de quarentena, é desejável que essa regulamentação seja realizada em países onde esse patógeno ainda não ocorre e há populações de faias e carvalhos (CABI, 2021). Apesar de não haver relatos de observação de *A. errabunda* em território brasileiro e o país não possuir espécies nativas das principais espécies hospedeiras conhecidos do fungo, sabe-se que ele também afeta uma ampla gama de hospedeiros de diferentes famílias além das Fabaceae, tais como Aceraceae, Hippocastanaceae, Betulaceae, Ulmaceae, dentre outras, sendo que dessa última possuímos representantes nativos do Brasil (Traverso et al., 2003), além de possuir condições favoráveis à infecção do fungo em algumas regiões, motivos pelos quais reforça-se a importância de sua restrição.

### **Método de identificação:**

Sempre que houver pedidos de registro de isolados do gênero *Apiognomonia*, é preciso garantir, devido à restrição de uso, que não se trata de *A. errabunda*. Esse complexo de espécies do gênero *Apiognomonia* vem sendo muito estudado filogeneticamente, justamente com o objetivo de distingui-lo de outros isolados muito similares do gênero, tais como *A. veneta*. Devido a essas similaridades, não se encontraram trabalhos que conseguissem obter uma identificação precisa de *A. errabunda* com a utilização de um único gene, sendo que muitos trabalhos fazem uso de técnicas de tipagem, RFLP e qPCR, dentre outras (Olbrich et al., 2010). Dessa maneira, sugere-se utilizar a abordagem descrita no

trabalho de Sogonov e colaboradores (2007), que se baseia na utilização de *primers* responsáveis pela amplificação de quatro genes, amplificando de forma convencional as sequências de interesse e alinhando-as, após o sequenciamento, para realizar a identificação. Os genes e regiões utilizados para essa identificação foram sequências da região ITS e regiões de íntrons dos genes que codificam a actina, calmodulina e o fator de elongação 1-alfa (TEF). Os *primers* utilizados para amplificar cada um desses genes se encontram descritos na tabela abaixo.

Gene/região	Sequências dos primers ( <i>forward/reverse</i> )	Referências
ITS	ITS1: 5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3' ITS4: 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	White et al., 1990
actina	ACT-512F: 5' - ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC - 3' ACT-783R: 5' - TACGAGTCCTCTGGCCCAT - 3'	Carbone & Kohn (1999)
calmodulina	CAL-228F: 5' - GAGTTCAAGGAGGCCTCTCCC -3' CAL-737R: 5' - CATCTTCTGGCCATCATGG -3'	Carbone & Kohn (1999)
TEF	EF1-728F: 5' - CATCGAGAAGTCGAGAAGG -3' EF1-986R: 5' - TACTTGAAGGAACCCTTACC -3'	Carbone & Kohn (1999)

### Referências Bibliográficas:

CABI Dataset: *Apiognomonia errabunda* (anthracnose). Disponível em <https://www.cabi.org/isc/datasheet/25541> Acesso em: 03 de fevereiro de 2021.

Bahnweg, G., Heller, W., Stich, S., Knappe, C., Betz, G., Heerdt, C., ... & Sandermann Jr, H. (2005). Beech leaf colonization by the endophyte *Apiognomonia errabunda* dramatically depends on light exposure and climatic conditions. *Plant Biology*, 7(6), 659-669.

Carbone, I., & Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91(3), 553-556.

Olbrich, M., Knappe, C., Wenig, M., Gerstner, E., Häberle, K. H., Kitao, M., ... & Bahnweg, G. (2010). Ozone fumigation (twice ambient) reduces leaf infestation following natural and artificial inoculation by the endophytic fungus *Apiognomonia errabunda* of adult European beech trees. *Environmental pollution*, 158(4), 1043-1050.

Sogonov, M. V., Castlebury, L. A., Rossman, A. Y., & White, J. F. (2007). The type species of *Apiognomonia*, *A. veneta*, with its *Discula* anamorph is distinct from *A. errabunda*. *mycological research*, 111(6), 693-709.

Traverso, S. D., Colodel, E. M., Loretti, A. P., Correia, A. M., & Driemeier, D. (2003). Intoxicação natural por *Trema micrantha* em caprinos. *Ciência Rural*, 33(1), 133-136.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.

## II.3 *Apiognomonia erythrostoma*

### Classificação taxonômica:

Reino: Fungi  
Filo: Ascomycota  
Classe: Sordariomycetes  
Ordem: Diaporthales  
Família: Gnomoniaceae  
Gênero: *Apiognomonia*  
Espécie: *Apiognomonia erythrostoma*

### Motivo da inclusão na lista:

O fungo *Apiognomonia erythrostoma* causa a chamada ‘doença da queimadura das folhas’, que provoca manchas irregulares com margens translúcidas-cloróticas e que evoluem para manchas enferrujadas em folhas e frutos de espécies pertencentes ao gênero *Prunus*, principalmente cerejas e damascos (CABI, 2021, Minoia et al., 2014). Essas alterações resultam em murcha e desfolhamento significativo e precoce, queda de frutos e perda de rendimento, principalmente nas épocas do ano nas quais as condições de temperatura e precipitação são favoráveis ao transporte dos ascósporos e desenvolvimento da infecção (CABI, 2021). As principais observações da ocorrência de *A. erythrostoma* são na Europa, mas ele também tem sido relatado no leste da Ásia. Em outros países, inclusive no Brasil, não há registro de sua introdução e presença, mas devido à gravidade da doença que causa e seus impactos econômicos, vários países listam-no como patógeno de quarentena. Essa preocupação é reforçada por suas características de invasibilidade, tais como possuir uma ampla gama de hospedeiros, alto potencial reprodutivo além de ser de difícil detecção e controle (CABI, 2021). Adicionalmente, temos algumas poucas espécies de plantas nativas pertencentes ao gênero *Prunus*, tais como o pessegueiro-bravo, também denominado pessegueiro-do-mato, coração-de-negro, marcela-domato, entre outros (*Prunus myrtifolia*), o qual tem ampla distribuição geográfica e é recomendado para arborização de represas, reposição de matas ciliares em locais sem inundação e o reflorestamento heterogêneo de áreas degradadas (de Eston et al., 2007) e que poderia estar em risco de ser afetado por esse fungo fitopatogênico.

### Método de identificação:

Sempre que houver pedido de registro de isolados do gênero *Apiognomonia*, é preciso garantir, devido à restrição de uso, que não se trate também da espécie *A. erythrostoma*. Entretanto, não há sequências de DNA de *A. erythrostoma* depositadas no GenBank, o que dificulta sua identificação molecular precisa em nível de espécie. Como vários outros organismos do gênero *Apiognomonia* possuem sequências de genes diversos depositadas, recomenda-se que sempre que houver pedidos de registro de quaisquer outros microrganismos do gênero, sejam realizadas reações de PCR com *primers* específicos para identificar se pertencem a outras espécies. Dentre eles, destaca-se e sugere-se a utilização dos *primers* propostos no trabalho de Bahnweg e colaboradores (2005), os quais foram desenhados para amplificar regiões ITS específicas de membros do gênero e servir como um marcador de diagnóstico molecular dos mesmos. Esses *primers* estão descritos na tabela abaixo. Caso haja confirmação precisa de que o microrganismo se trata de qualquer outra espécie do gênero *Apiognomonia* para a qual não se tenha nenhuma restrição, pode-se iniciar o registro. Mas caso não seja possível obter uma identificação precisa em nível de espécie e, consequentemente, excluir

totalmente a possibilidade de se tratar de *A. erythrostoma*, o microrganismo deve ser identificado, de forma complementar, a partir de suas características morfológicas.

Para a apresentação das características morfológicas, principalmente do peritécio, ascos e ascósporos, sugere-se utilizar como base o trabalho de Stoykov & Assyov, (2006). Caso essas informações não sejam apresentadas, ou não seja possível excluir a partir das mesmas a possibilidade do microrganismo se tratar de *A. erythrostoma*, seu uso fica negado.

Primers	Sequências
APIO-f2	5' – ACTCTTGTGTTTGTAATATCATCT – 3'
APIO-r1	5' – GAGGTAAAATTACTACGCTCAA -3'

#### Referências Bibliográficas:

Bahnweg, G., Heller, W., Stich, S., Knappe, C., Betz, G., Heerdt, C., ... & Sandermann Jr, H. (2005). Beech leaf colonization by the endophyte *Apiognomonia errabunda* dramatically depends on light exposure and climatic conditions. *Plant Biology*, 7(6), 659-669.

CABI Dataset: *Apiognomonia erythrostoma* (cherry leaf scorch). Disponível em <https://www.cabi.org/isc/datasheet/25542> Acesso em: 03 de fevereiro de 2021.

de Eston, M. R., Vallilo, M. I., Garbeltonni, M. L., Starzynski, R., & dos Santos, A. S. R. (2007). Aspéctos químicos dos frutos de *Prunus myrtifolia* (L.) Urban,(Rosaceae) –Alimento de algumas aves silvestres1. *Rev. Inst. Flor*, 19(1), 13-18.

Minoia, S., Navarro, B., Covelli, L., Barone, M., Garcia-Becedas, M. T., Ragozzino, A., ... & Di Serio, F. (2014). Viroid-like RNAs from cherry trees affected by leaf scorch disease: Further data supporting their association with mycoviral double-stranded RNAs. *Archives of virology*, 159(3), 589-593.

Stoykov, D., & Assyov, B. (2006). New data on Diaporthales from southwest Bulgaria. *Trakia Journal of Sciences*, 4(3), 1-6.

## **II.4 *Arkoola nigra***

### **Classificação taxonômica:**

Reino: Fungi  
Filo: Ascomycota  
Classe: Dothideomycetes  
Ordem: Venturiales  
Família: Venturiaceae  
Gênero: *Arkoola*  
Espécie: *Arkoola nigra*

### **Motivo da inclusão na lista:**

*Arkoola nigra* é um fungo que causa a ferrugem negra da folha de soja (*Glycine max*) e foi identificado em 1986 após causar perdas substanciais nessa leguminosa. Sabe-se que além da soja ele também é patogênico de outras leguminosas, cultivadas ou selvagens, da família Fabaceae e há evidências de que seja capaz de afetar plantas não leguminosas (CABI, 2021). Ele produz um micélio extenso, ramificado, marrom escuro a preto na superfície das folhas, galhos e vagens da soja, o que resulta em manchas foliares circulares a ovais em ambos os lados da folha, o que pode fazer com que as manchas coalesçam e rasguem facilmente as folhas. Em casos graves ocorre amarelecimento ao redor e entre as lesões e os frutos se tornam encolhidos (Walker & Stovold, 1986). Até o momento, esse fungo só foi confirmado em certas partes da Austrália, entretanto poucas informações a respeito de sua origem natural, ciclo de vida, culturas susceptíveis e dispersão são conhecidas, o que causa a preocupação de que acidentalmente possa se espalhar e causar perdas significativas, ou inclusive, que esteja presente em outras regiões da Austrália e países próximos e que apenas não tenham sido observados (CABI, 2021). Não há relatos de observação do fungo em território brasileiro, entretanto como mencionado pouco se sabe a respeito de sua localização e os limites e impactos negativos que pode causar sobre as culturas e o ecossistema. Sendo assim e aliado ao seu potencial invasivo é importante restringir sua utilização em território brasileiro, no qual condições climáticas favoráveis ao crescimento do fungo tais como umidade e alta precipitação, poderiam representar um risco principalmente às leguminosas nativas brasileiras.

### **Método de identificação:**

*A. nigra* foi taxonomicamente classificado de forma provisória, na família Venturiaceae, com base em características morfológicas, principalmente do ascoma, asco e ascósporo. Entretanto, possui outras características que o tornam incomum nessa família e por isso, nenhum outro organismo foi classificado nesse mesmo gênero, sendo *A. nigra* seu único representante (CABI, 2021). Inclusive, no trabalho de Zhang e colaboradores (2011) é mencionado que não há informação filogenética molecular disponível para o gênero *Arkoola* e sua classificação na família Venturiaceae é muito duvidosa e precisa ser confirmada a partir de informações moleculares. Entretanto, ainda há uma grande restrição à identificação molecular dessa espécie, pois em consulta atual, nenhuma sequência de DNA da mesma se encontra disponível no banco de dados GenBank (GenBank, 2021). Desta maneira, em um primeiro momento sugere-se que sempre que houver pedidos de registros de quaisquer outros microrganismos da família Venturiaceae, sejam utilizados métodos moleculares para confirmar se eles não pertencem a outros gêneros da família. Em alguns trabalhos levantados, outros membros da família Venturiaceae puderam ser identificados a partir de sequências do gene que codifica o rRNA 28S e/ou sequências

diversas da região ITS e, dentre ele, sugere-se a utilização da metodologia descrita no trabalho de Koukol (2010), que avaliou espécies diversas de gêneros dessa família para elucidar sua taxonomia. Os *primers* utilizados para amplificar fragmentos desses genes podem ser visualizados na Tabela abaixo. Caso não seja possível obter identificação positiva com outro gênero da família Venturiaceae, características morfológicas devem ser apresentadas para confirmar que o isolado não se trata de *A. nigra*.

Dentre as características a serem apresentadas destaca-se àquelas relacionadas às hifas, ascos, ascomas e ascósporos, as quais estão descritas e podem ser acessadas no trabalho de Walker & Stovold (1986). Caso isso não seja feito ou não seja possível excluir com base nas características morfológicas a possibilidade do microrganismo se tratar de *A. nigra*, seu uso fica negado.

Gene/região	Sequências dos primers ( <i>forward/reverse</i> )	Referências
ITS	ITS1: 5' – TCCGTAGGTGAAACCTGC GG – 3' ITS4: 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3'	White et al., 1990
LSU	NL1: 5' – GCATATCAATAAGCGGAGGAAG – 3' NL4: 5' – GGTCCGTGTTCAAGACGG – 3'	O'Donnell 1993

### Referências Bibliográficas:

CABI Dataset: *Arkoola nigra*. Disponível em:<https://www.cabi.org/isc/datasheet/109177> Acesso em: 29 de janeiro de 2021.

GenBank. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank> Acesso em: 29 de janeiro de 2021.

Koukol, O. (2010). Revision of “*Septonema ochraceum*” revealed three new species of Venturiaceae and Herpotrichiellaceae. *Mycological Progress*, 9(3), 369-378.

O'Donnell, K.L. 1993. *Fusarium* and its near relatives. In The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics. Edited by D.R. Reynolds and J.W. Taylor. CAB International, Wallingford, U.K. pp. 225–233.

Walker, J., & Stovold, G. E. (1986). *Arkoola nigra* gen. et sp. nov.(Venturiaceae) causing black leaf blight of soybean in Australia. *Transactions of the British Mycological Society*, 87(1), 23-44.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1).

Zhang, Y., Crous, P. W., Schoch, C. L., Bahkali, A. H., Guo, L. D., & Hyde, K. D. (2011). A molecular, morphological and ecological re-appraisal of Venturiales—a new order of Dothideomycetes. *Fungal diversity*, 51(1), 249-277.

## II.5 *Austropuccinia psidii*

### Classificação taxonômica:

Reino: Fungi  
Filo: Basidiomycota  
Classe: Pucciniomycetes  
Ordem: Pucciniales  
Família: Sphaerophragmiaceae  
Gênero: *Austropuccinia*  
Espécie: *Austropuccinia psidii*

### Motivo da inclusão na lista:

O fungo *Austropuccinia psidii* causa ferrugem em mais de 460 espécies de hospedeiros conhecidos dentro da família Myrtaceae e sabe-se da existência de várias cepas ou biótipos da espécie que provocam um grande impacto econômico em mirtáceas cultivadas e nativas. (Langrell et al., 2008; Soewarto et al., 2017). A doença causada pelo fungo pode permanecer assintomática nas plantas por mais de um mês quando as condições de desenvolvimento da infecção não são ideais. Quando a infecção se desenvolve, as lesões aparecem em folhas e brotos jovens, moles e em crescimento ativo, mas também em flores e frutos jovens e não amadurecidos (Soewarto et al., 2017; Berthon et al., 2018). Geralmente os primeiros sinais da infecção são pequenas manchas ou pústulas cloróticas, que aparecem de dois a quatro dias após a infecção, seguido pela produção de massas de esporos (urediniósporos) amarelos brilhantes, os quais vão escurecendo e costumam ter margem roxa ou marrom escura. Essas lesões tendem a ter formato angular estendendo-se pela folha e coalescendo, o que pode causar folhas deformadas, desfolhamento, crescimento atrofiado e, em casos mais graves, até morte da planta (Langrell et al., 2008; Soewarto et al., 2017). Os urediniósporos produzidos pelo fungo podem ser dispersos a longas distâncias pelo vento e animais, o que potencializa sua disseminação e permitiu que ele se espalhasse rapidamente depois de estabelecido em novos países, incluindo a Jamaica. Durante a última década ele invadiu muitas regiões climaticamente favoráveis ao redor do mundo e, por isso, sua presença também foi identificada na América do Sul e do Norte, Austrália, África do Sul, Ásia e Oceania (Soewarto et al., 2017; CABBI, 2021). *A. psidii* foi descrito a primeira vez em *Psidium guajava* no Brasil em 1884 e durante a década de 70 se tornou uma das principais doenças nas plantações de eucalipto do país, sendo por muito tempo chamado de “ferrugem do eucalipto” e mais de cinco biotipos diferentes da espécie foram identificados no país (Soewarto et al., 2017; CABBI, 2021). A combinação de uma ampla gama de hospedeiros, adaptabilidade a diferentes ambientes e facilidade de dispersão a longa distância torna *A. psidii* um patógeno invasivo bem-sucedido e por isso ele é considerado como uma praga de quarentena em muitos países, incluindo Austrália, África do Sul e Nova Zelândia, muitos dos quais também restringem a importação de mirtáceas de países com histórico da doença e impõem medidas de quarentena estritas para evitar sua entrada (CABBI, 2021). Adicionalmente, outras plantas da família Myrtaceae podem vir a ter potencial de serem infectadas pelo fungo, fazendo com que a gama real de hospedeiros seja desconhecida e no país temos diversas plantas nativas dessa família além da goiaba (*Psidium guajava*), que é comprovadamente infectada, tais como o araçá (*Psidium cattleianum*), pitanga (*Eugenia uniflora*), jabuticaba (*Plinia cauliflira*) e várias outras, distribuídas em diferentes gêneros (Langrell et al., 2008; de Lucena et al., 2014), o que torna o uso desse fungo um potencial risco à nossa economia e biodiversidade.

### Método de identificação:

Por muito tempo *A. psidii* foi classificado taxonomicamente no gênero *Puccinia*, da família Pucciniaceae, mas estudos moleculares mais recentes utilizando várias regiões gênicas mostraram que ele não se enquadrava nos limites genéticos dessa família e por isso ele foi reclassificado em 2017 para o novo gênero, *Austropuccinia*, localizado na família redefinida Sphaerophragmiaceae. Assim, sempre que houver pedidos de registro de fungos da família Sphaerophragmiaceae, é necessário confirmar que eles não se tratam especificamente de *A. psidii*. Para essa confirmação, sugere-se utilizar a abordagem descrita no trabalho de Langrell e colaboradores (2008), que desenvolveu um ensaio baseado em PCR que é específico para a espécie utilizando dois conjuntos de *primers* sequenciais, projetados para a região ITS (nested-PCR) e um para porções parciais do rRNA 18S e 28S, os quais foram estabelecidos no trabalho após uma série de testes com diferentes conjuntos desenvolvidos. Os *primers* selecionados se mostraram confiáveis, precisos e sensíveis para a identificação do fungo e se encontram descritos na tabela abaixo:

Gene/região	Sequências dos <i>primers</i> (foward/reverse)
ITS	Ppsi1: TTCTACCTTATTACATGTAGCT Ppsi6: GTCATATTGACAGGTTAGAAGC
ITS	Ppsi2: ATAGTAATTGGTATACGTGGC Ppsi4: GTCAATCCAAATCAAAGTATG
rRNA	PR1: AAATCGTAACAAGGTTCCG PR2: TAAGTTCAGCAGGTTAGTCCC

### Referências Bibliográficas:

Berthon, K., Esperon-Rodriguez, M., Beaumont, L. J., Carnegie, A. J., & Leishman, M. R. (2018). Assessment and prioritisation of plant species at risk from myrtle rust (*Austropuccinia psidii*) under current and future climates in Australia. *Biological Conservation*, 218, 154-162.

CABI Dataset. Disponível em *Austropuccinia psidii* (Myrtle rust): <https://www.cabi.org/isc/datasheet/45846#E044F169-29E8-48EE-8CAE-7875DD4C4F8C>. Acesso em: 07 de fevereiro de 2021.

de Lucena, E. M. P., Alves, R. E., Cisneros-Zevallos, L., LUZ, E., & de BRITO, E. S. (2014). Biodiversidade das Myrtaceae brasileiras adaptadas à Flórida, EUA. Embrapa Agroindústria Tropical-Artigo em periódico indexado (ALICE).

Langrell, S. R. H., Glen, M., & Alfenas, A. C. (2008). Molecular diagnosis of *Puccinia psidii* (guava rust) –a quarantine threat to Australian eucalypt and Myrtaceae biodiversity. *Plant Pathology*, 57(4), 687-701.

Soewarto, J., Carriconde, F., Hugot, N., Bocs, S., Hamelin, C., & Maggia, L. (2018). Impact of *Austropuccinia psidii* in New Caledonia, a biodiversity hotspot. *Forest Pathology*, 48(2), e12402.

## **II.6 *Batrachochytrium dendrobatidis***

### **Classificação taxonômica:**

Reino: Fungi  
Filo: Chytridiomycota  
Classe: Chytridiomycetes  
Ordem: Rhizophydiales  
Família: Chytridiaceae  
Gênero: *Batrachochytrium*  
Espécie: *Batrachochytrium dendrobatidis*

### **Motivo da inclusão na lista:**

O fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) é um patógeno que afeta diversas espécies de anfíbios, causando uma doença epidérmica infecciosa emergente potencialmente fatal chamada de quitridiomicose (Piotrowski et al., 2004; Boyle et al., 2007). O fungo infecta duas ordens de anfíbios (Anura e Caudata), 14 famílias e pelo menos 200 espécies, tendo sido relacionado à extinção de pelo menos uma espécie (Boyle et al., 2007). O fungo, após infecção, passa a viver no interior de células epidérmicas queratinizadas dos anfíbios e, em condições ambientais favoráveis, leva ao desenvolvimento da doença e morte dos animais (Piotrowski et al., 2004). O mecanismo exato a partir do qual ocorre a doença é um pouco incerto, mas sabe-se que a infecção quase sempre causa hiperqueratose nas células epidérmicas e outras alterações incluem hiperplasia multifocal irregular, desordenação das camadas de células epidérmicas, esporangiose, erosões, levantamentos da epiderme e ulcerações ocasionais na pele (Berger et al., 2005). Adicionalmente, alguns trabalhos mostraram que o fungo possui adaptações que sugerem que ele evoluiu há muito tempo dentro das células no tecido da epiderme estratificada. Entretanto, mais informações a respeito da origem do agente, suas informações fisiológicas e as rotas de transmissão ainda são necessárias (Berger et al., 2005; Hyatt et al., 2007). Os efeitos de *B. dendrobatidis* têm sido devastadores em algumas populações de anfíbios e por isso é considerada a doença mais mortal documentada em anfíbios (Boyle et al., 2007). Sua ocorrência implicou no declínio das populações desses organismos em uma ampla gama de habitats em vários países, como Austrália, Nova Zelândia, Estados Unidos, Espanha e Alemanha e em diversos países da América Central e da América do Sul, sendo a Ásia, o único continente no qual ainda não foi identificado (Piotrowski et al., 2004; Berger et al., 2005; Boyle et al., 2007). Devido à gravidade, a doença foi reconhecida pela Organização Internacional das Epizootias (OIE), grupo *ad hoc* de doenças de anfíbios, como um dos dois patógenos de grande importância no comércio internacional desses animais (Boyle et al., 2007). Vários outros países, como a Austrália, listam a doença em Leis de Proteção Ambiental, a fim de maximizar as chances de sobrevivência, a longo prazo na natureza, das espécies nativas e comunidades ecológicas afetadas pelo processo (Boyle et al., 2007). Até o início dos anos 2000 ainda não haviam relatos da ocorrência do fungo no Brasil, porém estudos subsequentes demonstraram sua presença em uma espécie de anuro brasileiro, *Hylodes magalhaesi*, que é nativo e endêmico do Brasil, e, posteriormente em pelo menos outras 5 espécies (Toledo et al., 2006a). O país figura como um dos mais ricos do mundo no que diz respeito à diversidade de anfíbios e, por isso, há uma grande preocupação quanto ao alto risco de extinção de fauna da Mata Atlântica brasileira (Toledo et al., 2006b). Devido à gravidade da doença, a qual pode apresentar taxas de mortalidade dos anfíbios de até 100% em surtos naturais e em cativeiros e seu potencial, inclusive, de levar à extinção de

espécies, é importante evitar a utilização e disseminação de *B. dendrobatidis* em território brasileiro, como forma de preservar e proteger as espécies de anfíbios nativos.

### Método de identificação:

Considerando a restrição de uso, em pedidos de registros de fungos do gênero *Batrachochytrium* é importante a confirmação de que não se trata da espécie *B. dendrobatidis*. Para sua identificação vários ensaios moleculares foram propostos, a grande maioria envolvendo qPCR, sendo as condições desenvolvidas no trabalho de Boyle e colaboradores (2004), as mais rotineiramente utilizadas em laboratórios diagnósticos. Entretanto, no trabalho de Garland e colaboradores (2011), que comparou a sensibilidade entre a detecção de *B. dendrobatidis* por meio de PCR convencional e qPCR utilizando o sistema Taqman, foi demonstrado que a PCR convencional pode ser tão sensível quanto a qPCR, sendo esse um método mais indicado quando apenas a detecção e identificação do fungo é necessária. Dessa maneira, devido também à sua maior simplicidade, sugere-se utilizar a abordagem descrita no referido trabalho, a qual utilizou os *primers* desenhados no trabalho de Boyle e colaboradores (2004) para amplificar regiões do ITS e do rRNA 5,8S e que estão listados na tabela abaixo, porém em condições de ciclagem adaptadas.

Primers	Sequências
ITS1-3 Chytr	5' – CCTTGATATAATAACAGTGTGCCATATGTC - 3'
5.8S Chytr	5'- TCGGTTCTCTAGGCAACAGTTT – 3'

### Referências Bibliográficas:

- Berger, L., Hyatt, A. D., Speare, R., & Longcore, J. E. (2005). Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of aquatic organisms*, 68(1), 51-63.
- Boyle, A. H. D., Olsen, V., Boyle, D. B., Berger, L., Obendorf, D., Dalton, A., ... & Colling, A. (2007). Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of aquatic organisms*, 73(3), 175-192.
- Garland, S., Wood, J., & Skerratt, L. F. (2011). Comparison of sensitivity between real-time detection of a TaqMan assay for *Batrachochytrium dendrobatidis* and conventional detection. *Diseases of aquatic organisms*, 94(2), 101-105.
- Piotrowski, J. S., Annis, S. L., & Longcore, J. E. (2004). Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*, 96(1), 9-15.
- Toledo, L. F., Britto, F. B., Araújo, O. G., Giasson, L. M., & Haddad, C. F. (2006a). The occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil and the inclusion of 17 new cases of infection. *South American Journal of Herpetology*, 1(3), 185-191.

Toledo, L. F., Haddad, C. F. B., Carnaval, A. C. O. Q., & Britto, F. B. (2006)b. A Brazilian anuran (*Hylodes magalhaesi*: Leptodactylidae) infected by *Batrachochytrium dendrobatidis*: a conservation concern. *Amphibian and Reptile Conservation*, 4(1), 17-21.

## **II.7 *Batrachochytrium salamandrivorans***

### **Classificação taxonômica:**

Reino: Fungi  
Filo: Chytridiomycota  
Classe: Chytridiomycetes  
Ordem: Rhizophydiales  
Família: Chytridiaceae  
Gênero: *Batrachochytrium*  
Espécie: *Batrachochytrium salamandrivorans*

### **Motivo da inclusão na lista:**

*Batrachochytrium salamandrivorans* é um fungo quitrídeo patógeno emergente, responsável por causar uma doença infecciosa que recentemente se tornou uma ameaça na Europa e vem causando um declínio maciço na população de salamandras nativas, principalmente as salamandras de fogo (*Salamandra salamandra*), levando-as quase à extinção em alguns países europeus, como a Holanda e Bélgica (Martel et al., 2013; Gray et al., 2015). O primeiro relato da doença é de 2013, quando a morte maciça de populações de salamandras na Europa foi investigada e não pôde ser relacionada ao principal quitrídeo conhecido por parasitar esses organismos, *B. dendrobatidis* (Martel et al., 2013). Entretanto, os primeiros indícios demonstram que o patógeno teria se originado na Ásia e pode ter sido introduzido por humanos em populações selvagens da Europa através do comércio de anfíbios (Gray et al., 2015). *B. salamandrivorans* parasita as células epidérmicas das salamandras da ordem Urodela e também causa ulcerações na pele com degradação significativa da epiderme, levando a perda da sua integridade e comprometimento das funções vitais da pele, o que ocasiona a rápida mortalidade de salamandras infectadas. Porém, mais informações acerca da fisiologia e modo de transmissão do parasita ainda são necessárias (Gray et al., 2015; Thomas et al., 2018). Estudos moleculares demonstraram que esse táxon é filogeneticamente relacionado a *B. dendrobatidis*, formando com ele um clado de quitridiomictos bem suportado, adaptado a hospedeiros vertebrados e altamente patogênico para anfíbios, porém que ocupa nicho diferente deles. Em conjunto, as duas espécies de fungo têm resultado na extirpação de mais de 40 espécies de anfíbios em áreas na América Central, além de perdas generalizadas na Europa, Austrália e América do Norte (Martel et al., 2013). Até o momento, o patógeno só foi identificado em alguns países europeus, mas vários trabalhos levantam o risco que a sua disseminação pode causar às populações de salamandras nativas de outros continentes e a importância de desenvolver estratégias que evitem sua disseminação (Gray et al., 2015; Thomas et al., 2018). No Brasil há em torno de cinco espécies de salamandras nativas identificadas: *B. altamazonica*, *B. paraensis*, de *B. caldwellae sp. nov.*, *B. madeira sp. nov.* e *B. tapajonica sp. Nov*, todas habitantes da região Amazônica (UFSC, 2013), e deve-se também garantir sua preservação, motivo pelo qual é importante evitar a entrada e, principalmente, utilização e disseminação de *B. salamandrivorans*.

### **Método de identificação:**

Sempre que houver pedidos de registro de fungos do gênero *Batrachochytrium* é preciso garantir também que eles não se tratem da espécie *B. salamandrivorans*. Apesar de ser um fungo identificado recentemente, há alguns ensaios moleculares disponíveis para sua identificação utilizando-se não só regiões dos genes que codificam os RNAs ribossômicos e a região ITS, mas também dos genes que codificam o fator de elongação 1-alfa, alfa-centrina, cisteína tRNA sintetase, gliceraldeído-3-fosfato-

desidrogenase, beta tubulina, dentre outros, sendo a maioria deles baseados em qPCR (Verbrugghe et al., 2019). Entretanto, Martel e colaboradores (2013) desenvolveram um par de *primers* para amplificar porções do gene que codifica o rRNA 5.8S de *B. salamandivorans* e utilizaram para isso apenas ensaios de PCR convencional. Sugere-se utilizar esses *primers*, que se encontram descritos na tabela abaixo, para se garantir que a espécie a ser registrada não se trate de *B. salamandivorans*. Entretanto, destaca-se que, posteriormente, outros trabalhos aperfeiçoaram esse método, utilizando esses mesmos *primers*, mas também sondas desenhadas a partir do gene rRNA 5.8S, de forma que eles pudessem ser utilizados nos ensaios de qPCR com o sistema Taqman, os quais permitem uma detecção ainda mais precisa, caso seja necessário (Blooi et al., 2013).

<i>Primers</i>	Sequências
STerF	5' - TGCTCCATCTCCCCCTTTCA - 3'
STerR	5' - TGAACGCACATTGCACTCTAC - 3'

### Referências Bibliográficas:

- Blooi, M., Pasmans, F., Longcore, J. E., Spitzen-Van Der Sluijs, A., Vercammen, F., & Martel, A. (2013). Duplex real-time PCR for rapid simultaneous detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Batrachochytrium salamandivorans* in amphibian samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(12), 4173-4177.
- Gray, M. J., Lewis, J. P., Nanjappa, P., Klocke, B., Pasmans, F., Martel, A., ... & Olson, D. H. (2015). *Batrachochytrium salamandivorans*: the North American response and a call for action. *PLoS pathogens*, 11(12), e1005251.
- Martel, A., Spitzen-van der Sluijs, A., Blooi, M., Bert, W., Ducatelle, R., Fisher, M. C., ... & Pasmans, F. (2013). *Batrachochytrium salamandivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(38), 15325-15329.
- Thomas, V., Blooi, M., Van Rooij, P., Van Praet, S., Verbrugghe, E., Grasselli, E., ... & Martel, A. (2018). Recommendations on diagnostic tools for *Batrachochytrium salamandivorans*. *Transboundary and emerging diseases*, 65(2), e478-e488.
- UFSC. Três espécies de salamandas são descobertas na Amazônia brasileira. Disponível em: <https://noticias.ufsc.br/2013/08/tres-especies-de-salamandas-sao-descobertas-na-amazonia-brasileira-2/> Acesso 08/02/2021.
- Verbrugghe, E., Pasmans, F., & Martel, A. (2019). Reference gene screening of *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Batrachochytrium salamandivorans* for quantitative real-time PCR studies. *Scientific reports*, 9(1), 1-11.

## **II.8 *Botryosphaeria berengeriana* f.sp. *pyricola***

### **Classificação taxonômica:**

Reino: Fungi  
Filo: Ascomycota  
Classe: Dothideomycetes  
Ordem: Botryosphaerales  
Família: Botryosphaeriaceae  
Gênero: *Botryosphaeria*  
Espécie: *Botryosphaeria berengeriana* f.sp. *pyricola*

### **Motivo da inclusão na lista:**

*Botryosphaeria berengeriana* f.sp. *pyricola* causa uma doença denominada câncer de *Physalospora* em frutos de pera e maçã, tendo também alguns relatos de outras frutas afetadas tais como uvas e pêssegos, todas da família Rosaceae (CABI, 2021). O fungo forma protuberâncias semelhantes a verrugas (casca de verruga) na superfície de troncos e ramos, que são subsequentemente rodeados por manchas castanhas-escuras. Além disso, grandes manchas marrom-escuras também são formadas nas folhas e nos frutos. As verrugas nos troncos e galhos danificam a árvore reduzindo seu crescimento e produtividade e os galhos infectados eventualmente murcham e morrem. Nos frutos as manchas desenvolvem-se ainda mais após a colheita, causando perda na qualidade dos frutos (Kexiang et al., 2002; CABI, 2021). A taxonomia de *B. berengeriana* ainda é um pouco confusa. Alguns autores consideravam que ele é sinônimo de *B. dothidea*, que é o patógeno responsável por causar a podridão branca, entretanto outros autores argumentam que pelas características diferenciadas em relação à sua fisiologia e os sintomas da doença que causam, seriam espécies distintas (Slippers et al., 2004). Outros autores consideram que na verdade *B. berengeriana* seria sinônimo de *B. ribs* (Brown & Britton, 1986). Aparentemente não há um consenso, mas a maioria dos trabalhos tem considerado que *B. berengeriana* e *B. dothidea* sejam realmente a mesma espécie porque vários autores não conseguiram encontrar nenhuma diferença entre esses fungos (Ogata et al., 2000; Al-Haq et al., 2002; Slippers et al., 2004). *B. berengeriana* só foi identificado como tal até o momento no leste da Ásia, afetando os frutos nesta região. Entretanto, *B. dothidea* é amplamente distribuído em quase todos os continentes, assim seguindo a corrente de pesquisadores que os consideram o mesmo organismo, ele também estaria amplamente distribuído (CABI, 2021). *B. berengeriana* não é considerado uma praga quarentenária por nenhuma organização regional de plantas, mas está listado nos regulamentos da União Europeia e também nos EUA, que o considera um risco a todos os países produtores de peras e maçãs (CABI, 2021). No Brasil, não há relatos da presença desse fungo, mas além dele representar um risco econômico devido às perdas nos cultivos das frutas afetadas, temos algumas espécies nativas da família Rosaceae, como o pessegueiro-bravo, *Prunus myrtifolia*, árvore de porte médio e muito difundida em nosso território devido à disseminação dos seus frutos pelas aves e mamíferos (de Eston et al., 2007). Por esse motivo, reforça-se a importância de impedir a utilização de *B. berengeriana* em território brasileiro.

### Método de identificação:

Como comentado anteriormente, ainda existem muitas dúvidas a respeito da identificação precisa de *B. berengeriana* e não há no GenBank nenhuma sequência de DNA depositada para essa espécie porque os depósitos de cepas causadoras dos sintomas relatados para esse fungo foram realizados como *B. dothidea*, que é possivelmente seu sinônimo, como anteriormente mencionado. Dessa maneira, sugere-se que sempre que houver pedidos de registro de fungos do gênero *Botryosphaeria*, sejam realizados protocolos que garantam que não se trate de *B. berengeriana* ou *B. dothidea*. Dentre eles, sugere-se utilizar a abordagem descrita no trabalho de Phillips e colaboradores (2013), que estudaram diferentes gêneros da família Botryosphaeriaceae e definiram que para a identificação confiável de *Botryosphaeria dothidea*, e outras espécies desse gênero, devem ser realizados ensaios de PCR convencional a partir da amplificação de uma combinação de regiões/genes: o rDNA 18S (SSU), porções da região ITS + os domínios variáveis D1 e D2 do rDNA 28S (LSU), fator de elongação alfa (TEF) e beta tubulina (TUB). Os *primers* utilizados para amplificar cada uma dessas regiões estão descritos na tabela abaixo.

Gene/região	Sequências dos <i>primers</i> (forward/reverse)	Referência
SSU	NS1: 5' – GTAGTCATATGCTTGTCTC – 3' NS4: 5' – CTTCCGTCAATTCTTAAG – 3'	Phillips et al., 2008
LSU	ITS1: 5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3' NL4: 5' – GGTCCGTGTTCAAGACGG – 3'	Alves et al., 2004
TEF	EF1-688F: 5'- CGGTCACTTGATCTACAAGTGC -3' EF1-986R: 5' - TACTTGAAGGAACCCTTACC -3'	Alves et al., 2006
TUB	Bt2a: 5' – GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTC – 3' Bt2b: 5' – ACCCTCAGTGTAGTGACCCCTGGC – 3'	Alves et al., 2008

### Referências Bibliográficas:

- Al-Haq, M. I., Seo, Y., Oshita, S., & Kawagoe, Y. (2002). Disinfection effects of electrolyzed oxidizing water on suppressing fruit rot of pear caused by *Botryosphaeria berengeriana*. *Food Research International*, 35(7), 657-664.
- 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 multila*. *Mycologia*, 96(3), 598-613.
- Alves, A., Correia, A., & Phillips, A. J. (2006). Multi-gene genealogies and morphological data support *Diplodia cupressi* sp. nov., previously recognized as *D. pinea* f. sp. *cupressi*, as a distinct species. *Fungal Diversity*, 23, 1-15.
- 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.
- de Eston, M. R., Vallilo, M. I., Garbelloti, M. L., Starzynski, R., & dos Santos, A. S. R. (2007). Aspectos químicos dos frutos de *Prunus myrtifolia* (L.) Urban, (Rosaceae) – Alimento de algumas aves silvestres. *Rev. Inst. Flor*, 19(1), 13-18.

Ogata, T., Sano, T., & Harada, Y. (2000). *Botryosphaeria* spp. isolated from apple and several deciduous fruit trees are divided into three groups based on the production of warts on twigs, size of conidia, and nucleotide sequences of nuclear ribosomal DNA ITS regions. *Mycoscience*, 41(4), 331-337.

Phillips, A. J. L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2013). The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in mycology*, 76, 51-167.

Slippers, B., Crous, P. W., Denman, S., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D., & Wingfield, M. J. (2004). Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia*, 96(1), 83-101.

## **II.9 *Botryotinia porri***

### **Classificação taxonômica:**

Reino: Fungi  
Filo: Ascomycota  
Classe: Leotiomycetes  
Ordem: Helotiales  
Família: Sclerotiniaceae  
Gênero: *Botryotinia*  
Espécie: *Botryotinia porri*

### **Motivo da inclusão na lista:**

O fungo *Botryotinia porri*, cuja forma anamórfica é *Botrytis porri*, tem sido relatado como o responsável por causar o apodrecimento em cultivares de alho, alho-poró e, segundo alguns estudos mais recentes, também no cravo-da-índia (Zhang et al., 2010; Wu et al., 2012; CABI, 2021). As folhas e bulbos das plantas são invadidos pelo fungo e passam a apresentar a presença de bolores cinzas, causando manchas nas flores, podridão do bulbo e até mesmo a morte não só da folha, mas de todas as partes da planta acima do solo durante a estação de crescimento ou no período de pós-colheita (Wu et al., 2012; CABI, 2021). Por se espalhar facilmente, uma grande proporção das plantas em campos de cultivo é afetada, diminuindo o rendimento das plantas jovens (Zhang et al., 2009). Dessa maneira, a doença causada por esse fungo é um dos fatores ecológicos mais limitantes tanto no rendimento quanto na qualidade das safras de alho (Wu et al., 2012). Os principais registros de ocorrência da espécie *Botryotinia porri* são de países europeus e da América do Norte, mas também há relatos em alguns países da América do Sul, da Ásia e Oceania (Zhang et al., 2009; CABI, 2021). Entretanto, de modo geral, pode-se considerar que a ocorrência da espécie, até então, não foi relatada em muitas áreas do mundo onde espécies de alho são cultivadas e por isso, acredita-se que ela tenha grande potencial de expansão para novas áreas, principalmente em locais com clima ambiental mais frio, o que favorece o desenvolvimento da doença. O fungo se espalha facilmente pela dispersão dos ascósporos e conídios pelo vento e chuva (Zhang et al., 2010; CABI, 2021). No Brasil, não foram encontrados relatos que confirmem a presença de *B. porri*, apenas de outras espécies do gênero *Botrytis*. Adicionalmente, não há a presença de alhos nativos brasileiros, apenas do chamado “alho do mato” (*Cipura paludosa*), que é uma planta medicinal da família das iridáceas encontrada no estado do Amazonas e só possui proximidade taxonômica com o alho e alho poró no nível de ordem: Asparagales (Silva-Neto et al., 2014). Por outro lado, temos várias espécies nativas da família do alho e alho-poró: Amaryllidaceae (Alves-Araújo et al., 2007), e como o número de estudos acerca dos potenciais hospedeiros desse fungo ainda é limitado e o mesmo possui características de invisibilidade, as quais facilitam sua disseminação, acredita-se ser importante limitar sua utilização em nosso território.

### **Método de identificação:**

Sempre que houver pedidos de registro de fungos do gênero *Botryotinia/Botrytis*, é preciso garantir que não se trate de *Botryotinia/Botrytis porri*. Para tal é necessário promover a identificação precisa dessa espécie e diferentes genes e regiões foram utilizados para esse fim, tais como regiões ITS, a β-tubulina (TUB), a segunda maior subunidade da RNA polimerase II (RPB2), o gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (G3PDH), a proteína 60 de choque térmico (HSP60), dentre outros. Considerando-se os trabalhos levantados, sugere-se utilizar a abordagem descrita no trabalho de Zhang e colaboradores

(2010), que não só identificaram, mas fizeram toda análise filogenética das espécies pertencentes ao gênero *Botrytis* utilizando para tal a região ITS e os genes G3PDH, HSP60 e RPB2 a partir de PCR convencional. Os *primers* a serem utilizados para amplificar cada um desses genes/regiones se encontram descritos na tabela abaixo:

	<b>Sequências dos <i>primers</i> (forward/reverse)</b>	<b>Referências</b>
ITS	ITS1: 5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3' ITS4: 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3'	White et al., 1990
G3PDH	G3PDHfor: 5' – ATTGACATCGTCGCTGTCAACGA – 3' G3PDHrev: 5' – ACCCCACTCGTTGTCGTACCA – 3'	Staats et al., 2005
HSP60	HSP60for: 5' – CAACAATTGAGATTGCCACAAG – 3' HSP60rev: 5' – GATGGATCCAGTGGTACCGAGCAT – 3'	Staats et al., 2005
RPB2	RPB2for: 5' – GATGATCGTGATCATTGCG – 3' RPB2rev: 5' – CCCATAGCTTGCTTACCCAT – 3'	Staats et al., 2005

### **Referências Bibliográficas:**

Alves-Araújo, A., Santos, F. D. A. R. D., & Marccus, A. (2007). Caracterização palinológica de espécies de Amaryllidaceae sensu stricto ocorrentes no nordeste brasileiro. *Acta Botanica Brasilica*, 21(4), 967-976.

CABI Dataset: *Botryotinia porri* (podridão do alho). Disponível em <https://www.cabi.org/isc/datasheet/9610>. Acesso em: 14 de fevereiro de 2021.

Silva Neto, J. A. P. D., Menezes, L. D., Gomes, G. O., Cunha, E. M. F., Azevedo, M. S. D., Ferreira, V. M., & Silva, M. V. D. (2014). Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activities of the topical preparation of *Cipura paludosa* (Iridaceae). *Acta Amazonica*, 44(2), 263-270.

Staats, M., van Baarlen, P., & van Kan, J. A. (2005). Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular biology and Evolution*, 22(2), 333-346.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1).

Wu, M., Jin, F., Zhang, J., Yang, L., Jiang, D., & Li, G. (2012). Characterization of a novel bipartite double-stranded RNA mycovirus conferring hypovirulence in the phytopathogenic fungus *Botrytis porri*. *Journal of virology*, 86(12), 6605-6619.

Zhang et al., 2009. First Report of Garlic Leaf Blight Caused by *Botrytis porri* in China. *Plant disease*, 93(11), 1216-1216. Disponível em <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-93-11-1216B>. Acesso em 14 de fevereiro 2021.

Zhang, J., Zhang, L., Li, G. Q., Yang, L., Jiang, D. H., Zhuang, W. Y., & Huang, H. C. (2010). *Botrytis sinoallii*: a new species of the grey mould pathogen on *Allium crops* in China. *Mycoscience*, 51(6), 421-431.

## **II.10 *Calonectria pseudonaviculata***

### **Classificação taxonômica:**

Reino: Fungi  
Filo: Ascomycota  
Classe: Sordariomycetes  
Ordem: Hypocreales  
Família: Nectriaceae  
Gênero: *Calonectria*  
Espécie: *Calonectria pseudonaviculata*

### **Motivo da inclusão na lista:**

*Calonectria pseudonaviculata* é uma espécie de fungo identificado em 1994 no Reino Unido como sendo responsável por causar a ‘nova doença do Buxo’, doença devastadora em plantas do gênero *Buxus*, que são comumente utilizadas em jardins e paisagismo. Algumas espécies de *Buxus* como *B. sempervirens*, *B. microphylla* e *B. sinica* var. *insularis* são sabidamente hospedeiros do fungo, mas diferentes plantas desse gênero e ainda outras da família Buxaceae, presente em todos os continentes, são consideradas suscetíveis, de forma que sua gama total de hospedeiros ainda não é conhecida (LaMondia, 2013; CABI, 2021). Nas plantas afetadas e em condições ambientais favoráveis *C. pseudonaviculata* causa sintomas nas folhas e caule parecidos com o da ferrugem, tais como manchas marrom-escuras que podem coalescer e cobrir totalmente as folhas, além de estrias pretas nos caules que parecem progredir da parte inferior para o topo da planta, podendo resultar em desfolhamento severo, que afeta a estética dessas plantas, e até sua morte (LaMondia, 2015; Gehesquiere et al., 2016; CABI, 2021). A origem de *C. pseudonaviculata* não é conhecida e inicialmente ele foi denominado como *Cylindrocladium pseudonaviculatum*, sendo renomeado em 2010, mas é considerado na Europa como uma espécie exótica introduzida, provavelmente transportada em plantas infectadas assintomáticas e materiais de propagação, estando presente em vários países europeus (Crous et al., 2002; Lombard et al., 2010; CABI, 2021). Não se têm muitas informações do ciclo de vida do fungo, mas sabe-se que ele sobrevive bem em restos de plantas e provavelmente também no solo (CABI, 2021). Além de estar disseminado no Reino Unido, e em outros países europeus como Bélgica, Irlanda, Holanda, Alemanha, Itália, Áustria e Espanha, o que sugere que ele se espalhou do Reino Unido para a Europa continental, também foi identificado na Nova Zelândia e em alguns países da Ásia e América do Norte (LaMondia, 2013; Gehesquiere et al., 2016). No Brasil, várias espécies do gênero *Calonectria* foram identificadas, tais como *C. brachiatica*, *C. brassiana*, *C. candelabra*, *C. brasiliensis*, dentre outras, afetando importantes cultivos como batata, acerola, manga, soja, além das plantas ornamentais (Alfenas et al., 2015), mas ainda não há relatos da identificação, especificamente, de *C. pseudonaviculata*. Por ser um fungo que causa grande impacto econômico, possui várias características de invasibilidade, tais como crescimento rápido, alto potencial reprodutivo, vida longa, grande facilidade de dispersão, dificuldade de detecção e que tem potencial de afetar mais de um hospedeiro, alguns dos quais desconhecidos (LaMondia, 2013; CABI, 2021), destaca-se a importância de evitar sua introdução e disseminação em território brasileiro.

### **Método de identificação:**

Considerando a restrição de uso, sugere-se que sempre que houver pedidos de registro de fungos pertencentes a espécies do gênero *Calonectria*, sejam utilizadas técnicas de identificação que permitam garantir que não se trate de *C. pseudonaviculata*. De acordo com os trabalhos levantados, os principais genes e regiões utilizados para a identificação de espécies do gênero *Calonectria*, incluindo *C. pseudonaviculata*, são, além de ITS, fragmentos de histonas (His3), fator de elongação 1- $\alpha$  (TEF), calmodulina (cmdA), actina (AC), beta tubulina (TUB) e mating type (MAT1-2-1) (Gehesquiere et al., 2016; Jayawardena et al., 2019). Dessa maneira, sugere-se utilizar para realizar a precisa identificação da espécie, a abordagem descrita no trabalho de Gehesquiere e colaboradores (2016), com ensaios *multilocus* de PCR convencional visando amplificar fragmentos de quase todos esses genes/regiões: ITS, His3, cmdA, TUB e MAT1-2-1, utilizando para tal *primers* específicos desenhados em trabalhos anteriores para cada um deles. A descrição desses *primers* pode ser visualizada na tabela abaixo:

Gene/região	Sequências dos <i>primers</i> (forward/reverse)	Referências
ITS	ITS1: 5' – TCCGTAGGTGAACCTGC GG – 3' ITS4: 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3'	White et al., 1990
TUB	T1: 5'- AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3' T2: 5'- TAGTGACCCTGGGCCAGTTG-3'	O'Donnell & Cigelnik 1997
cmdA	CAL-228F: 5' - GAGTTCAAGGAGGCCTCTCCC -3' CAL-737R: 5' - CATCTTCTGGCCATCATGG -3'	Carbone & Kohn, 1999
His3	H3-1A: 5'- ACTAAGCAGACCGCCCGCAGG – 3' H3-1B: 5' – GCGGGCGAGCTGGATGTCCTT – 3'	Glass & Donaldson, 1995
MAT1-2-1	ColHMG1: 5' – CCAGATGCTGAAGCAGCTCAACC – 3' ColHMG2: 5' – GCTTCTTGATGAGCTCAGCC – 3'	Schoch et al., 2000

### **Referências Bibliográficas:**

Alfenas, R. F., Lombard, L., Pereira, O. L., Alfenas, A. C., & Crous, P. W. (2015). Diversity and potential impact of *Calonectria* species in *Eucalyptus* plantations in Brazil. *Studies in Mycology*, 80, 89-130.

Carbone, I., & Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91(3), 553-556.

Crous, P. W., Groenewald, J. Z., & Hill, C. F. (2002). *Cylindrocladium pseudonaviculatum* sp. nov. from New Zealand, and new *Cylindrocladium* records from Vietnam. *Sydowia*, 54(1), 23-34. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20023108467>. Acesso em: 16 de fevereiro 2021.

Gehesquière, B., Crouch, J. A., Marra, R. E., Van Poucke, K., Rys, F., Maes, M., ... & Heungens, K. (2016). Characterization and taxonomic reassessment of the box blight pathogen *Calonectria pseudonaviculata*, introducing *Calonectria henricotiae* sp. nov. *Plant Pathology*, 65(1), 37-52.

Glass, N. L., & Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and environmental microbiology*, 61(4), 1323-1330.

Jayawardena, R. S., Hyde, K. D., Jeewon, R., Ghobad-Nejhad, M., Wanasinghe, D. N., Liu, N., ... & Kang, J. C. (2019). One stop shop II: taxonomic update with molecular phylogeny for important phytopathogenic genera: 26–50 (2019). *Fungal Diversity*, 94(1), 41-129.

LaMondia, J. A. (2014). Fungicide efficacy against *Calonectria pseudonaviculata*, causal agent of boxwood blight. *Plant disease*, 98(1), 99-102.

LaMondia, J. A. (2015). Management of *Calonectria pseudonaviculata* in boxwood with fungicides and less susceptible host species and varieties. *Plant disease*, 99(3), 363-369.

Lombard, L., Crous, P. W., Wingfield, B. D., & Wingfield, M. J. (2010). Phylogeny and systematics of the genus *Calonectria*. *Studies in Mycology*, 66, 31-69.

O'Donnell, K., & 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.

Schoch, C. L., Crous, P. W., Witthuhn, R. C., Cronwright, G., El-Gholl, N. E., & Wingfield, B. D. (2000). Recombination in *Calonectria morganii* and phylogeny with other heterothallic small-spored *Calonectria* species. *Mycologia*, 92(4), 665-673.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1).

## II.11 *Chrysomyxa* sp.

### Classificação taxonômica:

Reino: Fungi  
Filo: Basidiomycota  
Classe: Pucciniomycetes  
Ordem: Pucciniales  
Família: Coleosporiaceae  
Gênero: *Chrysomyxa*

### Motivo da inclusão na lista:

O gênero *Chrysomyxa* é composto por aproximadamente 23 espécies de fungos considerados biotróficos e patogênicos, causando ferrugens em diferentes espécies de plantas da família Pinaceae, principalmente no gênero *Picea* (coníferas) e em algumas plantas da família Ericaceae, Pyrolaceae e Empetraceae. Além disso, muitas dessas espécies possuem também características de invasibilidade e são consideradas como exóticas invasoras em diferentes países, sendo comumente identificadas em áreas nas quais plantas hospedeiras fazem parte da flora nativa (Berndt, 1999; CABI, 2021). Dentre as principais espécies patogênicas do gênero destacam-se *C. abietis*, que causa ferrugem em *Picea*; *C. rhododendri*, que causa ferrugem em *Picea* e *Rhododendron* (gênero formado por espécies de plantas lenhosas); *C. himalensis* que também afeta *Picea* e *Rhododendron*; e *C. arctostaphyli*, que causa a ferrugem da vassoura de abeto (CABI, 2021). Os fungos do gênero são encontrados de forma mais generalizada nas regiões temperadas do hemisfério norte, onde são responsáveis por causar perdas econômicas significativas, uma vez que diminuem a produtividade madeireira das plantas afetadas. Mas, também há relatos da sua presença em alguns países da Ásia, Europa e Oceania (Feau et al., 2011; CABI, 2021). Existem algumas diferenças nos sintomas causados por cada espécie do gênero, mas de modo geral, esses patógenos fúngicos geralmente formam manchas amarelas nos pontos de infecção, as quais se fundem e formam faixas amarelas transversais profundas ao longo da folha. Essas folhas infectadas caem e, muitas vezes, ocorre a destruição dos ramos além da interrupção da formação das sementes ou redução da sua viabilidade e redução do crescimento das árvores (Bauer & Schwaninger, 2007). Dentre as principais características de invasibilidade apresentadas principalmente por algumas das espécies de *Chrysomyxa*, destacam-se a ampla gama de hospedeiros, o fato desses fungos terem alto potencial reprodutivo e de serem altamente móveis localmente, o que os torna invasivos fora da sua área nativa (CABI, 2021). Apesar de uma vasta gama de fungos causadores de ferrugens da ordem Pucciniales terem sido reportados no Brasil (Carvalho et al., 2018), não há registros oficiais da identificação precisa de fungos do gênero *Chrysomyxa*. Entretanto, por serem fungos que, como mencionado, causam não só prejuízos econômicos, mas também ecológicos a uma ampla gama de espécies de plantas de diferentes famílias, ressalta-se a importância de se restringir sua utilização em território brasileiro, pois possuímos representantes nativos de algumas das famílias afetadas, principalmente Ericaceae (Mezabarba et al., 2013).

### Método de identificação:

Devido à restrição de uso das espécies do gênero *Chrysomyxa*, sugere-se que sempre que houver pedidos de registro de fungos da família Coleosporiaceae, sejam realizados testes para confirmar que não pertencem a esse gênero. A identificação precisa das espécies do gênero é dificultada porque muitas delas possuem características morfológicas e moleculares muito semelhantes, o que tem levado

os pesquisadores a utilizar um conjunto de vários genes e regiões, tais como ITS, o rRNA 28S, a subunidade 6 da NADH desidrogenase e o citocromo oxidase 1 para tentar promover a identificação e análise filogenética dessas espécies (Feau et al., 2011). Entretanto, como a restrição de uso se estende a todas as espécies do gênero, é possível utilizar métodos moleculares que permitam apenas distinguir membros desse gênero dos demais da família Coleosporiaceae. Dessa maneira, dentre os trabalhos levantados, sugere-se utilizar para essa identificação a abordagem descrita no trabalho de Maier e colaboradores (2003), que utilizou PCR convencional para amplificar fragmentos da extremidade 5' do gene que codifica o rRNA 28S e dos domínios D1 e D2 utilizando, respectivamente, os conjuntos de primers LR0R/ LR6 e NL1/ NL4. No estudo foi possível identificar e inferir relações filogenéticas de 52 diferentes fungos causadores de ferrugem, incluindo representantes do gênero *Chrysomyxa*, para os quais obtiveram identidade de 100%. Os primers utilizados para amplificar esses fragmentos podem ser visualizados na tabela abaixo:

Gene/região	Sequências dos primers (foward/reverse)	Referência
rDNA 28S	LR0R: 5' - ACCCGCTGAACCTAACG - 3' LR6: 5' - CGCCAGTTCTGCTTACC - 3'	Moncalvo et al. 1995; Vilgalys and Hester 1990
Domínios D1/D2	NL1: 5' – GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG – 3' NL4: 5' – GGTCCGTGTTCAAGACGG – 3'	O'Donnell 1992, 1993

### Referências Bibliográficas:

- Bauer, H., & Schwaninger, C. (2007). Phytopathogens at the alpine timberline. In *Trees at their Upper Limit* (pp. 163-170). Springer, Dordrecht.
- Berndt, R. (2000). *Chrysomyxa* rust: morphology and ultrastructure of D-haustoria, uredinia, and telia. *Canadian Journal of Botany*, 77(10), 1469-1484.
- CABI. Datasheet: *Chrysomyxa rhododendri* (European *Rhododendron* rust). Disponível em <https://www.cabi.org/isc/datasheet/13260> Acesso em 17 de fevereiro de 2021.
- Carvalho, A. C. D., Sotão, H. M. P., & França, I. F. D. (2018). Fungos causadores de ferrugens (Pucciniales) em plantas da Reserva Florestal Adolpho Ducke, Amazônia Central, Brasil. *Rodriguésia*, 69(2), 663-672.
- Feau, N., Vialle, A., Allaire, M., Maier, W., & Hamelin, R. C. (2011). DNA barcoding in the rust genus *Chrysomyxa* and its implications for the phylogeny of the genus. *Mycologia*, 103(6), 1250-1266.
- Maier, W., Begerow, D., Weiβ, M., & Oberwinkler, F. (2003). Phylogeny of the rust fungi: an approach using nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Canadian Journal of Botany*, 81(1), 12-23.
- Mezabarba, V., Vianna Filho, M. D. M., Borges, R. A. X., & Mansano, V. D. F. (2013). Ericaceae do Parque Nacional do Itatiaia, RJ, Brasil. *Hoehnea*, 40(1), 115-130.

Moncalvo, J.-M., Wang, H.-H., and Hseu, R.-S. 1995. Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia*, 87: 223–238

O'Donnell, K.L. 1992. Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). *Curr. Genet.* 22: 213–220.

O'Donnell, K.L. 1993. *Fusarium* and its near relatives. In *The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics*. Edited by D.R. Reynolds and J.W. Taylor. CAB International, Wallingford, U.K. pp. 225–233.

Vilgalys, R., and Hester, M. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*, 172: 4238–4246

## II.12 *Ciborinia allii*

### Classificação taxonômica:

Reino: Fungi  
Filo: Ascomycota  
Classe: Leotiomycetes  
Ordem: Helotiales  
Família: Sclerotiniaceae  
Gênero: *Ciborinia*  
Espécie: *Ciborinia allii*

### Motivo da inclusão na lista:

O fungo *Ciborinia allii* durante algumas décadas após sua descoberta também recebeu a denominação de *Botryotinia allii* e *Sclerotinia allii*, até sua reclassificação para o gênero *Ciborinia* em 1979, mas ainda há muitas dúvidas a respeito da classificação taxonômica desse fungo e em muitos trabalhos ele ainda é denominado de *B. allii* (Nielsen, 2002; CABI, 2021). Ele causa a doença do apodrecimento do pescoço da cebola, que na verdade afeta plantas do gênero *Allium* (família Liliaceae), no qual além de espécies de cebola estão incluídas espécies de alho e alho-poró e em um estudo mais recente também foram coletados indícios de que ele acometa plantas de *Aloe vera* (Zhang et al., 2006). A presença de *Ciborinia allii* foi reportada em vários países nos diferentes continentes: Egito (África), China, Japão, Coreia do Sul e Taiwan (Ásia), Bulgária, Dinamarca, Holanda, Polônia, Noruega e Reino Unido (Europa); Estados Unidos e República Dominicana (América do Norte); Austrália (Oceania) e também no Brasil (América do Sul) (CABI, 2021). A infecção das folhas e caules das flores de *Allium* spp. por *C. allii* resulta em manchas pálidas e encharcadas de água que se espalham longitudinalmente em direção às pontas e bases. As folhas murcham e ficam amarelas/marrons ou brancas/cinzas e caem precocemente. O fungo infecta o colo do bulbo a partir das folhas e a esporulação ocorre no tecido morto das plantas em condições ambientais favoráveis, geralmente úmidas e frescas, e escleródios pretos são formados nas folhas, os quais podem sobreviver no solo por muito tempo. Nas plantas de cebola, *C. allii*, causa uma podridão no pescoço da cebola muito semelhante à causada por *Botrytis allii*, o tecido escamado torna-se macio, encharcado de água e translúcido, a infecção começa nos órgãos vegetativos das cebolas, começando na área do pescoço e continuando até o bulbo. A principal forma de disseminação do fungo é por meio da produção e transporte dos conídeos, principalmente pelo ar ou pela chuva, resultando em infecções secundárias (Leu et al., 1985; Presly, 1985; CABI, 2021). Além do grave prejuízo econômico, o fungo representa um risco ainda maior devido às suas características de invasividade, tais como crescimento rápido e ter alto potencial reprodutivo (CABI, 2021). No Brasil, há um único relato da ocorrência do fungo, realizado em 1994, no estado de Santa Catarina (Boff, 1994), adicionalmente, segundo a literatura, temos algumas espécies nativas da família dos hospedeiros do fungo, Liliaceae (Veiga et al., 2009). Por isso reforça-se a importância de restringir seu uso e evitar sua maior disseminação em território brasileiro.

### Método de identificação:

Considerando a restrição de uso, quando houver pedidos de registro, de fungos da família Sclerotiniaceae, é preciso garantir que não se trate da espécie *C. allii* ou *B. allii*, pois devido às dúvidas ainda existentes em relação à taxonomia de *C. allii*, muitos trabalhos se referem a essa espécie como sendo *B. allii*. Entretanto, devido justamente aos questionamentos taxonômicos a respeito desse fungo,

a maioria dos trabalhos relacionados a métodos de identificação moleculares são focados na sua resolução taxonômica e, dessa maneira, não se encontram trabalhos com indicação precisa de *primers* ou regiões que possam ser usadas de forma a garantir uma identificação precisa em nível de espécie. Em consulta ao GenBank foi possível encontrar o depósito de sequências ITS da espécie *B. allii*, porém como são submissões diretas, não é possível consultar o trabalho. Dessa maneira, sugere-se que sempre que houver pedidos de registro de quaisquer outros microrganismos da família Sclerotiniaceae, sejam utilizados métodos moleculares para confirmar se eles pertencem a outras espécies do gênero *Ciborinia/Botryotinia*. Para tal sugere-se utilizar a abordagem descrita no trabalho de Nielsen e colaboradores (2002), que além de utilizarem *primers* universais para a região ITS, também desenvolveram um conjunto de *primers* que foram projetados com base em um fragmento de DNA clonado e amplificado para detecção direta de isolados de *Botryotinia* spp. associados à podridão do pescoço das cebolas. Caso haja identificação positiva e sem ambiguidades com outras espécies dos gêneros o uso do microrganismo fica garantido, mas caso não seja possível excluir que ele pertença às espécies em questão, características morfológicas devem ser apresentadas para confirmar que não se trata de *C. allii/B. allii*.

Dentre as características descritas é importante constar informações comparativas a respeito de estruturas como o apotécio e os esporos, as quais podem ser acessadas no trabalho de Leu & Wu, 1985. Caso isso não seja feito ou não seja possível excluir a possibilidade do microrganismo se tratar de *C. allii/B. allii* com base nessas características morfológicas, seu uso fica negado.

Gene/região	Sequências dos <i>primers</i> (foward/reverse)	Referências
ITS	ITS1: 5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3' ITS4: 5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3'	White et al., 1990
Fragmento clonado	BA2f: 5' - GTGGGGTAGGATGAGATGATG - 3' BA1r: 5' - TGAGTGCTGGCGGAAACAAA - 3'	Nielsen et al., 2002

### Referências Bibliográficas:

- BOFF, P. (1994). O complexo *Botrytis* spp, causando doenças em cebola. *Agropecuária catarinense*, 7(3).
- CABI (2021). Datasheet: *Ciborinia all* (neck rot of onion). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/9638>. Acesso em: 21 de fevereiro de 2021.
- Leu, L. S., & Wu, H. G. (1985). Welsh onion sclerotial disease incited by *Ciborinia allii* and its ascosporic dimorphism characters in Taiwan. *Plant Protection Bulletin, Taiwan*, 27(2), 87-94.
- Nielsen, K., Yohalem, D. S., & Jensen, D. F. (2002). PCR detection and RFLP differentiation of *Botrytis* species associated with neck rot of onion. *Plant Disease*, 86(6), 682-686.
- Presly, A. H. (1985). Studies on *Botrytis* spp. occurring on onions (*Allium cepa*) and leeks (*Allium porrum*). *Plant pathology*, 34(3), 422-427.

- Veiga, R. F. D. A., Tombolato, A. F. C., Costa, A. A., & Barbosa, W. (2009). Levantamento de plantas ornamentais nativas, mantidas sob conservação ex situ no Brasil. *Ornamental Horticulture*, 15(1).
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1).
- Zhang, T. Y., Zhao, G. Z., Zhang, X. G., Liu, H. M., & Wu, Y. M. (2009). Flora fungorum sinicorum. *Flora Fungorum Sinicorum*, 31.

## II.13 *Cryphonectria parasitica*

### Classificação taxonômica:

Reino: Fungi  
Fil: Ascomycota  
Classe: Sordariomycetes  
Ordem: Diaporthales  
Família: Cryphonectriaceae  
Gênero: *Cryphonectria*  
Espécie: *Cryphonectria parasitica*

### Motivo da inclusão na lista:

O fungo *Cryphonectria parasitica* é um patógeno descrito inicialmente em 1904 como causador da praga da castanha, que acometeu as castanheiras americanas da espécie *Castanea dentata* em Nova York, mas apenas em 1978 recebeu a nomenclatura atual (Heiniger e Rigling, 1994; Rigling & Próspero, 2018). Além das castanheiras americanas, esse patógeno infecta outras espécies de castanheiras, como *C. sativa* (castanheira européia) e apresenta algumas espécies como hospedeiras secundárias, sendo estas os carvalhos (*Quercus spp.*), Bordos (*Acer spp.*), Carpa-chifre europeu (*Carpinus betulus*) e algumas espécies de eucaliptos (Heiniger e Rigling, 1994; CABI, 2021). Assim, em geral, dentre seus hospedeiros estão representantes das famílias Betulaceae, Fagaceae, Myrtaceae e Rosaceae. O fungo é considerado um patógeno necrotrófico, que penetra no tecido do hospedeiro através de pequenas feridas presentes nas partes das plantas situadas sobre o solo, como nos galhos e caules, e após a germinação dos esporos há a formação de lesões que levam ao cancro da casca (Heiniger e Rigling, 1994; Prospero et al., 2006). Esta lesão formada varia de acordo com a idade dos ramos, sendo de cor laranja a marrom-avermelhada em ramos jovens e de coloração menos evidente em ramos mais velhos. Além disso, esta lesão pode levar ao afundamento da casca da árvore, causando a morte de parte do tronco e em árvores adultas, as folhas ficam com coloração amarela ou marrom, murcham e ficam penduradas no galho infectado (Rigling e Próspero, 2018). Apesar desses serem os efeitos gerais causados por *C. parasitica*, a manifestação sintomática da doença é dependente da virulência da cepa patogênica e da senilidade da parte da planta que está sendo infectada, uma vez que as cepas virulentas desta espécie produzem cancros que causam maiores danos (Próspero e Rigling, 2013). *C. parasitica* é um fungo cuja presença foi descrita, até o momento, na Tunísia (África), alguns países da Ásia, como China e Japão, na Austrália (Oceania), Canadá e EUA, na América do Norte, e alguns países europeus que possuem populações significativas de *Castanea*, como Áustria, Bélgica, França, Croácia, Bulgária, Grécia, Reino Unido, dentre outros (CABI, 2021). Esse fungo foi responsável por grandes epidemias, que levaram à eliminação de grande parte das castanheiras americanas na América do Norte, além do declínio da castanha europeia na Europa, causando grandes prejuízos econômicos e ecossistêmicos às ambas as regiões (Heiniger e Rigling, 1994). No Brasil ainda não há relatos da identificação de *C. parasitica*, mas considerando o impacto da doença causada pelo fungo, sua ampla gama de hospedeiros e o fato de que temos espécies nativas das famílias Fabaceae e Myrtaceae, que são as mesmas de algumas das espécies afetadas por ele, (Virtuoso, 2005; Sarmento, 2012), destaca-se a importância de se evitar a sua entrada e utilização em território brasileiro.

### **Método de identificação:**

Considerando a restrição de uso, sempre que houver pedidos de registro de fungos pertencentes ao gênero *Cryphonectria*, metodologias precisam ser empregadas para garantir que não se trate da espécie *C. parasitica*. Trabalhos mais recentes têm realizado a detecção e identificação da espécie por meio de ensaios de qPCR (Chandelier et al., 2019). Entretanto, sugere-se utilizar a abordagem descrita no trabalho Myburg e colaboradores (2004), que utilizou apenas ensaios de PCR convencional com o uso de primers para caracterizar e identificar em nível de espécie, 42 isolados do gênero *Cryphonectria* obtidos de *Castanea* e *Quercus*, incluindo *C. parasitica*. Para realizar essa identificação foram utilizados primers para amplificar fragmentos das regiões ITS e de duas regiões diferentes do gene que codifica a beta-tubulina (TUB).

<b>Gene/região</b>	<b>Sequências dos primers (foward/reverse)</b>	<b>Referências</b>
ITS	ITS1: 5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3' ITS4: 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'	White et al. 1990
TUB	Bt1a: 5' – TTCCCCCGTCTCCACTTCTTCATG – 3' Bt1b: 5' – GACGAGATCGTTCATGTTGAACTC – 3'	Glass and Donaldson 1995
TUB	Bt2a: 5' – GGTAACCAAATCGGTGCTGTTTC – 3' Bt2b: 5' – ACCCTCAGTGTAGTGACCCTGGC – 3'	Glass and Donaldson 1995

### **Referências Bibliográficas:**

CABI (2021). Datasheet: *Cryphonectria parasitica*. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/21108>. Acesso em: 28 de fevereiro de 2021.

Chandelier, A., Massot, M., Fabregettes, O., Gischer, F., Teng, F., & Robin, C. (2019). Early detection of *Cryphonectria parasitica* by real-time PCR. *European Journal of plant pathology*, 153(1), 29-46.

Glass, N. L., & Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and environmental microbiology*, 61(4), 1323-1330.

Heiniger, U. and Rigling, D. (1994) Biological control of chestnut blight in Europe. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32, 581– 599.

Prospero, S., Conedera, M., Heiniger, U. and Rigling, D. (2006). Saprophytic activity and sporulation of *Cryphonectria parasitica* on dead chestnut wood in forests with naturally established hypovirulence. *Phytopathology*, 96, 1337–1344.

Prospero, S. and Rigling, D. (2013) Chestnut blight. In: *Infectious Forest Diseases* (P. Gonthier and G. Nicolotti, eds), pp. 318– 338. Wallingford: CAB International.

Rigling, D., & Prospero, S. (2018). *Cryphonectria parasitica*, the causal agent of chestnut blight: invasion history, population biology and disease control. *Molecular Plant Pathology*, 19(1), 7-20.

Sarmento, M. B., Silva, A. D., & Silva, C. D. (2012). Recursos genéticos de frutas nativas da família Myrtaceae no Sul do Brasil. *Magistra*, 24, 250-262.

Virtuoso, S., Davet, A., Dias, J., Cunico, M. M., Miguel, M. D., Oliveira, A. B., & Miguel, O. G. (2005). Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15(2), 137-142.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.

## **II.14 *Didymella fabae***

### **Classificação taxonômica:**

Reino: Fungi  
Filo: Ascomycota  
Classe: Dothideomycetes  
Ordem: Pleosporales  
Família: *Didymellaceae*  
Gênero: *Didymella*  
Espécie: *Didymella fabae*

### **Motivo da inclusão na lista:**

O fungo *Didymella fabae* possui como forma anamórfica *Ascochyta fabae* e é responsável por causar a doença conhecida como praga de *Ascochyta*, que é uma das doenças mais graves que afeta leguminosas (Kaiser et al., 1997). Este fungo é altamente especializado para a espécie *Vicia faba*, mas acredita-se que infecções em outras leguminosas podem ocorrer sob condições específicas, tendo sido observados indícios de acometimento de outras variedades da família Fabaceae, como feijões, ervilhas, lentilhas e grão-de-bico (CABI, 2021). Os sintomas ocorrem nas folhas, caules e vagens e quando as mudas crescem a partir de sementes infectadas, as lesões são mais evidentes nas partes superiores do caule e nas folhas mais velhas. As lesões nas folhas são geralmente circulares e marrom-escuras e após um curto período de tempo, tornam-se maiores e ligeiramente fundas, com um centro marrom-claro a cinza-escuro circundado por uma margem larga e escura. Conforme as manchas aumentam, elas se tornam mais irregulares e coalescem para cobrir áreas maiores da folha. Nas hastes, as lesões são geralmente menores nos estágios iniciais da infecção, mas alongam-se e tornam-se acentuadamente fundas. As lesões do caule são geralmente mais escuras do que as das folhas e contêm picnídios dispersos. No estágio de muda, quando a infecção se origina da semente, a combinação da infecção do caule e da folha pode resultar na morte da planta. Quanto aos frutos, à medida que se desenvolvem, lesões podem ser produzidas na superfície e eles se tornam muito profundos com centros marrom-escuros contendo picnídios abundantes (Kaiser et al., 1997; Omri Benyoussef et al., 2012; Ozkilinc et al., 2015; CABI, 2021). A doença é mais prevalente onde a fava é cultivada como cultura de inverno em regiões com climas mediterrâneos ou oceânicos amenos e o patógeno é transmitido pela semente, o que torna provável que ele esteja presente onde quer que o hospedeiro seja cultivado (Stoddard et al., 2010). Dessa maneira, *D. fabae* ocorre em alguns países de todos os continentes, sendo que na América do Sul foi detectado na Argentina, Chile e Brasil (CABI, 2021). Apesar da fonte mais comum de infecção ser através da semente, a dispersão do fungo também ocorre pela disseminação de seus ascósporos pelo vento, respingos de chuva e a partir dos detritos e ele possui outras características de invasividade, tais como ser altamente móvel localmente, ter crescimento rápido e alto potencial reprodutivo (CABI, 2021). Apesar de haver relatos da presença de *D. fabae*, ele não é um fungo altamente disseminado no Brasil e o país possui membros da família Fabaceae nativos, tais como *Erythrina velutina*, popularmente conhecida como suinã e mulungu (Virtuoso, 2005). Por estes fatores, considera importante vetar o uso desse patógeno no país.

### **Método de identificação:**

Devido às restrições de uso, sempre que houver pedidos de registro de fungos pertencentes ao gênero *Didymella* ou *Ascochyta* é preciso garantir que não se trata da espécie *Didymella/Ascochyta fabae*.

Dentre os trabalhos levantados, recomenda-se utilizar a abordagem descrita no trabalho de Aveskamp e colaboradores (2010), que utilizou fragmentos da região ITS e dos genes que codificam o rRNA 28S (LSU), o rRNA 18S (SLU) e a beta tubulina (TUB), obtidos a partir de PCR convencional, para obter um melhor entendimento da classificação filogenética dos fungos da família Didymellaceae, incluindo *D.fabae*. Os primers utilizados para amplificar cada uma dessas regiões se encontram descritos na Tabela abaixo.

Gene/região	Sequências dos primers (forward/reverse)	Referência
ITS	V9G: 5'- TTACGTCCCTGCCCTTGTA - 3' ITS4: 5'- TCCTCCGTTATTGATATGC - 3'	Hoog & Gerrits van den Ende 1998; White et al. 1990
LSU	LR0R: 5' - ACCCGCTGAACCTAACG - 3' LR7: 5'-TACTACCACCAAGATCT-3'	Rehner & Samuels 1994; Vilgalys & Hester 1990
SSU	NS1: 5' - GTAGTCATATGCTTGTCTC - 3' NS4: 5'- CTTCCGTCAATTCTTTAAG - 3	White et al. 1990
TUB	TUB2Fd: 5'- GTBCACCTYCARACCGGYCARTG – 3' TUB4Rd: 5' - CCRGAYTGRCCRAARACRAAGTTGTC – 3	Aveskamp et al. 2009a

### Referências Bibliográficas:

Aveskamp, M. M., Verkley, G. J., de Gruyter, J., Murace, M. A., Perello, A., Woudenberg, J. H., ... & Crous, P. W. (2009). DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties. *Mycologia*, 101(3), 363-382.

Aveskamp, M. M., De Gruyter, J., Woudenberg, J. H. C., Verkley, G. J. M., & Crous, P. W. (2010). Highlights of the Didymellaceae: a polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. *Studies in mycology*, 65, 1-60.

CABI (2021). Datasheet: *Didymellafabae*. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/7304#REF-DDB-124780>. Acesso em: 02 de março de 2021.

Hoog GS, Ende AHGG. (1998). Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous Basidiomycetes. *Mycoses* 41:183–189

Kaiser, W. J., Wang, B. C., & Rogers, J. D. (1997). *Ascochyta fabae* and *A. lentis*: host specificity, teleomorphs (*Didymella*), hybrid analysis, and taxonomic status. *Plant disease*, 81(7), 809-816.

Omri Benyoussef, N., Le May, C., Mlayeh, O., & Kharrat, M. (2012). First report of *Didymella fabae*, teleomorph of *Ascochyta fabae*, on faba bean crop debris in Tunisia. *Phytopathologia Mediterranea*, 369-373.

Ozkilinc, H., Thomas, K., Abang, M., & Peever, T. L. (2015). Population structure and reproductive mode of *Didymella fabae* in Syria. *Plant Pathology*, 64(5), 1110-1119.

Rehner, S. A., & Samuels, G. J. (1995). Molecular systematics of the Hypocreales: a teleomorph gene phylogeny and the status of their anamorphs. *Canadian Journal of Botany*, 73(S1), 816-823.

Stoddard, F. L., Nicholas, A. H., Rubiales, D., Thomas, J., & Villegas-Fernández, A. M. (2010). Integrated pest management in faba bean. *Field crops research*, 115(3), 308-318.

Vilgalys, R. & M. Hester. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172: 4238-4246.

Virtuoso, S., Davet, A., Dias, J., Cunico, M. M., Miguel, M. D., Oliveira, A. B., & Miguel, O. G. (2005). Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15(2), 137-142.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.

## **II.15 *Diplodia seriata***

### **Classificação taxonômica**

Reino: Fungi  
Fil: Ascomycota  
Classe: Dothideomycetes  
Ordem: Botryosphaerales  
Família: Botryosphaeriaceae  
Gênero: *Diplodia*  
Espécie: *Diplodia seriata*

### **Motivo da inclusão na lista:**

*Diplodia seriata* é um fungo cosmopolita causador de doenças em hospedeiros lenhosos pertencentes a muitos gêneros de mais de 30 famílias de plantas e em vários habitats e regiões do planeta (CABI, 2021), sendo, principalmente, documentado como agente causador de danos em videiras (Pouzoulet et al., 2017), além de macieiras (Diaz et al., 2019), lentisco (Trapman et al., 2008), dentre outras plantas. Esse patógeno tem sido registrado em regiões de clima variado, mas principalmente temperado, ao redor do mundo, sendo detectado em vários países de todos os continentes. Na América do Sul, tem-se registro desse patógeno no Brasil, Argentina, Bolívia, Chile, Equador, Uruguai e Venezuela (CABI, 2021). Relatos da virulência deste patógeno variam dependendo da cultura, variedades e hospedeiros envolvidos e é frequentemente considerado um patógeno relacionado ao estresse, que se aproveita de plantas fracas ou estressadas (CABI, 2021). Acredita-se que *D. seriata* penetra nos hospedeiros através de feridas e, dentre os sintomas mais comuns, pode causar o surgimento de cânceres à morte e podridão dos frutos, além de mancha foliar. Os frutos não maduros podem inicialmente apresentar lesões negras afundadas, o que geralmente progride para uma podridão marrom que se espalha rapidamente após o seu amadurecimento. As árvores cujas folhas são infectadas sofrem severa desfoliação (Trapman et al., 2008), nos galhos podem surgir cânceres marrons em forma de cunha e duros (Diaz et al., 2019). Nos troncos de videiras afetadas, observou-se que à medida que a infecção progredia, a porção transversal restante do tronco e o xilema condutor da seiva eram reduzidos, levando à morte de partes ou de toda a planta. Contudo, os sinais externos da infecção no tronco apenas se tornam visíveis muitos anos após a infecção inicial (Pouzoulet et al., 2017). Outro fator agravante dessa doença é que *D. seriata* pode sobreviver na planta de forma endofítica, assim infecções latentes podem resultar em armazenamento da podridão (Crous et al., 2006). No Brasil, foi detectada a presença do patógeno e da doença no sul do país (Garrido et al., 2017). Dessa maneira, considera-se muito importante reforçar os cuidados em relação à disseminação de *D. seriata* para que não ocorra o espalhamento da doença em outras regiões, principalmente pelo fungo possuir alto grau de invasividade, sendo generalista e capaz de se adaptar a uma grande diversidade de ambientes (CABI, 2021). Outro importante alerta decorre do grande número de plantas que foram acometidas por este patógeno (mais de 30 famílias diferentes), muitas das quais possuem, inclusive, representantes de espécies nativas no país, tais como Fabaceae (Virtuoso et al., 2005), Araucariaceae (Paludo et al., 2009), Rosaceae (Barcelos & Heiden, 2015), dentre outras, o que aumenta a probabilidade de que ele se estabeleça em novas áreas. Assim, é importante controlar e restringir a sua utilização e disseminação no país.

### **Método de identificação:**

Considerando as restrições de uso sempre que houver pedidos de registro de fungos do gênero *Diplodia* é necessário confirmar que não se tratam da espécie *D. seriata*. Para essa confirmação, dentre os

trabalhos levantados, sugere-se utilizar uma abordagem molecular baseada no trabalho descrito por Hlaiem e colaboradores (2020). Neste trabalho foi realizada PCR convencional, seguida de sequenciamento e análise filogenética visando à identificação de isolados que causavam morte de plantas Lentisco na Tunísia, sendo possível obter identificação precisa e robusta, dentre outras, da espécie *D. seriata*. Essa identificação foi realizada utilizando-se os primers ITS1 e ITS4 para amplificar fragmentos da região ITS (ITS1-5.8S-ITS4), os primers EF1-728F e EF1-986R para amplificar uma parte do gene que codifica o fator alfa de elongação da tradução (EF1- $\alpha$ ) e os primers Bt2a e Bt2b para amplificar partes do gene que codifica a  $\beta$ -tubulina (TUB). Os primers descritos podem ser visualizados na Tabela abaixo.

Gene/Região	Sequências dos primers (forward/reverse)	Referência
ITS	ITS1: 5' - TCCGTAGGTGAAACCTGCGG - 3' ITS4: 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'	White et al., 1990
EF1- $\alpha$	EF1-728F: 5'- CATCGAGAAGTTGAGAAGG- 3'' EF1-986R: 5'- TACTGAAGGAACCCCTTACC- 3'	Carbone and Kohn 1999
TUB	BT2A: 5'- GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTC - 3' BT2B: 5' - AACCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC - 3'	Glass & Donaldson 1995

### Referências Bibliográficas:

Barcelos, L. B., & Heiden, G. (2015). Distribuição geográfica de espécies de amora (*Rubus*, Rosaceae) nativas do Brasil. In *Embrapa Clima Temperado-Artigo em anais de congresso (ALICE)*. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 24.; ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 17., 2015, Pelotas.[Anais.]. Pelotas: UFPel.

CABI (2021). Datasheet: *Diplodia seriata* (grapevine trunk disease). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/9630>. Acesso em 25 de fevereiro de 2021.

Carbone, I., & Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91(3), 553-556.

Crous, P. W., Slippers, B., Wingfield, M. J., Rheeder, J., Marasas, W. F., Philips, A. J., ... & Groenewald, J. Z. (2006). Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in mycology*, 55, 235-253.

Díaz, G. A., Mostert, L., Halleen, F., Lolas, M., Gutierrez, M., Ferrada, E., & Latorre, B. A. (2019). *Diplodia seriata* associated with Botryosphaeria canker and dieback in apple trees in Chile. *Plant Disease*, 103(5), 1025.

Garrido, L. D. R., Gava, R., & Carollo, L. A. (2017). Podridão-descendente da videira na região sul do Brasil. *Embrapa Uva e Vinho-Circular Técnica (INFOTECA-E)*.

Glass, N. L., & Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and environmental microbiology*, 61(4), 1323-1330.

Hlaiem, S., Zouaoui Boutiti, M., Yangui, I., & Ben Jamaa, M. L. (2020). Identification and pathogenicity of *Diplodia seriata* and *Diplodia africana* related to lentisk dieback in Tunisia. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 53(3-4), 99-111.

Paludo, G. F., Mantovani, A., Klauberg, C., & Reis, M. S. D. (2009). Estrutura demográfica e padrão espacial de uma população natural de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Araucariaceae), na Reserva Genética Florestal de Caçador, Estado de Santa Catarina. *Revista Árvore*, 33(6), 1109-1121.

Pouzoulet, J., Rolshausen, P. E., Schiavon, M., Bol, S., Travadon, R., Lawrence, D. P., ... & Jacques, A. (2017). A method to detect and quantify *Eutypa lata* and *Diplodia seriata*-complex DNA in grapevine pruning wounds. *Plant disease*, 101(8), 1470-1480.

Trapman, M., Maxin, P., & Weber, R. W. (2008). *Diplodia seriata*, cause of black fruit rot in organically grown apples in Holland, Belgium and Northern Germany. In *Ecofruit-13th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing: Proceedings to the Conference from 18th February to 20th February 2008 at Weinsberg/Germany* (pp. 177-181).

Virtuoso, S., Davet, A., Dias, J., Cunico, M. M., Miguel, M. D., Oliveira, A. B., & Miguel, O. G. (2005). Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15(2), 137-142.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.

## II.16 *Discula destructiva*

### Classificação taxonômica

Reino: Fungi  
Filho: Ascomycota  
Classe: Sordariomycetes  
Ordem: Diaporthales  
Família: Gnomoniaceae  
Gênero: *Discula*  
Espécie: *Discula destructiva*

### Motivo da inclusão na lista:

*Discula destructiva* é um fungo causador da doença denominada antracnose de corniso, afetando populações de árvores de espécies do gênero *Cornus*, tais como *C. florida* e *C. nuttalli*, nativas da América do Norte e pertencentes à família Cornaceae. Esse patógeno foi observado inicialmente no final da década de 1970 nas costas leste e oeste dos Estados Unidos, desde então se espalharam rapidamente nas populações nativas do país causando sua dramática devastação e modificando seriamente a composição de espécies e biodiversidade no país. Plantas do gênero *Cornus* têm significativa importância ornamental, além da sua importância ecológica, uma vez que seus frutos são fontes de alimento com alto teor de gordura para animais (Zhang et al., 2011; Mantooth et al., 2017; CABI, 2021). Essa doença afeta folhas, brácteas, casca, troncos, ramos, frutas e sementes das plantas hospedeiras (Zhang et al., 2011). Inicialmente, a doença se manifesta em folhas e brotos jovens, causando pequenas manchas com margem roxa que depois se transformam em grandes manchas necróticas. Em muitos casos as folhas infectadas morrem prematuramente e a doença pode progredir para galhos e ramos adultos. Além disso, quando as hifas infectam o tronco podem causar cânceres, necrosando o tecido e afetando o floema. A maioria das árvores acaba morrendo de 1 a 3 anos após o início da infecção, dependendo do seu porte e das condições ambientais, sendo as mudas jovens as mais afetadas (Daughtrey et al., 1996; Zhang et al., 2011; CABI, 2021). *D. destructiva* tem sido encontrada em várias regiões dos Estados Unidos, assim como no Canadá e na América do Norte. Além desses locais, na Europa tem sido reportada sua presença na Alemanha, Itália, Suíça e Reino Unido. Entretanto, em princípio, existe também o risco para outros continentes nos quais os hospedeiros ocorrem ou são cultivados como plantas ornamentais, principalmente pelo fungo possuir características de invasividade (CABI, 2021). No Brasil, ainda não se tem registro desse patógeno. Contudo, aqui são encontradas outras plantas nativas pertencentes à família Cornaceae, por exemplo, a espécie *Griselinia ruscifolia* que ocorre nos locais mais altos da Serra do Mar e da Mantiqueira (Wanderley et al., 2002). Dessa forma, não há como se garantir que a introdução desse fungo não poderia vir a acometer plantas nativas, o que justifica o controle e restrição da sua entrada e disseminação no país.

### Método de identificação:

Em função das restrições de uso, sempre que houver pedidos de registro de fungos do gênero *Discula* é necessário confirmar que não se tratam especificamente da espécie *D. destructiva*. Para essa identificação, dentre os trabalhos e opções levantadas, sugere-se utilizar uma abordagem molecular baseada em PCR convencional descrita por Zhang & Blackwell (2001). Nesse trabalho, após a PCR convencional foi realizado o sequenciamento e análise filogenética de mais de 40 fungos da ordem

Diaporthales, inclusive diferentes espécies do gênero *Discula* visando, especificamente, a caracterização da espécie *D. destructiva*. Foram utilizados os *primers* NS1 e NS6 para a amplificação de fragmentos do gene que codifica a subunidade menor do rRNA (SSU rRNA) e os *primers* ITS3 e LR3 para a amplificação de fragmentos do gene que codifica a subunidade maior do rRNA (LSU nrDNA), ambos descritos em trabalhos anteriores. Adicionalmente foram desenhados no trabalho em questão *primers* para amplificar fragmentos do gene que codifica a RNA polymerase II (RPB2), RPB2-P2F e RPB2-P3R. Todos os *primers* descritos podem ser visualizados na Tabela abaixo.

Gene/região	Sequências dos <i>primers</i> (forward/reverse)	Referências
SSU	NS1: 5'- GTAGTCATATGCTTGTCTC - 3' NS6: 5'- GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC - 3'	White et al., 1990
LSU	LR3: 5'- CCGTGTTCAGACGGG - 3' ITS3: 5'- GCATCGATGAAGAACGCAGC - 3'	Rehner and Samuels 1995
RPB2	RPB2-P2F: 5'- GGAAGTGGAGGAGTACGAG - 3' RPB2-P3R: 5'- CTGGTTGTGGTCGGGAAGGG - 3'	Zhang & Blackwell, 2001

### Referências Bibliográficas:

CABI (2021). Datasheet: *Discula destructiva* (anthracnose of dogwood). Disponível em <https://www.cabi.org/isc/datasheet/20079> Acesso em 22 de fevereiro de 2021.

Daughtrey ML, Hibben CR, Britton KO, Windham MT, Redlin SC. Dogwood anthracnose: Understanding a disease new to North America. *Plant Disease*. 1996;80(4):349–58.

Mantooth, K., Hadziabdic, D., Boggess, S., Windham, M., Miller, S., Cai, G., ... & Trigiano, R. (2017). Confirmation of independent introductions of an exotic plant pathogen of *Cornus* species, *Discula destructiva*, on the east and west coasts of North America. *PloS one*, 12(7), e0180345.

Rehner, S. A., & Samuels, G. J. (1995). Molecular systematics of the Hypocreales: a teleomorph gene phylogeny and the status of their anamorphs. *Canadian Journal of Botany*, 73(S1), 816-823.

Zhang, N., & Blackwell, M. (2001). Molecular phylogeny of dogwood anthracnose fungus (*Discula destructiva*) and the Diaporthales. *Mycologia*, 93(2), 355-365.

Wanderley, M. das G.L.; Shepherd, G. J.; Giulietti, A. M. (Coord.) Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. São Paulo: FAPESP: HUCITEC, 2002.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.

## **II.17 *Endophyllum kaernbachii***

### **Classificação taxonômica:**

Reino: Fungi  
Fil: Basidiomycota  
Classe: Pucciniomycetes  
Ordem: Pucciniales  
Família: Pucciniaceae  
Gênero: *Endophyllum*  
Espécie: *Endophyllum kaernbachii*

### **Motivo da inclusão na lista:**

*Endophyllum kaernbachii* é um fungo patogênico causador de doença em plantas da família Convolvulaceae, especialmente nos gêneros *Ipomoea* sp e *Merremia* sp, mas também alguns outros (CABI, 2021). Esse fungo foi descrito pela primeira vez por Henn (1892) e nomeado por Stevens & Mendiola (1931). Quando infectadas, as plantas apresentam manchas amarelo-claras que se desenvolvem acima e abaixo das folhas, a cerca de 2-3 mm de diâmetro e a folha incha na região do tório, o que provoca alterações em seu formato, assim como o murchamento e a queda (Stevens & Mendiola, 1931). Existem poucos trabalhos a respeito desse patógeno e os países da Ásia são os mais afetados por essa doença, sendo registrados casos na China, Índia, Japão, Indonésia, Malásia, Paquistão, Filipinas, Sri Lanka, Taiwan e Tailândia. Além desses, têm-se registros em dois arquipélagos na Oceania (Papua Nova Guiné e Nova Caledônia), assim como no Sudão e Tanzânia, na África (CABI, 2021). Entretanto, como os seus hospedeiros existem em outras regiões do mundo com condições ambientais favoráveis, esta espécie pode representar um risco para plantas agrícolas ou nativas de outros países. No Brasil ainda não se têm registros desse patógeno. Contudo, existem várias espécies nativas dos gêneros que têm sido afetados, tais como *Ipomoea cairica*, também chamada de corriola, jetirana, jitirana e ipomeia, que é uma trepadeira herbácea, e *Merremia cissoides*, dentre outras (Leite et al., 2005; Lima, 2017). Por esse motivo considera-se muito importante restringir a introdução e utilização de *E. kaernbachii* no país, pois esse patógeno pode efetivamente representar uma ameaça a essas plantas caso seja introduzido.

### **Método de identificação:**

Considerando a restrição de uso, quando houver pedidos de registro de fungos do gênero *Endophyllum* é necessário confirmar se não se trata da espécie *E. kaernbachii*. Como são poucos os trabalhos que estudam esse patógeno, não foi encontrado método de identificação molecular especificamente para esta espécie. Entretanto, várias outras espécies do gênero foram identificadas molecularmente e possuem sequências depositadas nos bancos de dados. Por isso, sugere-se utilizar uma abordagem baseada no trabalho descrito por Wood & Crouse (2005), no qual foram identificadas várias outras espécies pertencentes a esse gênero. Com isto, caso alguma outra espécie do gênero seja identificada de forma precisa e específica, fica excluída a possibilidade de que o isolado se trate de *E. kaernbachii*. No referido trabalho, foi realizada PCR convencional, seguido de sequenciamento e análise filogenética utilizando dois conjuntos de primers, o primeiro: ITS1f e ITS4b e o segundo: ITS5 e ITS4b (encontram-se descritos na tabela abaixo), com objetivo de amplificar a região ITS, abordagem que se mostrou eficiente na identificação de diversas espécies do gênero. Entretanto, se não houver identificação positiva de que o isolado se trata de outra espécie do gênero e, consequentemente, não se

exclua a possibilidade de ser *E. kaernbachii*, características morfológicas precisam ser analisadas e enviadas para confirmar que não se trata dessa espécie.

Dentre as características a serem apresentadas, é importante constarem informações acerca das hifas e teliósporos, sugerindo-se utilizar como base para comparação o trabalho de Hiratsuka, 1992. Caso isso não seja feito ou não seja possível, com base nas características morfológicas, excluir a possibilidade do microrganismo ser *E. kaernbachii*, seu uso do microrganismo fica negado.

Gene/região	Sequências dos primers (foward/reverse)	Referências
ITS	ITS1f: 5' - CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA - 3' ITS4b: 5' - CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG - 3'	Gardes & Bruns 1993
ITS	ITS5: 5' - GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG - 3' ITS4b: 5' - CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG - 3'	White et al. 1990; Gardes & Bruns 1993

### Referências Bibliográficas:

CABI (2021). Datasheet: *Endophyllum kaernbachii*. Disponível em <https://www.cabi.org/isc/datasheet/107835>. Acesso em: 22 de fevereiro de 2021.

Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology*, 2(2), 113-118. Henn. (1892), In: Engler's Bot. Jahrb. 15:5

Leite, K. R. B., Simão-Bianchini, R., & Santos, F. D. A. R. D. (2005). Morfologia polínica de espécies do gênero *Merremia* Dennst. (Convolvulaceae) ocorrentes no Estado da Bahia, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 19(2), 313-321.

Lima, A. A. R. (2017). Convolvulaceae do Parque Estadual Serra do Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil (Doctoral dissertation, Instituto de Botânica). Disponível em: [https://smastr16.blob.core.windows.net/pgibt/2018/03/adenilsa\\_aparecida\\_rodrigues\\_lima\\_ms.pdf](https://smastr16.blob.core.windows.net/pgibt/2018/03/adenilsa_aparecida_rodrigues_lima_ms.pdf) Acesso em: 22 de fevereiro de 2021.

Stevens FL; Mendiola VB, 1931. Aeciod short cycle rust of the Philippine Islands. *The Philippine Agriculturist*, 20:3-17. Disponível em <https://www.cabi.org/isc/abstract/20077200120> Acesso em 22 de fevereiro de 2021.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990): Amplification and directsequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic analysis. In PCR protocols: A guide to methods and applications Edited by: InnisMA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ. San Diego, Academic Press:315-322.

Wood, A. R., & Crous, P. W. (2005). Morphological and molecular characterization of *Endophyllum* species on perennial asteraceous plants in South Africa. *Mycological Research*, 109(4), 387-400.

## II.18 *Gerwasia* sp.

### Classificação taxonômica:

Reino: Fungi  
Filho: Basidiomycota  
Classe: Pucciniomycetes  
Ordem: Pucciniales  
Família: Phragmidiaceae  
Gênero: *Gerwasia*

### Motivo da inclusão na lista

O gênero *Gerwasia* é composto por mais de 15 espécies, sendo conhecido como um gênero de fungos de ferrugem pertencente à família Phragmidiaceae. Dentre as várias espécies patogênicas do gênero, destacam-se *G. imperialis*, *G. variabilis*, *G. rubi*, *G. rosae* e *G. mayorii*. Os fungos desse gênero acometem principalmente plantas do gênero *Rubus*, representado pela Amoreira, mas há relatos também de acometimento de plantas do gênero *Rosa* spp. (Zhuang, 1983; CABI, 2021a). Contudo, são muito escassos os trabalhos que relatam a doença causada por fungos do gênero *Gerwasia* e, por isso, pouco se tem documentado a respeito da interação desses fungos com seus hospedeiros e os sintomas que causam nos mesmos. A maioria dos casos de infecção fúngica relatados são na Venezuela, Peru, Argentina e Bolívia (CABI, 2021a), assim como Colômbia e Equador (CABI, 2021b), mas há relatos de casos na África do Sul (Watson, 1971), além de China, Indonésia, Japão, Nepal, Tailândia e Vietnã (CABI, 2021c). Até o momento não foram encontrados relatos da presença desses fungos no Brasil, mas, como comentado, isso pode ser decorrência dos poucos estudos realizados com o gênero. Adicionalmente, plantas do gênero *Rubus* podem ser encontradas em várias partes do mundo com condições ambientais favoráveis e possuímos diversas espécies nativas no Brasil, que habitam predominantemente as regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul, sendo as principais reportadas: *R. boliviensis*, *R. brasiliensis*, *R. erythrocladus*, *R. imperialis*, *R. schottii*, *R. sellowii* e *R. urticifolius*, (Barcelos & Heiden, 2015). Dessa maneira, espécies de fungos do gênero *Gerwasia* podem representar uma ameaça às plantas nativas ou mesmo plantas agricultáveis, o que justifica a necessidade de se ter controle de sua entrada e disseminação no Brasil.

### Método de identificação:

Devido à restrição de uso, sempre que houver pedidos de registro de fungos da família Phragmidiaceae, é necessário garantir que não se tratam de espécies do gênero *Gerwasia*. Como há poucos estudos que investigam as espécies de *Gerwasia* sp., quase não há relatos da utilização de métodos moleculares para a identificação, especificamente dessas espécies, o que tem ocorrido utilizando-se, principalmente, chaves baseadas em características morfológicas (Yun et al., 2021). Entretanto, no trabalho de McTaggart e colaboradores (2016), mais de 70 espécies de fungos da família Phragmidiaceae, incluindo *G. rubi*, foram analisadas filogeneticamente por meio de métodos moleculares. Para tal foram utilizadas regiões dos genes que codificam a subunidade 28S do rRNA (LSU) e do gene que codifica a citocromo C oxidase subunidade 3 (CO3), previamente depositadas no GenBank. Outros trabalhos também têm relatado a identificação de alguns membros da família Phragmidiaceae, utilizando a amplificação de sequências do rDNA 28S, especificamente os domínios D1 e D2, para as quais uma ampla gama de espécies de gêneros da família têm sequências depositadas (Zuluaga et al., 2011). Dessa maneira, sugere-se utilizar para uma possível identificação molecular, *primers* para a amplificação dessa região,

sendo os mais comumente utilizados na literatura NL1 e NL4 (White et al., 1990), descritos na tabela abaixo. Caso seja possível definir de forma específica a partir dessa abordagem que o fungo de interesse pertence a qualquer outro gênero da família Phragmidiaceae, fica garantida a sua utilização. Por outro lado, caso seja possível obter identificação positiva com alguma espécie do gênero *Gerwasia* ou não seja possível obter identificação precisa ao nível de gênero, torna-se necessário, de forma adicional, a confirmação de que não se tratam de membros de *Gerwasia* sp. mediante utilização de características morfológicas.

Dentre as características morfológicas a serem apresentadas, devem constar obrigatoriamente informações a respeito das espermogônias, esporos e da aécia, sugerindo-se utilizar como base de dados para comparação as descrições presentes nos trabalhos de Hiratsuka & Cummins, (1963) e Hernández & Hennen, (2003). Caso as informações não sejam apresentadas ou não seja possível excluir a possibilidade do fungo pertencer ao gênero *Gerwasia* com base nas mesmas, o uso do microrganismo fica negado.

Primers	Sequências
NL1	5' – GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG – 3'
NL4	5' – GGTCCGTGTTCAAGACGG – 3'

### Referências Bibliográficas:

Barcelos, L. B., & Heiden, G. (2015). Distribuição geográfica de espécies de amora (*Rubus*, Rosaceae) nativas do Brasil. In *Embrapa Clima Temperado-Artigo em anais de congresso (ALICE)*. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 24; ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 17., 2015, Pelotas.[Anais.]. Pelotas: UFPel.

CABI (2021a) Dataset: *Gerwasia imperialis*. Disponível em <https://www.cabi.org/isc/datasheet/107837>  
Acesso em 19 de fevereiro de 2021

CABI (2021b) Dataset: *Gerwasia variabilis*. Disponível em <https://www.cabi.org/isc/datasheet/108970>  
Acesso em 19 de fevereiro de 2021

CABI, (2021c). Dataset: *Gerwasia rubi*. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/107839>.  
Acesso em: 19 de fevereiro de 2021.

Hernández, J. R., & Hennen, J. F. (2003). Rust fungi causing galls, witches' brooms, and other abnormal plant growths in northwestern Argentina. *Mycologia*, 95(4), 728-755.

Hiratsuka, Y., & Cummins, G. B. (1963). Morphology of the spermogonia of the rust fungi. *Mycologia*, 55(4), 487-507.

Watson A J.,(1971). *Agriculture Handbook*. 111 pp.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocols: A guide to methods and applications Edited by: InnisMA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ. San Diego, Academic Press:315-322.

Yun, H.Y. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. . Invasive Fungi. Asian rose rust-*Gerwasia rosae*. Retrieved February 19, 2021, from /sbmlweb/fungi/index.cfm.

Zhuang J Y, 1983. A provisional list of Uredinales of Fujian Province, China. *Acta Mycologica Sinica*. 2 (3), 146-158. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/A-PROVISIONAL-LIST-OF-UREDINALES-OF-FUJIAN-CHINA-Jian-yun/fd2b528ce704226f1d8a365d6d1a6e0a932aa81a#paper-header>. Acesso em: 19 de fevereiro de 2021.

Zuluaga, C., Buritica, P., & Marin, M. (2011). Phylogenetic analysis of rust fungi (Uredinales) from the Colombian Andean region using 28S ribosomal DNA sequences. *Revista de biología tropical*, 59(2), 517-540. Disponível em <https://europepmc.org/article/med/21721227>. Acesso em: 19 de fevereiro de 2021.

## II.19 *Gibberella circinata*

### Classificação taxonômica:

Reino: Fungi  
Filho: Ascomycota  
Classe: Sordariomycetes  
Ordem: Hypocreales  
Família: Nectriaceae  
Gênero: *Gibberella*  
Espécie: *Gibberella circinata*

### Motivo da inclusão na lista:

*Gibberella circinata* é um fungo patogênico que acomete várias espécies de plantas do gênero *Pinus*, nativas da América do Norte, causando nelas uma forma de cancro, doença que é considerada atualmente uma das maiores ameaças globais para esse gênero de plantas (Drenkhan et al., 2020). Entretanto, o patógeno também afeta diversas espécies de outras famílias, tais como Orchidaceae, Poaceae e Musaceae (CABI, 2021) e foi isolado de plantas assintomáticas das famílias Asteraceae, Lamiaceae, Rosaceae (Drenkhan et al., 2020). O nome *G. circinata* corresponde ao estágio teleomórfico desse fungo, sendo *Fusarium circinatum* o nome no seu estágio anamórfico (Nirenberg & O'Donnell, 1998). A doença causada por *G. circinata* foi registrada pela primeira vez em 1946 no sudeste dos Estados Unidos, sendo considerada uma praga invasiva de grande preocupação em países onde plantas de *Pinus* são consideradas importantes espécies madeireiras (Hepting & Roth, 1946; CABI, 2021). A infestação do fungo se expandiu pelas décadas seguintes e os registros mais atuais indicam que existem em torno de 14 países ao redor do mundo nos quais ele foi encontrado causando sintomas dessa doença em coníferas: França, Itália, Espanha e Portugal no continente Europeu, Japão e Coréia do Sul na Ásia, África do Sul na África, além de Estados Unidos, México e o Haiti na América do Norte e Brasil, Chile, Colômbia e Uruguai na América do Sul. Nos países da Oceania, por sua vez, esta doença não tem sido reportada e por isso restrições de quarentena se encontram em vigor (Drenkhan et al., 2020; CABI, 2021). Em condições favoráveis este patógeno pode acometer cultivos de pinheiros, incluindo florestas naturais e plantadas, e pode afetar todos os estágios de vida das árvores, desde mudas emergentes até árvores maduras (CABI, 2021). Os primeiros sinais da infecção são o murchamento e descoloração das agulhas distais que se tornam cloróticas e por fim adquirem uma coloração vermelha e marrom e caem, o que geralmente resulta na morte do ramo e em último estágio de toda a árvore (Gordon et al., 2001). Várias partes da planta podem ser infectadas como brotos, galhos, cones, sementes, caules e raízes, adicionalmente, a infecção pode ocorrer em qualquer época do ano, mas os sintomas podem variar de acordo com o hospedeiro do fungo, a idade do ramo infectado, assim como das condições bióticas e abióticas do local (Gordon, 2006; CABI, 2021). No Brasil, o primeiro relato desse patógeno ocorreu em 2014 (Pfenning et al., 2014), sendo encontrado em mudas sintomáticas de *Pinus* colhidas no Estado de Santa Catarina. Ressalta-se que Brasil possui diversas espécies nativas de algumas das famílias afetadas por este fitopatógeno, como Poaceae, Rosaceae e Asteraceae (Ferreira et al., 2001; Kawakita et al., 2016). Dessa forma e considerando também o fato de *G. circinata* possuir diversas características de invasibilidade que favorecem seu potencial de dispersão e estabelecimento em locais que possuam plantas susceptíveis, como a capacidade de se mover em sementes infestadas, de sobreviver no solo e estabelecer infecções latentes nas mudas (CABI, 2021), pode-se inferir que estratégias que minimizem o risco de disseminação desse

patógeno no Brasil devem ser consideradas. Essas medidas são importantes para se evitar tanto perdas econômicas quanto o possível acometimento das espécies nativas, o que afetaria o ecossistema brasileiro como um todo.

### Método de identificação:

Tendo em vista o exposto e considerando a necessidade de restrição de uso, sugere-se que quando houver pedidos de registro de fungos do gênero *Giberella* sp. ou *Fusarium* sp. seja necessário confirmar que o isolado não pertença à espécie *Gibberella circinata* (fase teleomórfica) / *Fusarium circinatum* (fase anamórfica). Para essa confirmação, a maioria dos trabalhos mais recentes estão tendendo a utilizar técnicas de qPCR, especialmente devido à maior sensibilidade e rapidez para obtenção dos resultados (Stehlikova et al., 2020). Entretanto, alguns trabalhos também conseguiram obter identificação precisa e confiável a partir de técnicas de PCR convencional e, dentre eles, sugere-se utilizar a abordagem descrita no trabalho de Pfenning e colaboradores (2014). Neste trabalho, foi realizada, além de identificação, análise filogenética de fungos dessa e outras espécies do gênero a partir da amplificação de sequências parciais de dois genes por meio de técnicas de PCR convencional, sendo eles: fator de alongamento da tradução 1- $\alpha$  (TEF), usando os primers EF1 forward e EF2 reverse e Calmodulina A (*cmd*), utilizando os primers CL1 forward e CL2A. Os primers utilizados se encontram descritos na tabela abaixo:

Gene/região	Sequências dos primers (forward/reverse)
TEF	EF1F: 5'- ATG GGT AAG GAG GAC AAG AC - 3' EF2R: 5'- GGA AGT ACC AGT GAT CAT GTT - 3'
<i>cmd</i>	CL1 F: 5'- GAR TWC AAG GAG GCC TTC TC - 3' CL2A R: 5'- TTT TTG CAT CAT GAG TTG GAC - 3'

### Referências Bibliográficas:

CABI. Datasheet: *Gibberella circinata* (pitch canker). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/25153>. Acesso em: 16 de fevereiro de 2021.

Drenkhan, R., Ganley, B., Martín-García, J., Vahalík, P., Adamson, K., Adamčíková, K., ... & Mullett, M. S. (2020). Global geographic distribution and host range of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker. *Forests*, 11(7), 724.

Ferreira, A. G., Cassol, B., Rosa, S. G. T. D., Silveira, T. S. D., Stival, A. L., & Silva, A. A. (2001). Germinação de sementes de Asteraceae nativas no Rio Grande do Sul, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 15(2), 231-242.

Gordon, T. R., Storer, A. J., & Wood, D. L. (2001). The pitch canker epidemic in California. *Plant disease*, 85(11), 1128-1139.

Gordon, T. R. (2006). Pitch canker disease of pines. *Phytopathology*, 96(6), 657-659.

Hepting, G. H., Roth, E. R. (1946) Pitch canker, a new disease of some southern pines. *Journal of Forestry* 44,724-744.

Kawakita, K., Rodrigues, R. S., & Filgueiras, T. S. (2016). Poaceae em uma planície de inundação no Brasil: listagem florística e novas ocorrências. *Hoehnea*, 43(2), 203-216.

Nirenberg, H. I., & O'Donnell, K. (1998). New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90(3), 434-458.

Pfenning, L. H., Costa, S. D. S., Melo, M. P. D., Costa, H., Ventura, J. A., Auer, C. G., & Santos, Á. F. D. (2014). First report and characterization of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pitch canker in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 39(3), 210-216.

Stehlíková, D., Luchi, N., Aglietti, C., Pepori, A. L., Diez, J. J., & Santini, A. (2020). Real-time loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Fusarium circinatum*. *BioTechniques*, 69(1), 11-17.

## II.20 *Gibberella indica*

### Classificação taxonômica:

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Classe: Sordariomycetes

Ordem: Hypocreales

Família: Nectriaceae

Gênero: *Gibberella*

Espécie: *Gibberella indica*

### Motivo da inclusão na lista:

*Gibberella indica* é uma espécie de fungo patogênico causador da murcha do feijão guandu (*Cajanus cajan*), sendo relatado pela primeira vez na Índia (Butler, 1908). O nome *G. indica* se refere ao estado teleomorfo do fungo (Rai & Upadhyay, 1981) e *Fusarium udum* é o nome desse patógeno na sua forma anamórfica (Butler, 1910), sendo muitas vezes o mais usado na literatura. Este fungo é um patógeno considerado bem distribuído ao longo do planeta, com relatos da sua presença em vários países asiáticos, vários países africanos, assim como na América do Sul e do Norte (Hillocks et al., 2000; Sharma et al., 2016; Pfenning et al., 2019; CABI, 2021). A infecção por esse patógeno ocorre a partir da sua invasão nas raízes das plantas ou de ferimentos presentes no caule, sendo a origem desse fungo, geralmente, próprio o solo (Karimi et al., 2012). Essa infecção pode ocorrer em todos os estágios de desenvolvimento da planta e os sintomas iniciais da doença são a perda de turgidez das folhas pela clorose, clareamento interinal, podendo ocorrer também o míldio das folhas com murchamento e secagem. Posteriormente, ocorre a colonização interna dos vasos do xilema pelo patógeno, seguida pelo aparecimento de estrias marrons/roxas, que são os sintomas característicos da doença. Ao longo do desenvolvimento da doença pode ocorrer também, além do murchamento das folhas, a secagem de alguns de seus ramos ou até da planta inteira, o que ocorre, geralmente, entre 4 e 6 semanas após o plantio (Pfenning et al., 2019; CABI, 2021). As perdas econômicas causadas pela doença dependem do estado de ocorrência da murcha. Se ela ocorrer antes da poda, a perda é total, no entanto se ela ocorrer no estágio de enchimento da vagem ou posteriormente, ocorre apenas perda parcial (CABI, 2021). No Brasil, estudos têm identificado que esse fungo não atinge apenas o feijão guandu, mas também *Crotalaria*, que é um gênero de plantas leguminosas arbustivas de rápido crescimento pertencentes à família Fabaceae e muito comuns no país (Pfenning et al., 2019). Além disso, em estudos de campo esse fungo se mostrou capaz de infectar outras espécies de plantas causando também sintomas de murcha, dentre elas o maracujazeiro, tomateiro, feijão comum, algodão e pepino (Silva et al., 2016). Adicionalmente, sabe-se que esse *G. indica* possui características de invasibilidade que permitem sua dispersão e distribuição em novas áreas a longas distâncias (CABI, 2021). Todos esses fatos evidenciam a necessidade de se controlar a disseminação desse fungo no país visando não só as perdas econômicas, mas também os possíveis prejuízos ecológicos aos ecossistemas brasileiros, uma vez que devido à versatilidade de hospedeiro que esse patógeno possui, poderia afetar alguns representantes nativos de espécies de algodão, crotálias, dentre outras.

### Método de identificação:

Diante da importância de controle de *G. indica*, sugere-se que quando houver pedidos de registro de fungos do gênero *Giberella* sp. ou *Fusarium* sp. seja necessário confirmar se o isolado não se trata da espécie *Gibberella indica* (fase teleomórfica) / *Fusarium udum* (fase anamórfica). Considerando os trabalhos levantados, sugere-se utilizar para a confirmação dessa identidade, a abordagem descrita no trabalho de Pfenning e colaboradores (2019). Neste trabalho, foi realizada uma análise filogenética de fungos da espécie *G. indica* a partir das sequências parciais de três genes, as quais foram amplificadas em reações de PCR convencional a partir de *primers* específicos. Os genes utilizados no estudo foram o fator de alongamento da tradução 1- $\alpha$  (TEF), amplificado a partir dos *primers* EF-1 e EF-2; a  $\beta$ -tubulina (TUB), amplificada com a utilização dos *primers* T1 e T2 e, por fim, a segunda maior subunidade da RNA polimerase II (RPB2) amplificada a partir dos primers 5F2 e 7cR. Todos os *primers* utilizados se encontram descritos na tabela abaixo.

Gene/região	Sequências dos <i>primers</i> (forward/reverse)	Referências
TEF	EF1F 5'-ATGGGTAAAGGA(A/G)GACAAGAC -3' EF2R 5'-GGA(G/A)GTACCAAGT(G/C)ATCATGTT-3'	O'Donnell et al. 1998
TUB	T1 5'- AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3' T2 5'- TAGTGACCCTTGGCCCAGTG-3'	O'Donnell et al. 2000
RPB2	5F2 5' GA(T/C)GA(T/C)(A/C)G(A/T)GATCA(T/C)TT(T/C)GG 3' 7cR 5' CCCAT(A/G)GCTTG(T/C)TT(A/G)CCCAT 3'	Liu et al. 1999

### Referências Bibliográficas:

Butler EJ, 1908. Selection of pigeonpea for wilt disease. Agricultural Journal of India, 3:182-183. Disponível em <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20057001126> Acesso em 15 de fevereiro 2021.

Butler EJ, 1910. The wilt disease of pigeonpea and the parasitism of *Neocosmospora vasinfecta* Smith. Memoirs of the Department of Agriculture in India. Botanical Series, 2:1-64. Disponível em <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20057001223> Acesso em 15 de fevereiro 2021.

CABI. Datasheet: *Gibberella indica* (wilt of pigeon pea). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/24714>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2021.

Hillocks, R. J., Minja, E., Mwaga, A., Silim, N. M., and Subrahmanyam, P. (2000). Diseases and pests of pigeon pea in eastern Africa: a review. *Int. J. Pest Manage.* 46, 7–18.

Karimi, R.; Owuuche, J. O.; Silim, S. N. (2012) Importance and management of *Fusarium* wilt (*Fusarium udum* Butler) of pigeonpea. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research* (IJAAAR), v.2,n.1,p.1–14.

Liu, Y.J., Whelen, S., Hall, B.D. (1999). Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Mol Biol Evol*, 16:1799–1808.

O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E., Ploetz, R.D. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:2044–2049.

O'Donnell, K., Nirenberg, H.I., Aoki, T., Cigelnik, E.A. (2000). Multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience* 41: 61–78Pfenning, L. H., de Melo, M. P., Costa, M. M., Reis, A., Cabral, C. S., Lima, C. S., ... & Costa, S. S. (2019). *Fusarium udum* revisited: a common, but poorly understood member of the *Fusarium fujikuroi* species complex. *Mycological Progress*, 18(1), 107-117.

Pfenning, L. H., de Melo, M. P., Costa, M. M., Reis, A., Cabral, C. S., Lima, C. S., ... & Costa, S. S. (2018). *Fusarium udum* revisited: a common, but poorly understood member of the *Fusarium fujikuroi* species complex. *Mycological Progress*, 1-11.

Rai B; Upadhyay RS (1981). *Gibberella indica*: the perfect state of *Fusarium udum*. *Mycologia*, 74(2):343-346

Sharma, M., Ghosh, R., Telangre, R., Rathore, A., Saifulla, M., Mahalinga, D. M., ... & Jain, Y. K. (2016). Environmental influences on pigeonpea-*Fusarium udum* interactions and stability of genotypes to *Fusarium* wilt. *Frontiers in plant science*, 7, 253.

Silva, T. C. Linhagens filogenéticas do complexo *Fusarium oxysporum* e *Fusarium udum* associadas à murcha do maracujazeiro. (2016). 84 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016. Disponível em[http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/12187/2/DISSERTA%C3%87%C3%83O\\_Linhagens%20filogen%C3%A9ticas%20do%20complexo%20Fusarium%20oxysporum%20e%20Fusarium%20udum%20associadas%20C3%A0%20murcha%20do%20maracujazeiro.pdf](http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/12187/2/DISSERTA%C3%87%C3%83O_Linhagens%20filogen%C3%A9ticas%20do%20complexo%20Fusarium%20oxysporum%20e%20Fusarium%20udum%20associadas%20C3%A0%20murcha%20do%20maracujazeiro.pdf) Acesso em 15 de fevereiro de 2021.

## **II.21 *Gliocephalotrichum bulbilium***

### **Classificação taxonômica:**

Reino: Fungi  
Fil: Ascomycota  
Classe: Sordariomycetes  
Ordem: Hypocreales  
Família: Nectriaceae  
Gênero: *Gliocephalotrichum*  
Espécie: *Gliocephalotrichum bulbilium*

### **Motivo da inclusão na lista:**

*Gliocephalotrichum bulbilium* tem sido relatado como fungo causador da podridão pós-colheita em diversos frutos, principalmente frutos tropicais, apesar da extensão exata de quais frutos ele é capaz de infectar e a forma como isso ocorre ainda não ser tão clara (Serrato-Diaz et al., 2012). O gênero *Gliocephalotrichum* foi estabelecido por Ellis e Hesseltine (1962), sendo a espécie *G. bulbilium*, o seu único representante naquele período. Esse gênero foi caracterizado pela presença de "cerdas" estéreis em um verticilo de conidióforos macronematosos não ramificados. A presença desse fungo ainda não é mundialmente tão bem definida, mas sua ocorrência tem sido reportada em alguns países, como na Tailândia, onde *G. bulbilium*, juntamente com outros fungos, causaram danos em frutos de *Durio graveolens* e *D. kutejensis*, principalmente podridão fúngica pós-colheita, (Sivapalan et al., 1998). Em Porto Rico perdas pós-colheita de rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) foram atribuídas a esse fungo após isolamento de frutos acometidos (Serrato-Diaz et al., 2012). Nos Estados Unidos foram coletados em frutos de Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*), como parte de uma pesquisa de podridão de frutos conduzida em setembro de 2010 em fazendas em Nova Jersey e Massachusetts, (Constantelos et al., 2011) e em junho de 2012, ele foi relatado como o agente causador da podridão de frutas em mangostões em Guangzhou na China (Li et al., 2014). Além desses relatos, esse fungo também foi reportado em folhas de serrapilheira em florestas da Índia e Guiana Francesa (Decock et al., 2006; Singh et al., 2012). No Brasil, essa espécie foi encontrada tanto em folhas de serrapilheira, como em frutos apodrecidos (Silva et al., 2020) e foram confirmados 22 isolados de *G. bulbilium* após a identificação. Para a maioria deles, foram obtidos alinhamentos com isolados obtidos de trabalhos anteriores, entretanto três isolados não tiveram semelhanças com nenhum isolado previamente obtido, sendo considerados novos isolados da espécie, os quais foram atribuídos, especificamente, a frutos coletados no Distrito Federal pelos autores: Jamelão (*Syzygium cumini*), Palmeira Lakka (*Cyrtostachys renda*) e Seriguela (*Spondias purpurea*). Destes, apenas a Seriguela é nativa do Brasil, embora o Jamelão seja da família Myrtaceae, uma família que possui inúmeras espécies nativas no Brasil (Stadnik et al., 2016). Dessa forma, e pelo fato da extensão total de frutos que podem ser acometidos pela podridão fúngica não ser bem definida, conclui-se que existe a necessidade de controlar a utilização de *G. bulbilium*, como tentativa de minimizar perdas econômicas de frutos comerciais, bem como de evitar sua disseminação desenfreada e possível acometimento de espécies nativas, algumas das quais, possivelmente, até mesmo desconhecidas até então.

### **Método de identificação:**

Devido à restrição de uso, sugere-se que quando houver pedidos de registro de fungos do gênero *Gliocephalotrichum* sp. seja necessário confirmar se eles não se tratam de isolados da espécie *G. bulbilium*. Para a confirmação precisa dessa identificação, sugere-se utilizar a abordagem descrita no trabalho de Silva e colaboradores (2020), que conseguiram identificar com confiabilidade diferentes espécies de *Gliocephalotrichum* sp., incluindo *G. bulbilium* a partir de reações de PCR convencional. Para tal, foi utilizado o sequenciamento de algumas porções de quatro *loci* gênico, sendo eles: fator de alongamento de tradução 1- $\alpha$  (TEF) usando os *primers* EF-1F e EF-2R,  $\beta$ -tubulina (TUB) a partir dos *primers* T1 e Bt2b, histona H3 (HIS3) usando os *primers* CYLH3F e CYLH3R e uma porção do rDNA nuclear 18S-5.8S-28S, incluindo espaçadores transcritos internos ITS1 e ITS2 com os *primers* LR5 e V9G. Os *primers* mencionados podem ser visualizados na tabela abaixo.

Gene/região	Sequências dos <i>primers</i> (forward/reverse)	Referências
TEF	EF1F: 5'- TGCAGGTGGTATCGACAAAGC-GT - 3' EF2R: 5'- AGCATGTTGTCGCCGTT-GAAG - 3'	Jacobs et al. 2004
TUB	T1: 5'- AACATGCGTGAGATTGTAAGT - 3' Bt2b: 5'- ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC - 3'	O'Donnell & Cigelnik, 1997; Glass & Donaldson 1995
histona H3	T1: 5'- AACATGCGTGAGATTGTAAGT - 3' Bt2b: 5'- ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC - 3'	Crous et al. 2004
18S-5.8S-28S	LR5: 5'- ATCCTGAGGGAAACTTC - 3' V9G: 5'- TTACGTCCCTGCCCTTGTA - 3'	Vilgalys & Hester 1990; Hoog & Ende 1998

### Referências Bibliográficas:

- Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Risède, J. M., Simoneau, P., & Hywel-Jones, N. L. (2004). *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaeropedunculate vesicles. *Studies in mycology*, 50, 415-430.
- Constantelos, C., Doyle, V. P., Litt, A., & Oudemans, P. V. (2011). First report of *Gliocephalotrichum* *bulbilium* causing cranberry fruit rot in New Jersey and Massachusetts. *Plant disease*, 95(5), 618-618.
- Decock, C., Huret, S., & Charue, P. (2006). Anamorphic fungi from French Guyana: two undescribed *Gliocephalotrichum* species (Nectriaceae, Hypocreales). *Mycologia*, 98(3), 488-498.
- Ellis JJ, Hesseltine CW. 1962. A new genus of *Moniliales* having penicilli subtended by sterile hairs. *Bull Torr Bot Cl* 89:21–27.
- Hoog GS, Ende AHGG. (1998). Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous Basidiomycetes. *Mycoses* 41:183–189.

Jacobs, K., Bergdahl, D. R., Wingfield, M. J., Halik, S., Seifert, K. A., Bright, D. E., & Wingfield, B. D. (2004). *Leptographium wingfieldii* introduced into North America and found associated with exotic *Tomicus piniperda* and native bark beetles. *Mycological research*, 108(4), 411-418.

Li, Y. X., Chen, W. X., Liu, A. Y., Chen, Q. L., & Feng, S. J. (2014). First Report of *Gliocephalotrichum bulbilium* Causing Fruit Rot of Postharvest Mangosteen in China. *Plant disease*, 98(7), 994-994. Disponível em<https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-09-13-0917-PDN> acesso em 12 de fevereiro 2021

O'Donnell, K., & 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.

Vilgalys, R. & M. Hester. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*, 172: 4238-4246.

Serrato-Diaz, L. M., Latoni-Brailowsky, E. I., Rivera-Vargas, L. I., Goenaga, R., & French-Monar, R. D. (2012). First report of *Gliocephalotrichum bulbilium* and *G. simplex* causing fruit rot of rambutan in Puerto Rico. *Plant disease*, 96(8), 1225-1225. Disponível em[https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-02-12-0210-PDN?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%20%200pubmed](https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-02-12-0210-PDN?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200pubmed). Acesso em: 12 de fevereiro de 2021.

Silva, R. A. F. D., de Almeida, C. P., Reis, A., Aguiar, F. M., Chaverri, P., & Pinho, D. B. (2020). Three new species of *Gliocephalotrichum* causing fruit rot on different hosts from Brazil. *Mycologia*, 112(5), 1003-1016.

Singh, S. K., Yadav, L. S., Singh, P. N., Sharma, R., & Mukherjee, G. (2012). Additions to *Gliocephalotrichum* species (anamorphic Hypocreales) from fruit litter of the medicinal plant *Terminalia chebula* in the Western Ghats, India. *Mycoscience*, 53(5), 391-395.

Sivapalan, A., Metussin, R., Harndan, F., & Zain, R. M. (1998). Fungi associated with postharvest fruit rots of *Durio graveolens* and *D. kutejensis* in Brunei Darussalam. *Australasian Plant Pathology*, 27(4), 274-277.

Stadnik, A., Oliveira, M. I. U. D., & Roque, N. (2016). Levantamento florístico de Myrtaceae no município de Jacobina, Chapada Diamantina, estado da Bahia, Brasil. *Hoehnea*, 43(1), 87-97.

## II.22 *Glomerella gossypii*

### Classificação taxonômica:

Reino: Fungi  
Filo: Ascomycota  
Classe: Sordariomycetes  
Ordem: Glomerellales  
Família: Glomerellaceae  
Gênero: *Glomerella*  
Espécie: *Glomerella gossypii*

### Motivo da inclusão na lista:

O fungo *Glomerella gossypii* é o agente causador das doenças antracnose e ramulose, que acomete plantas do gênero *Gossypium*, sendo os seus representantes mais conhecidos, as plantas do algodoeiro. *Glomerella gossypii* corresponde ao nome na fase teleomórfica e *Colletotrichum gossypii*, ao nome na fase anamórfica. Dentre as espécies de algodoeiro afetadas, *G. hirsutum* e *G. barbadense* são as mais suscetíveis a esse patógeno (Jeger et al., 2018). Esse patógeno está presente na maioria das áreas de cultivo de algodão em todo o mundo e há registro de sua presença em vários países nos cinco continentes. Entretanto, *G. gossypii* tende a ser localizado e causar mais impacto nas áreas de maior pluviosidade (EPPO, 2021). Nas áreas infestadas, esse fungo causa a morte ou manchas nas folhas/cápsulas do algodão, podridão, sintomas como o da vassoura-de-bruxa e atrofamento, resultando em perdas de rendimento e qualidade (EPPO, 2021). As plantas mais jovens são mais susceptíveis à doença e é mais grave em mudas e cápsulas, mas as lesões também ocorrem nos caules e folhas das plantas, sendo que as mudas de sementes infectadas murcham e morrem. Em períodos chuvosos, cápsulas infectadas desenvolvem pequenas manchas redondas e encharcadas de água que aumentam rapidamente, tornam-se afundadas até finalmente desenvolverem bordas avermelhadas com centros rosados. No período seco, as áreas afetadas podem ser de cor acinzentada e as cápsulas gravemente doentes tornam-se mumificadas (escurecidas e endurecidas) e nunca se abrem. Quando a infecção da cápsula é parcial, o fungo ainda pode atingir a semente, afetando a sua capacidade de germinar além da fibra, reduzindo a sua qualidade (Nawaz et al., 2018; EPPO, 2021). No Brasil, essa doença foi primeiramente diagnosticada no município de Rancharia (SP), em 1936, mas se encontra disseminada em praticamente todas as regiões do país onde se cultiva o algodão. Inclusive de acordo com as autoridades fitossanitárias brasileiras, esse organismo tem sido considerado uma praga quarentenária não regulamentada, o que faz com que ela seja objeto de padronização em programas de certificação de sementes (Kinati et al., 1997; Almeida et al., 2020). Além das espécies exóticas que foram domesticadas no Brasil para cultivo e produção do algodão, existe uma espécie do gênero *Gossypium*, a *G. mustelinum*, que é nativa com distribuição natural no semi-árido nordestino (Freire, 2000). São conhecidas apenas três pequenas populações dessa espécie, duas no estado da Bahia e uma no Rio Grande do Norte e não é possível garantir com certeza que não poderiam vir a ser afetadas pelo fungo. Dessa forma, fica evidente que o uso desse fungo pode causar danos à biodiversidade brasileira, assim como as perdas econômicas na cadeia de produção do algodão.

### Método de identificação:

Sugere-se que quando houver pedidos de registro de fungos do gênero *Glomerella* (teleomorfo) ou *Colletotrichum* (anamorfo) seja necessário confirmar se eles não se tratam especificamente da espécie

*Glomerella gossypii/Colletotrichum gossypii*. Para essa confirmação, dentre os trabalhos levantados, sugere-se utilizar a abordagem descrita no trabalho de Nawaz e colaboradores (2018). NO referido trabalho, foi desenvolvido um método molecular rápido e robusto de amplificação do gene da  $\beta$ -tubulina (TUB) a partir de culturas contendo diferentes espécies desse gênero utilizando o par de primers SPSCG/F e SPSCG/R em reações de PCR convencional. A reação foi capaz de amplificar apenas *C. gossypii* em culturas contendo misturas de outros *Colletotrichum* spp., tendo sensibilidade para detectar esse fungo mesmo em amostras nas quais suas concentrações de DNA eram até 10 vezes menores que as das outras espécies presentes. Os primers utilizados no trabalho estão descritos na tabela abaixo.

Gene/região	Sequências dos primers (foward/reverse)	Referências
TUB	SPSCG/F: 5' - ATGGAACAGGCAAAACATTCTG - 3' SPSCG/R: 3' - ACGCGTCCATGGTACCG - 5'	Nawaz et al., 2018

#### Referências Bibliográficas:

- Almeida, M. F. D., Costa, S. D. S., Dias, I. E., Siqueira, C. D. S., & Machado, J. D. C. (2020). Specificity and sensibility of primer pair in the detection of *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* in cotton seeds by PCR technique. *Journal of Seed Science*, 42.
- EPPO. Data Sheets on Quarantine Pests: *Glomerella gossypii*. Disponível em: [file:///tmp/mozilla\\_ubiana0/datasheet\\_GLOMGO.pdf](file:///tmp/mozilla_ubiana0/datasheet_GLOMGO.pdf). Acesso em: 10 de fevereiro de 2021.
- Freire, E.C. (2000) Distribuição, coleta uso e preservação das espécies silvestres de algodão no Brasil. Campina Grande: Embrapa Algodão.
- Jeger, M., Bragard, C., Caffier, D., Candresse, T., Chatzivassiliou, E., ... & Rossi, V. (2018). Pest categorisation of *Colletotrichum gossypii*. *EFSA Journal*, 16(6), e05305.
- Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L. E. A.; Rezende, J.A. M. (Ed.). (1997) Manual de Fitopatologia: vol. 2: doenças de plantas cultivadas. São Paulo: Ceres, p. 690-719.
- Nawaz, H. H., Anam, U., Rajaofera, M. N., He, Q., Liu, W., & Miao, W. (2018). Development of SNP-Based Markers to Identify *Colletotrichum gossypii* in Upland Cotton. *Plant disease*, 102(7), 1426-1433.

## II.23 *Hamaspora* sp.

### Classificação taxonômica:

Reino: Fungi  
Fil: Basidiomycota  
Classe: Puccioniomycetes  
Ordem: Pucciniales  
Família: Phragmidiaceae  
Gênero: *Hamaspora*

### Motivo da inclusão na lista:

*Hamaspora* sp. é um gênero de fungos que infectam principalmente espécies de *Rubus*, da família Rosaceae, que é o gênero das amoras e framboesas, e possui mais de 14 espécies dentre as quais várias são consideradas fitopatogênicas, tais como *H. australis*, *H. acutissima*, *H. rubi-sieboldii*, *H. hashiokai*, *H. sinica* var. *sinica*, *H. longíssima* (Monoson, 1969). Em geral, existem poucas informações publicadas a respeito das espécies pertencentes a esse gênero, principalmente porque possuem uma distribuição geográfica muito limitada. Dentre os principais sintomas observados nas plantas acometidas por esses fungos, em geral, está o comprometimento das folhas que passam a apresentar cores e padrões anormais, bem como murcha seguida de queda, o que afeta o desenvolvimento e produtividade da planta como um todo (CABI, 2020). Há relatos de ocorrência de fungos dessas espécies apenas em alguns países da Ásia e da Oceania, além de alguns países da África para algumas das espécies (Monoson, 1969). Todavia, o autor destaca que há uma alta probabilidade de espécies desta família existirem em outras regiões do mundo com condições ambientais semelhantes. No Brasil ainda não há relatos da ocorrência desses fungos, mas são descritas sete espécies nativas do gênero *Rubus* com ocorrência nas regiões Nordeste (BA, PE), Centro-Oeste (DF, GO), Sudeste (MG, SP, ES, RJ) e Sul (PR, SC, RS) (Barcelos e Heiden, 2015). Portanto, considerando todos esses fatores, fungos do gênero *Hamaspora* podem representar uma ameaça para integrantes da flora brasileira e recomenda-se a não introdução e utilização dos mesmos, devido aos potenciais prejuízos ambientais que poderiam ocorrer.

### Método de identificação:

Devido à restrição de uso se estender a todas as espécies do gênero *Hamaspora* é necessário que o solicitante que pretenda registrar isolados pertencentes à família Phragmidiaceae, demonstre que o mesmo não se trata de nenhuma espécie do gênero em questão. A maior limitação relacionada à identificação desses fungos se deve ao fato de serem pouco estudados, o que faz com que escassas informações estejam disponíveis. Apesar das poucas informações, existem algumas sequências dos genes que codificam o rRNA 18S (SSU) e o rRNA 28S (LSU) depositadas no GenBank. Dessa maneira, para a identificação, em um primeiro momento, recomenda-se utilizar o protocolo descrito no trabalho de Aime & McTaggart (2020), que estudaram taxonomicamente fungos da ordem Pucciniales obtidos ao longo de quase 20 anos de amostragem, identificando suas espécies a partir da amplificação de fragmentos desses genes por meio de PCR convencional, incluindo *H. acutissima*. Os primers utilizados no trabalho estão descritos na Tabela abaixo.

Entretanto, caso não seja possível obter identificação confiável em nível de gênero a partir dos ensaios moleculares, as características morfológicas do fungo devem ser apresentadas. Sugere-se utilizar a

chave de identificação descrita por Monoson, 1969, para descartar a possibilidade de que se tratem de qualquer uma das espécies do gênero. Caso isso não seja feito o uso do fungo fica negado

Gene/região	Sequências dos primers (foward/reverse)	Referências
SSU	Rust2INV: 5' - GATGAAGAACACAGTGAAA - 3' LR7: 5' – TACTACCACCAAGATCT – 3'	Aime, 2006; Vilgalys & Hester, 1990
LSU	NS1: 5' – GTAGTCATATGCTTGTCTC – 3' Rust 18S-R: 5' - ACCTTGTACGACTTTACTTC - 3'	White et al., 1990; Aime, 2006

### Referências Bibliográficas:

Aime MC (2006) Toward resolving family-level relationships in rust fungi (Uredinales). *Mycoscience* 47:112–122.

Aime, M. C., & McTaggart, A. R. (2020). A higher-rank classification for rust fungi, with notes on genera. *Fungal Systematics and Evolution*.

Barcelos, L.B. e Heiden, G. (2015). Distribuição Geográfica de espécies de Amora (Rubus, Rosaceae) nativas do Brasil (Base: *Species Link*). Semana Integrada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Pelotas. Disponível:<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/135643/1/Laisa.Rubus.pdf>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2021.

CABI Dataset: *Hamaspore* (2020). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/107845>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2021.

Monoson H.L. (1969). The species of *Hamaspore*. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 37(3):263-272.

Vilgalys, R, Hester, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J. Bacteriol*, 172:4238–4246.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. e Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, California. pp 315–322.

## II.24 *Harpophora maydis*

### Classificação taxonômica:

Reino: Fungi  
Fil: Ascomycota  
Classe: Sordariomycetes  
Ordem: Magnaporthales  
Família: Magnaporthaceae  
Gênero: *Harpophora*  
Espécie: *Harpophora maydis*

### Motivo da inclusão na lista:

*Harpophora maydis* é um fungo que causa a murcha tardia, infectando principalmente espécies de cultivares de milho e sendo considerado um dos patógenos mais destrutivos desses cultivares (Ghazy et al., 2017). O principal sintoma da doença é o rápido e moderado murchamento das folhas das plantas de milho, tornando-as secas e verdes opacas, eventualmente com perda de cor e progredindo para o topo da planta. Pode ocorrer descoloração dos feixes vasculares no caule tornando-os marrom-avermelhado, com porções inferiores do caule secas, encolhidas e ocas. Algumas plantas desenvolvem ainda estrias amareladas a roxas ou marrom-escuras na parte inferior do caule. Lesões necróticas também podem aparecer nas raízes das plantas de milho pouco tempo após a inoculação (CABI, 2020; Degani et al., 2018). Inicialmente este fungo foi descrito como *Cephalosporium maydis* por Samra e colaboradores em 1963, mas Gams (2000) refez a classificação do microrganismo baseando-se em semelhanças com a fase anamorfa dos gêneros *Gaeumannomyces* e *Magnaporthe* e de suas colônias que apresentam crescimento rápido, são delgadas e pigmentadas (Ward & Bateman, 1999; Saleh & Leslie, 2004). Apesar de ter o milho como principal alvo, são registradas infecções em representantes das famílias Malvaceae e Fabaceae (CABI, 2020). O patógeno foi registrado de forma comprovada apenas em alguns países da África, Ásia e Europa, onde foi responsável por graves prejuízos financeiros, entretanto indícios apontam que ele vem se espalhando (Molinero-Ruiz et al., 2010; Degani et al., 2018). Ele é transmitido pelo solo, se disseminando a partir de seu revolvimento e também pela semente contaminada (Degani et al., 2018). Adicionalmente, é um fungo considerado invasivo tanto dentro quanto fora de sua área nativa e possui diversas características de invasividade, tais como crescimento rápido, reprodução assexuada e alta variabilidade genética (CABI, 2020). Dessa maneira, acredita-se que integrantes desta espécie podem representar uma ameaça para a flora brasileira em geral, e principalmente para as três famílias citadas nos casos das infecções relatadas (Malvaceae, Fabaceae e Poaceae), principalmente pelo fato de possuirmos muitos representantes nativos de todas essas famílias (Santos et al., 2010). No caso da família Malvaceae, inclusive, muitas espécies não só são nativas, mas endêmicas do território brasileiro, principalmente do cerrado (Rigueiral et al., 2019; Kawakita et al., 2016). Desta forma, considerando os dados apresentados, recomenda-se a não utilização deste fungo, devido aos potenciais prejuízos ambientais que possam ocorrer.

### Método de identificação:

Devido à restrição de utilização ser em nível de espécie, sempre que houver pedidos de registro de fungos do gênero *Harpophora* é necessário que seja demonstrado que não se trate, especificamente, de *H. maydis*. Dentre os trabalhos levantados para a identificação deste microrganismo, indica-se a

utilização do protocolo elaborado por Degani & Cernica (2014). Neste trabalho, cujo objetivo foi elaborar um protocolo para detecção e identificação dessa espécie, os autores modificaram um ensaio molecular consolidado para *H. bruijni*, utilizando dois novos conjuntos de *primers* (A200F/R e Am42/43) sob diferentes condições. O conjunto de *primers* A200F/R é responsável por amplificar um fragmento específico de *H. maydis* e o conjunto de *primers* Am42/43 é responsável por amplificar um fragmento do gene que codifica o rRNA 18S (SSU). Os *primers* mencionados se encontram descritos na Tabela abaixo.

Gene/região	Sequências dos <i>primers</i> (forward/reverse)
SSU	A200F: 5'-CCTAGTAGCCCCGACTGTTAGG-3' A200R: 5'-TTGGTTCACCGTCTTTGTAGG-3'
Fragmento específico de <i>H. maydis</i>	Am42: 5'-CAACTACGAGCTTTAACTGC-3' Am43: 5'-CAAATTACCCAATCCCGACAC-3'

#### Referências Bibliográficas:

CABI Dataset: *Harpophora maydis* (late wilt of maize) (2020). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/109285>. Acesso em: 17 de fevereiro de 2021.

Degani, O., e Cernica, G. (2014). Diagnosis and Control of *Harpophora maydis*, the Cause of Late Wilt in Maize. *Advances in Microbiology*, 4, 94-105.

Degani, O., Dor, S., Movshowitz, D., Fraidman, E., & Rabinovitz, O. (2018). Effective chemical protection against the maize late wilt causal agent, *Harpophora maydis*, in the field. *PLoS One*, 13(12), e0208353.

Gams, W. (2000). *Phialophora* and some similar morphologically little-differentiated anamorphs of divergent ascomycetes. *Stud Mycol.* 45: 187-199.

Ghazy, N. A., El-Gremi, S., & Belal, E. S. (2017). Chemical and Histological Differences of Corn (*Zea mays* L.) Responsive to *Harpophora maydis* Infection. *Environment, Biodiversity and Soil Security*, 1(2017), 191-201.

Kawakita, K., Rodrigues, R. S., & Filgueiras, T. S. (2016). Poaceae em uma planície de inundação no Brasil: listagem florística e novas ocorrências. *Hoehnea*, 43(2), 203-216.

Molinero-Ruiz ML; Melero-Vara JM; Mateos A. (2010). *Cephalosporium maydis*, the cause of late wilt in maize, a pathogen new to Portugal and Spain. *Plant Disease*, 94(3):379.

Santos, A. P., Zatta, D. T., Moraes, W. F., Bara, M. T. F., Ferri, P. H., Silva, M. D. R. R., & Paula, J. R. (2010). Composição química, atividade antimicrobiana do óleo essencial e ocorrência de esteróides

nas folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(6), 891-896.

Rigueiral, L. H. G., Gonçalez, V. M., & Duarte, M. C. (2019). Espécies nativas de *Hibiscus* (Malvoideae, Malvaceae) da Região Sudeste do Brasil. *Rodriguésia*, 70.

Saleh, A.A. and Leslie, J.F. (2004). *Cephalosporium maydis* is a distinct species in the *Gaeumannomyces-Harpophora* species complex. *Mycologia* 96: 1294-1305.

Ward, E. e Bateman, G.L. (1999). Comparison of *Gaeumannomyces*- and *Phialophora*-like fungal pathogens from maize and other plants using DNA methods. *New Phytologist* 141: 323-331.

Zeller, K. A., Jurgenson, J. E., El-Assiuty, E. M. e Leslie, J. F. (2000). Isozyme and Amplified Fragment Length Polymorphisms from *Cephalosporium maydis* in Egypt. *Phytoparasitica*, Vol. 28, pp. 121-130

## II.25 *Heterobasidion* sp.

### Classificação taxonômica:

Reino: Fungi  
Filo: Basidiomycota  
Classe: Agaricomycetes  
Ordem: Russulales  
Família: Bondarzewiaceae  
Gênero: *Heterobasidion*

### Motivo da inclusão na lista:

O gênero *Heterobasidion* sp. é formado por cinco espécies principais de fungos, entretanto o número total de espécies é bem maior porque duas delas, na verdade, consistem em complexos formados por várias espécies (Garbelotto & Gonthier, 2013). Os fungos desse gênero infectam e causam as chamadas podridões-brancas em uma extensa gama de hospedeiros das famílias de coníferas Araucariaceae, Pinaceae e Cupressaceae (Tuia), mas também são registrados casos em representantes das famílias Rosaceae (Roseira, *Sorbus*) e Salicaceae (Salgueiro) (EMBRAPA, 2008; Shamoun et al., 2019). Dentre as principais espécies fitopatogênicas, destacam-se *H. parviporum*, *H. insulare*, *H. annosum*, *H. araucareae*, *H. abietinum*, *H. irregulare* e *H. occidentale*. Elas são conhecidas por causar o apodrecimento das raízes, da base do caule e, internamente, do tronco das árvores infectadas (Vasiliauskas e Stenlid, 1998, EMBRAPA, 2008). Entretanto, a extensão dos sintomas e da podridão varia em função das espécies patogênicas envolvidas, a espécie da árvore infectada, sua idade e até mesmo as condições climáticas do local (Garbelotto & Gonthier, 2013). Esses fitopatógenos são distribuídos de acordo com as espécies, sendo *H. parviporum* encontrado na Ásia, África e América do Norte; *H. insulare* na Ásia, Europa e Oceania; *H. annosum* na Ásia, Europa, América do Norte e Oceania; *H. araucareae* apenas na Oceania; *H. abietinum* apenas na Europa; e *H. irregulare* e *H. occidentale* apenas na América do Norte (CABI, 2020; Boddy, 2016). Esses fungos são responsáveis por graves prejuízos econômicos devido à mortalidade de árvores, e redução e deterioração na produção da madeira e, consequente, desequilíbrio ambiental (Shamoun et al., 2019). Não foram encontrados registros da ocorrência de espécies do gênero *Heterobasidion* no Brasil. Todavia, considerando-se a gravidade da doença causada por espécies deste fungo, e ao fato da ação patogênica se estender a uma ampla gama de hospedeiros distribuídos em diferentes famílias, das quais possuímos representantes nativos na flora brasileira, como a araucária brasileira, *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) e o pessegueiro-bravo, *Prunus sellowii* (Rosaceae), dentre outros (Leal et al., 2009), entende-se que há ameaça direta às espécies vegetais citadas. Adicionalmente ao fato de serem fungos que possuem capacidade de invasão em ambientes com condições favoráveis, recomenda-se a não utilização das espécies do gênero sob quaisquer condições.

### Método de identificação:

Existe uma dificuldade muito grande em se identificar fungos do gênero *Heterobasidion* em nível de espécie (Garbelotto & Gonthier, 2013). Entretanto, como a restrição de uso se estende ao gênero como um todo, apenas é necessário que em casos de pedido de registro para representantes da família Bondarzewiaceae, o solicitante demonstre a certeza de que o microrganismo pretendido não pertença a esse gênero em questão. Para a identificação destes microrganismos, indica-se o protocolo

estabelecido por Shamoun e colaboradores (2019), por ter se mostrado um método eficiente para a identificação de diferentes espécies do mesmo gênero. Os *primers* utilizados são responsáveis por amplificar fragmentos dos genes que codificam o Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GPD) e o fator de elongação 1-alfa (TEF), além da região ITS e estão descritos na tabela abaixo.

Gene/região	Sequências dos <i>primers</i> (forward/reverse)	Referência
ITS	ITS1-F: 5' - CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA - 3' ITS4: 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'	White et al., 1990; Gardes & Bruns, 1993
GPD	GPD-Seq For: 5'- CAGAGCCTCTGCCACTTGAAGG - 3'' GPD-Seq Rev: 5' - GCCGGGTGGCCGACAAAGTC - 3'	Shamoun et al., 2019
TEF	EFA For: 5'- TCAACGTGGTCGGTGAGCAGGTA - 3' EFA Rev: 5'- AAGTCACGATGTCCAGGAGCATC - 3	Johannesson & Stenlid, 2003

### Referências Bibliográficas:

Boddy, L. (2016). Chapter 8 - Pathogens of Autotrophs, in *The Fungi* (Third Edition), Academic Press, Pages 245-292, Editor(s): Sarah C. Watkinson, Lynne Boddy, Nicholas P. Money. ISBN 9780123820341.

CABI Dataset: *Heterobasidion insulare* (2020). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/27046>. Acesso em: 17 de fevereiro de 2021.

EMBRAPA - Comunicado Técnico 202. (2008): Praga Florestal Exótica: *Heterobasidion annosum*. ISSN 1517-5030 Colombo, PR.

Garbelotto, M., & Gonthier, P. (2013). Biology, epidemiology, and control of *Heterobasidion* species worldwide. *Annual review of phytopathology*, 51, 39-59.

Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology*, 2(2), 113-118.

Johannesson, H., & Stenlid, J. (2003). Molecular markers reveal genetic isolation and phylogeography of the S and F intersterility groups of the wood-decay fungus *Heterobasidion annosum*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(1), 94–101.

Leal, L., Pedrosa-Macedo, J. H., & Biondi, D. (2009). Censo da arborização do campus III-centro politécnico da universidade federal do Paraná. *Scientia Agraria*, 10(6), 443-453.

Shamoun, S.F., Hammett, C., Sumampong, G., Li, X., Garbelotto, M. (2019). New Taxon-Specific *Heterobasidion* PCR Primers Detect and Differentiate North American *Heterobasidion* spp. in Various Substrates and Led to the Discovery of *Heterobasidion irregularare* in British Columbia, Canada. *Pathogens*, 8, 156.

Vasiliauskas, R; Stenlid, J. (1998). Spread of S and P group isolates of *Heterobasidion annosum* within and among *Picea abies* trees in central Lithuania. *Canadian Journal of Forest Research*, 28(7):961-966.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. e Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, California. pp 315–322.

## II.26 *Hymenoscyphus fraxineus*

### Classificação taxonômica:

Reino: Fungi  
Filo: Ascomycota  
Classe: Leotiomycetes  
Ordem: Helotiales  
Família: Helotiaceae  
Gênero: *Hymenoscyphus*  
Espécie: *Hymenoscyphus fraxineus*

### Motivo da inclusão na lista:

*Hymenoscyphus fraxineus* é o fungo responsável por causar a doença denominada morte por cinzas e acomete representantes da família Oleaceae (diversas espécies de Freixo, dois representantes de Lentisco e um representante de *Chionanthus virginicus*) (Cleary et al., 2016; CABI, 2020). No final da estação do verão, a doença se torna visível, à medida que lesões necróticas se formam nos folhetos, progredindo para a murcha e descoloração enegrecida das folhas, queda prematura das folhas, morte de brotos, galhos e ramos, necrose do tecido da casca, cancros necróticos na casca, lesões em formato de diamante nos caules e descoloração acastanhada a acinzentada da casca interna e da madeira, que frequentemente se estende além da região visível da necrose. Árvores que sofrem de morte severa podem produzir brotos epicórmicos (Halmschlager e Kirisits, 2008; Johansson et al., 2009; Kowalski e Holdenried, 2009). A ocorrência deste fitopatógeno é amplamente descrita na Europa e na Ásia (CABI/EPPO, 2013; CABI, 2020). Este fungo pode causar perdas econômicas e ambientais de severidades diferentes, dependendo se as árvores afetadas estão em florestas, plantadas como plantas ornamentais ou criadas em viveiros (CABI, 2020). No Brasil não foram encontrados trabalhos com relatos de infecção por *H. fraxineus*. Todavia, um dos gêneros considerados passíveis de serem acometidos por esse fungo é o *Chionanthus*, que está representado no Brasil por 11 espécies, das quais 9 são consideradas endêmicas, distribuídas principalmente nas Regiões Sudeste e Sul, além do Amazonas, Bahia, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Teixeira et al., 2016). Outro fator relevante é que *H. fraxineus* é descrita como invasiva, apresentando características que favorecem esse potencial tais como facilidade de disseminação e reprodução assexuada (CABI, 2020). Desta forma, conhecendo seu potencial risco para a flora brasileira, a gravidade da fitopatologia causada por este fungo e levando-se em consideração seu potencial de invasibilidade, recomenda-se a não utilização da espécie.

### Método de identificação:

Devido à restrição de uso ser em nível de espécie, é necessário que seja demonstrado com clareza e certeza, quando houver pedidos de registro de fungos do gênero *Hymenoscyphus*, que o mesmo não se trate de *H. fraxineus*. Para a identificação deste microrganismo, indica-se o protocolo de Drenkhan e colaboradores (2016), com modificações. Neste trabalho foram desenhados *primers* específicos para essa espécie, HFrax F e HFrax R, os quais amplificam um fragmento do DNA ribossomal. O local de ligação do *primer forward* está na região ITS1, a 56 pb do final do gene que codifica o rRNA 18S e o *primer reverse* se liga na região ITS2, 19 pb antes do gene que codifica o rRNA 28S. A eficiência e especificidade dos *primers* desenvolvidos foram testadas e confirmadas.

Gene/região	Sequências dos primers (forward/reverse)	Referência
Região ITS específica para <i>H. fraxineus</i> .	HFrax F: 5'- CTTTAGCAGGTCGCCCTCT - 3' HFrax R: 5'- TGCTGGCAAGACACCGCAAA - 3'	Drenkhan et al., 2016

### Referências Bibliográficas:

CABI Dataset: *Hymenoscyphus fraxineus* (ash dieback)(2020). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/108083>. Acesso em: 17 de fevereiro de 2021.

CABI/EPPO (2013). *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. [Distribution map]. Distribution Maps of Plant Diseases, No.October. Wallingford, UK: CABI, Map 1060 (Edition 2). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/abstract/20133421493>. Acesso em: 17 de fevereiro de 2021.

Cleary, M., Nguyen, D., Marčiulynienė, D., Berlin, A., Vasaitis, R., & Stenlid, J. (2016). Friend or foe? Biological and ecological traits of the European ash dieback pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* in its native environment. *Scientific Reports*, 6(1), 1-11.

Drenkhan, R., Riit, T., Adamson, K., & Hanso, M. (2016). The earliest samples of *Hymenoscyphus albidus* vs. *H. fraxineus* in Estonian mycological herbaria. *Mycological Progress*, 15(8), 835–844.

Halmschlager E, Kirisits T. (2008). First report of the ash dieback pathogen *Chalara fraxinea* on *Fraxinus excelsior* in Austria. *Plant Pathology*, 57(6):1177.

Johansson SBK, Vasaitis R, Ihrmark K, Barklund P, Stenlid J, 2009. Detection of *Chalara fraxinea* from tissue of *Fraxinus excelsior* using species-specific ITS primers. *Forest Pathology*:unpaginated.

Kowalski T, Holdenrieder O. (2009). The teleomorph of *Chalara fraxinea*, the causal agent of ash dieback. *Forest Pathology*, 39(5):304-308.

Teixeira, M. Del Rei; Lombardi, J.A.; Oliveira, R.P. de; Giulietti, A.M. (2016). Flora da Bahia: Oleaceae. *Sitientibus* série Ciências Biológicas, 16: 10.13102/scb1090. ISSN 2238-4103.

## II.27 *Kabatiella zaeae*

### Classificação taxonômica:

Reino: Fungi  
Filo: Ascomycota  
Classe: Dothideomycetes  
Ordem: Dothideales  
Família: Saccotheciacae  
Gênero: *Kabatiella*  
Espécie: *Kabatiella zaeae*

### Motivo da inclusão na lista:

*Kabatiella zaeae* é um fungo fitopatógeno de cultivares de milho que causa uma doença conhecida como mancha ocular devido às lesões ovais ou circulares, translúcidas, com bordas avermelhadas, circundadas por halo amarelado nas folhas de seus hospedeiros (CABI, 2020). As manchas tornam-se gradualmente mais escuras e os centros, que se tornam mais castanhos, podem cair, formando orifícios. As manchas estão dispostas ao longo das nervuras das folhas e se concentram nas bordas, inicialmente únicas, mas se espalhando rapidamente para cobrir toda a área foliar. Como complicações tardias formam-se áreas necróticas no local da infecção. Estas se espalham causando a secagem prematura das folhas e, portanto, uma diminuição na produção de grãos (Reifsneider e Arny, 1983). A mancha ocular ocorre em maior intensidade em agosto, setembro e início de outubro. A infecção por *K. zaeae* nas folhas do milho permanece visível mesmo quando as folhas morrem. São registrados relatos de casos na Ásia, Europa, Oceania, América do Sul e do Norte (CABI, 2020). No Brasil foi registrado um caso em Dourados, Mato Grosso do Sul, em trabalho conduzido para avaliar a incidência de doenças no milho, sob condições de infestação natural, no ano agrícola de 1982/83 (Esteves, 1984 *apud* Camochena et al., 2010). Em 2004/2005 foi identificada também em híbridos de milho na safra entre estes dois anos, em Santa Catarina e Paraná (Santos et al., 2007). Além de causar perdas econômicas *K. zaeae* é descrita como invasiva pelo CABI no Compendium de Espécies Invasivas. Adicionalmente, em condições laboratoriais, Reifsneider e Arny (1980) demonstraram infecção positiva para outras duas espécies da família Poaceae, *Echinochloa crusgalli* e *Setaria viridis*. Em relação à família Poaceae, possuímos representantes da flora silvestre brasileira, sendo estimadas 1500 espécies distribuídas em aproximadamente 180 gêneros (Flora do Brasil, 2020) e, ainda, espécies nativas, inclusive dos gêneros *Echinochloa* e *Setaria*, sendo elas a *Echinochloa polystachya* (Capim-canarana-de-pico) e *Setaria maginata*, consideradas importantes gramíneas forrageiras no país (EMBRAPA, 2006; Welker e Longhi-Wagner, 2007). Isto demonstra um alto risco para as plantas nativas, uma vez que teria impacto tanto direto quanto indireto na flora e na fauna que utiliza essas espécies para forrageio. Desta forma, além de sua reconhecida ação fitopatogênica, devido ao seu alto potencial de invasibilidade, e risco à diversidade brasileira, recomenda-se a sua não utilização sob quaisquer condições.

### Método de identificação:

Pelo fato da restrição de uso ser apenas para a espécie *K. zaeae*, é preciso garantir, quando houver pedidos de registros de fungos do gênero *Kabatiella*, que o microrganismo pleiteado não se trate da espécie em questão, sendo necessário para isso a realização precisa de sua identificação. Para essa identificação, recomenda-se o uso do protocolo descrito por Tillessen e colaboradores (2018) que

desenharam dois pares de *primers* espécie-específicos para *K. ziae*. As sequências utilizadas como base para o desenho dos *primers* foram obtidas pelos autores através de clonagem de proteínas do fungo e compartilhavam homologia com estreita relação taxonômica com *Kabatiella*. Os mesmos se encontram descritos na tabela abaixo.

Gene/região	Sequências dos <i>primers</i> (forward/reverse)	Referência
Região específica para <i>K. ziae</i>	KzAT001 FP: 5'-AAAGACTCATCGCTGCTCAC-3' KzAT001 RP: 5'-TGAGAAAGGATGCAGTCACC-3'	Tillessen e colaboradores (2018)
Região específica para <i>K. ziae</i>	KzAT005 FP: 5'-CAGTAACACCACCACCAAGA-3' KzAT005 RP: 5'-GGCATGCTTATCGTCAACTC-3'	Tillessen e colaboradores (2018)

#### Referências Bibliográficas:

CABI Dataset: *Kabatiella ziae* (eyespot) (2020). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/29297>. Acesso em: 19 de fevereiro de 2021.

Camochena, R.C., Santos, I. dos, Malagi, G. (2010). Variabilidade de colônias de *Kabatiella ziae* em meios de cultura e morfologia de isolados do fungo. *Tropical Plant Pathology*, vol. 35, 3, 190-196.

EMBRAPA (2007). Camarão, A.P.; Souza Filho, A.P.S.; Marques, J.R.F.: Documento 264: Gramíneas Forrageiras Nativas e Introduzidas de Terras Inundáveis da Amazônia. ISSN 1517-2201.

Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 19 de fevereiro de 2021.

Reifsneider, F.J.B. e Arny, D.C. (1980). Host range of *Kabatiella ziae*, causal agent of eyespot of maize. *Phytopathology*, 70:485-487.

Reifschner, F.J.B; Arny, D.C. (1983). Yield loss of maize caused by *Kabatiella ziae*. *Phytopathology*, 73(4):607-609.

Santos, I. dos, Silva, A., Malagi. G. (2007). Ocorrência de Mancha Ocular em Milho Causada por *Kabatiella ziae* no Paraná e em Santa Catarina. *Fitopatologia Brasileira*, 32:359.

Tillessen, A., Menkhaus, J., & Verreet, J.-A. (2018). Development of specific PCR primers for diagnosis and quantitative detection of the fungal maize pathogen *Kabatiella ziae*. *European Journal of Plant Pathology*. doi:10.1007/s10658-018-1456-1.

Welker, C.A.D. e Longhi-Wagner, H.M. (2007). A família Poaceae no Morro Santana, Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 5, n. 4, p. 53-92.

## II.28 *Kuehneola* sp.

### Classificação taxonômica:

Reino: Fungi  
Filo: Basidiomycota  
Classe: Pucciniomycetes  
Ordem: Pucciniales  
Família: Phragmidiaceae  
Gênero: *Kuehneola*

### Motivo da inclusão na lista:

Espécies do gênero *Kuehneola* são conhecidas por causar sérios danos em diversos representantes da família Rosaceae, principalmente espécies do gênero *Rubus* e algumas espécies do gênero *Rosa*. Dentre as principais espécies fitopatogênicas do gênero, destacam-se *Kuehneola uredinis*, *Kuehneola loeseneriana* e *Kuehneola japonica* (Liu et al., 2020). A fitopatologia assim como sua distribuição variam de acordo com as espécies descritas. *Kuehneola japonica* é conhecida por causar cores e padrões anormais, queda e murcha nas folhas das plantas infectadas. Esta espécie é amplamente difundida apenas no continente asiático (CABI, 2020a). *Kuehneola loeseneriana* compartilha os sintomas causados por *K. japonica*, porém é amplamente distribuída na América Central (Costa Rica, Guatemala e México) e na América do Sul (Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela) (Hernandez e Hennen, 2003; CABI, 2020b). *K. uredinis* causa doença em espécies de *Rubus sp.* e de amora-preta cujos sintomas são folhas com cores anormais, queda e crescimento de fungos na lâmina foliar e descoloração, crescimento de mofo na lesão e necrose nas hastes de seus hospedeiros. Há relatos de sua ocorrência na África do Sul, Austrália, Nova Zelândia, Europa, Canadá, EUA e Argentina (CABI, 2020c). A doença causada pelas espécies de *Kuehneola* causa prejuízos econômicos porque mesmo quando não causa a morte de plantas, a infecção severa pode causar perda significativa de rendimento nas espécies suscetíveis, aumentando gastos na agricultura e diminuindo a renda dos produtores. Condições úmidas favorecem a dispersão da doença, seja por meio dos seus urediniosporos ou transporte de material vegetal, para novas regiões onde espécies suscetíveis são cultivadas, inclusive áreas anteriormente livres de doenças (CABI, 2020). No Brasil, Carvalho Júnior e colaboradores (2008) descrevem diferentes espécies do gênero *Kuehneola* sendo recuperadas em plantas da família Rosaceae na Bahia. Ressalta-se que as diferentes espécies do gênero são consideradas invasivas, apresentando características que favorecem esse processo tais como ter uma ampla gama de hospedeiros, muitos dos quais nativos, longa vida, crescimento rápido e se reproduzir assexuadamente (CABI, 2020). Desta forma, devido aos graves sintomas causados após aquisição da fitopatologia, a possibilidade de impactos ambientais e econômicos, oferecendo perigo para várias espécies de plantas nativas e silvestres brasileiras da família Rosaceae (Barcelos & Heiden, 2015), bem sua conhecida capacidade de invasibilidade, recomenda-se não permitir a utilização de espécies do gênero *Kuehneola*.

### Método de identificação:

Devido à restrição de uso, para pedidos de registro de uso de microrganismos representantes da família Phragmidiaceae, é imprescindível que o solicitante demonstre a certeza da identificação do fungo pretendido para utilização, garantindo que este não se trate de nenhuma espécie do gênero em questão. Para a identificação desses fungos Cheon e colaboradores (2013) demonstraram que é possível realizar a identificação do gênero e até mesmo dessas espécies com base na análise de sequências da região

ITS, o que foi realizado com os *primers* ITS1 e ITS4 e no domínio D1/D2 do rDNA 28S (LSU), utilizado o par de *primers* 4F e 11R. Os *primers* foram utilizados em reações de PCR convencionais independentes, sendo que ao final, ambos se mostraram eficientes na identificação dos fungos testados.

Gene/região	Sequências dos <i>primers</i> (foward/reverse)	Referência
ITS	ITS1: 5'- TCCGTAGGTGAAACCTGCGG - 3' ITS4: 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'	White et al., 1990
Domínio D1/D2	4F: 5' - ACCCGCTGAAYTTAAGCATAT - 3' 11R: 5'- CTTCCTTGGTCCGTGTTCAAGACGG - 3'	Van der Auwera e colaboradores (1994)

### Referências Bibliográficas:

Barcelos, L. B., & Heiden, G. (2015). Distribuição geográfica de espécies de amora (Rubus, Rosaceae) nativas do Brasil. In *Embrapa Clima Temperado-Artigo em anais de congresso (ALICE)*. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 24; ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 17., 2015, Pelotas.[Anais.]. Pelotas: UFPel, 2015.

CABI Dataset: *Kuehneola loeseneriana* (2020b). Disponível em:<https://www.cabi.org/isc/datasheet/107846>. Acesso em: 19 de fevereiro de 2021.

\_\_\_\_\_. Dataset: *Kuehneola japonica* (2020a). Disponível em:<https://www.cabi.org/isc/datasheet/29554>. Acesso em: 19 de fevereiro de 2021.

\_\_\_\_\_. Dataset: *Kuehneola uredines* (Cane and leaf rust) (2020c). Disponível em:<https://www.cabi.org/isc/datasheet/29555>. Acesso em: 19 de fevereiro de 2021.

Carvalho Júnior, A.A.de., Hennen, J.F., Hennen, M.M., Figueiredo, M.B. (2008) Fungos Causadores de Ferrugens (Uredinales) em Áreas de Cerrado no Estado de São Paulo, Brasil. *Rodriguésia*, 59 (1): 001-055.

Cheon W, Kim YS, Lee SG, Jeon YH. (2013). First Report of Cane and Leaf Rust on *Rubus fruticosus* Caused by *Kuehneola uredinis* in Korea. *Plant Dis.* Aug;97, (8):1115.

Hernandez, J. R., & Hennen, J. F. (2003). Rust Fungi Causing Galls, Witches' Brooms, and Other Abnormal Plant Growths in Northwestern Argentina. *Mycologia*, 95(4), 728.

Liu, Y., Liang, Y. M., & Ono, Y. (2020). Taxonomic revision of species of *Kuehneola* and *Phragmidium* on Rosa, including two new species from China. *Mycologia*, 112(4), 742-752.

Van der Auwera, G., Chapelle, S., De Wächter, R. (1994). Structure of the large ribosomal subunit RNA of *Phytophthora megasperma*, and phylogeny of the oomycetes. *FEBS Letters*, Volume 338, Issue 2, Pages 133-136.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. e Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. *Academic Press*, San Diego, California. pp 315–322.

## **II.29 *Magnaporthe oryzae* Triticum pathotype**

### **Classificação taxonômica:**

Reino: Fungi  
Filo: Ascomycota  
Classe: Sordariomycetes  
Ordem: Magnaporthales  
Família: Magnaporthaceae  
Gênero: *Magnaporthe*  
Espécie: *Magnaporthe oryzae* Triticum pathotype

### **Motivo da inclusão na lista:**

O fungo *Magnaporthe oryzae* patótipo do trigo, cuja forma anamórfica é *Pyricularia oryzae* Triticum, causa a doença denominada explosão do trigo, que é uma das principais doenças do trigo no Brasil, Bolívia e no Paraguai, causando perda de rendimento de até 100% (Kohli et al., 2011; CABI, 2020). Foi relatado pela primeira vez no Brasil em 1985 quando gradualmente se espalhou em áreas de cultivo de trigo em vários países, mas apesar de ser conhecido há muitos anos, vários aspectos da epidemiologia dessa doença permanecem desconhecidos (Cruz et al., 2015). São relatados ainda casos na África, Ásia e América do Norte (CABI, 2020). Os sintomas observados nos cultivares altamente suscetíveis são a infecção do pedúnculo e ráquis causando o branqueamento de espigas inteiras; sementes de espinhos infectados tornando-se geralmente pequenas, enrugadas, deformadas e com baixo peso (Cruz et al., 2015). Em condições ambientais favoráveis a doença pode se tornar uma grande epidemia e devastar a safra de trigo em uma semana (CABI, 2020). Os conídios são considerados o principal meio de disseminação e as fontes propostas de transporte desses esporos incluem hospedeiros secundários e resíduos de cultura, sendo que neste caso, a semente infectada pode desempenhar um papel importante na dispersão a longa distância, visto que *M. oryzae* Triticum também é um patógeno transmitido pela semente (Maciel et al., 2014). Além do trigo e do arroz, *M. oryzae* pode infectar mais de 50 espécies de Poaceae, incluindo cevada (*Hordeum vulgare*), painço (*Setaria* e *Panicum* spp.), e milho (*Zea mays*), bem como gramíneas selvagens em torno dos campos de cultivo (Chung et al., 2020). A característica de dispersão, quando somada à sua capacidade de infectar outros representantes da família Poaceae, principalmente o gênero *Setaria*, que possui representante nativo brasileiro, torna-se perigosa. Assim levando-se em consideração a importância da produção de trigo no país aliada à ampla gama de espécies representantes desta família que pertencem à flora brasileira (Shirasuna et al., 2013), com a possibilidade de causar prejuízos econômicos e, principalmente, desequilíbrios ambientais, recomenda-se a não utilização de *M. oryzae* Triticum sob quaisquer condições.

### **Método de identificação:**

O fungo *M. oryzae* possui diferentes subtipos ou patovares. Todavia, a restrição de utilização se dá apenas para *M. oryzae* Triticum. Desta forma, quando houver pedidos de registros de fungos do gênero *Magnaporthe* é preciso garantir que ele não se trate do subtipo em questão. Para a identificação deste fungo, indica-se o uso do protocolo descrito por Yasuhara-Bell e colaboradores (2018), com modificações. Nele, foi desenvolvido o conjunto de primers PoT2 (PoT2-F3/PoT2-B3) e o conjunto MoT3 (MoT3-F3/MoT3-B3). Os resultados deste estudo demonstraram que os primers PoT2 foram específicos no nível de espécie para todos os isolados de *M. oryzae* e os primers MoT3 apenas para o

subtipo *M. oryzae* Triticum. Os primers PoT2 devem ser usados como um ensaio de triagem geral para detectar todos os subtipos de *M. oryzae* e, ao encontrar uma reação positiva, os conjuntos MoT3 devem ser utilizados para confirmar a identificação de *M. oryzae* Triticum.

Gene/região	Sequências dos primers (forward/reverse)	Referência
região específica de <i>M. oryzae</i>	PoT2-F3: 5'-AATTACGCTTTTGCGA-3' PoT2-B3: 5'-GGTTAACAGCGTTAAACCGG-3'	Yasuhara-Bell et al., 2018
região específica de <i>M. oryzae</i> Triticum	MoT3-F3: 5'-CCAAGGATGTATGCCCTGAC-3' MoT3-B3: 5'-GTTGGGGCTTCGTATGC-3'	Yasuhara-Bell et al., 2018,

### Referências Bibliográficas:

CABI Dataset: *Magnaporthe oryzae* Triticum pathotype (wheat blast)(2020). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/121970#toreferences>. Acesso em: 22 de fevereiro de 2021.

Chung, H., Goh, J., Han, S. S., Roh, J. H., Kim, Y., Heu, S., Shim, H. K., Jeong, D. G., Kang, I. J., & Yang, J. W. (2020). Comparative Pathogenicity and Host Ranges of *Magnaporthe oryzae* and Related Species. *The Plant Pathology Journal*, 36(4), 305–313.

Cruz, C. D., Kiyuna, J., Bockus, W. W., Todd, T. C., Stack, J. P., & Valent, B. (2015). *Magnaporthe oryzae* conidia on basal wheat leaves as a potential source of wheat blast inoculum. *Plant Pathology*, 64(6), 1491–1498.

Kohli, M., Mehta, Y., Guzman, E., Viedma, L., Cubilla, L. (2011). *Pyricularia* blast – a threat to wheat cultivation. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 47, S130–4.

Maciel, J., Ceresini, P., Castroagudin, V., Zala, M., Kema, G., McDonald, B. (2014). Population structure and pathotype diversity of the wheat blast pathogen *Magnaporthe oryzae* 25 years after its emergence in Brazil. *Phytopathology* 104, 95–107.

Shirasuna, R. T., & Filgueiras, T. D. S. (2013). Bambus nativos (Poaceae, Bambusoideae) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brasil. *Hoehnea*, 40(2), 315-359.

Yasuhara-Bell, J., Pedley, K. F., Farman, M., Valent, B., & Stack, J. P. (2018). Specific detection of the wheat blast pathogen (*Magnaporthe oryzae* Triticum) by loop-mediated isothermal amplification. *Plant Disease*.

## II.30 *Mainsia rubi*

### Classificação taxonômica:

Reino: Fungi  
Filho: Basidiomycota  
Classe: Puccioniomycetes  
Ordem: Pucciniales  
Família: Phragmidiaceae  
Gênero: *Mainsia*  
Espécie: *Mainsia rubi*

### Motivo da inclusão na lista:

*Mainsia rubi* é uma espécie de fungo conhecida por infectar diversos representantes da família Rosaceae, principalmente do gênero *Rubus*, causando mudança na coloração das folhas para padrões anormais, murcha e consequente queda destas. Entretanto, existem poucas informações publicadas sobre esse fungo fitopatogênico, que possui uma distribuição geográfica limitada. Sabe-se que ocorre em poucos países da América do Norte e Central, e no Peru e Equador (CABI, 2020). Não foram encontrados relatos de casos no Brasil. Entretanto, assim como existem hospedeiros em outras regiões do mundo com condições ambientais semelhantes, esta espécie pode representar uma ameaça às plantas nativas brasileiras da família Rosaceae (*Acaena*, *Agrimonia*, *Fragaria*, *Potentilla*, e várias espécies de *Prunus* e *Rubus*) ou agrícolas, se introduzida, representando risco à biodiversidade da flora do país (Virtuoso et al., 2005; Kiyama e Simão-Bianchini, 2003). Com isto, recomenda-se a não utilização de *Mainsia rubi* em território brasileiro.

### Método de identificação:

Considerando a restrição de uso, sempre que houver pedidos de registros de fungos do gênero *Mainsia*, é preciso garantir que o isolado em questão não se trate da espécie *Mainsia rubi*. Entretanto, a maior limitação a uma identificação molecular dessa espécie se deve ao fato de praticamente não haver dados dela publicados. Inclusive, não foram encontradas sequências de genes pertencentes à espécie *Mainsia rubi* ou qualquer outra espécie do gênero *Mainsia* depositadas no GenBank, mas há sequências de outros gêneros da família Phragmidiaceae. Dessa maneira, em um primeiro momento sugere-se que sempre que houver pedidos de registros de quaisquer outros microrganismos da família Phragmidiaceae, sejam utilizados métodos moleculares para confirmar que eles não pertencem ao gênero *Mainsia*. Para essa identificação, dentre os trabalhos levantados, sugere-se utilizar a abordagem descrita no trabalho de Liu e colaboradores (2020) no qual várias espécies pertencentes a essa família foram analisadas filogeneticamente a partir da amplificação de fragmentos da região ITS e do gene que codifica o rRNA 28S (LSU). Os primers utilizados para estudo desses loci no trabalho e sugeridos para uso podem ser visualizados na Tabela abaixo.

Caso não haja identificação positiva com nenhum outro gênero da família e, consequentemente, não seja possível excluir a possibilidade do isolado ser do gênero *Mainsia* ou *Mainsia rubi*, sugere-se a utilização das características morfológicas que comprovem que não se trata do fungo em questão. Para tal, recomenda-se a utilização da descrição apresentada no documento da USDA (s/d) conforme disponível no site <https://nt.ars-grin.gov/taxadesccriptions/factsheets/index.cfm?thisapp=Mainsiarubi>. Caso estas informações não sejam apresentadas, recomenda-se que a utilização do microrganismo seja negada.

Gene/região	Sequências dos primers (forward/reverse)	Referência
ITS	Rust2inv: 5'- GATGAAGAACACAGTGAAA - 3' ITS4rust: 5' - CAGATTACAAATTGGGCT - 3'	Aime 2006; Beenken et al. 2012
LSU	LRust1R: 5'- TAAGACCTCAAATCAGGT -3' LR3: 5'- CCGTGTTCAGACGGG - 3	Vilgalys and Hester 1990

### Referências Bibliográficas:

- Aime, M. C. (2006). Toward resolving family-level relationships in rust fungi (Uredinales). *Mycoscience*, 47(3), 112-122.
- Beenken, L., Zoller, S., & Berndt, R. (2012). Rust fungi on Annonaceae II: the genus *Dasyspora* Berk. & MA Curtis. *Mycologia*, 104(3), 659-681.
- CABI Dataset: *Mainsia rubi* (2020). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/107847>. Acesso em: 23 de fevereiro de 2021.
- Kiyama, C.Y. e Simão-Bianchini, R. (2003). Rosaceae In: Wanderley, M.G.L., Shepherd, G.J., Melhem, T.S., Giulietti, A.M., Kirizawa, M. (eds.) Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. Instituto de Botânica, São Paulo, vol. 3, pp: 285-294.
- Liu, Y., Liang, Y. M., & Ono, Y. (2020). Taxonomic revision of species of *Kuehneola* and *Phragmidium* on Rosa, including two new species from China. *Mycologia*, 112(4), 742-752.
- USDA. Yun, H.Y. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS. Invasive Fungi. Tropical American *Mainsia Rubus* rust - *Mainsia rubi*. Disponível: <https://nt.ars-grin.gov/taxadescs/factsheets/index.cfm?thisapp=Mainsiarubi>. Acesso em: 23 de fevereiro de 2021.
- Vilgalys, R., & Hester, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of bacteriology*, 172(8), 4238-4246.
- Virtuoso, S., Davet, A., Dias, J., Cunico, M. M., Miguel, M. D., Oliveira, A. B., & Miguel, O. G. (2005). Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15(2), 137-142.

## II.31 *Monilinia polystroma*

### Classificação taxonômica:

Reino: Fungi  
Filho: Ascomycota  
Classe: Leotiomycetes  
Ordem: Helotiales  
Família: Sclerotiniaceae  
Gênero: *Monilinia*  
Espécie: *Monilinia polystroma*

### Motivo da inclusão na lista:

*M. polystroma* é a forma conídial de um ascomiceto apotecial desconhecido, intimamente relacionado à *Monilinia fructigena*, do qual foi diferenciado de maneira mais recente por meios moleculares. Com isto, alguns isolados do Japão e Europa, anteriormente descritos como *M. fructigena*, podem pertencer a uma espécie distinta, denominada *Monilinia polystroma*, uma vez que apenas o anamorfo é conhecido (Leeuwen et al., 2002). *M. polystroma* é um fitopatógeno que afeta a produção de árvores frutíferas causando graves crescimentos das flores e ramos e podridão marrom nos frutos que se desenvolvem. Isto interfere na fase reprodutiva das plantas infectadas e prejudica a produtividade e dispersão dos frutos, o que influencia não só em âmbito econômico, mas ambiental (Petróczy e Palkovics, 2009). Embora *M. fructigena* e as outras espécies que causam podridão parda, *M. fructicola* e *M. lax*, sejam conhecidas em vários continentes, *M. polystroma* foi identificado apenas na Ásia e na Europa (EPPO, 2020). Não foram encontrados relatos de casos no Brasil. Porém, destaca-se que na ausência de barreiras naturais, pode se espalhar por meio de conídios transportados pelo ar. E, ainda, que a dispersão em longas distâncias provavelmente ocorreria por meio de plantas ou frutos infectados (CABI, 2020). *M. polystroma* é uma praga regulamentada para o Canadá e registrada como espécie invasora pelo CABI no Compendium de Espécies Invasivas. Poniatowska e colaboradores (2016) descrevem que apesar da capacidade de infecção ter sido levantada de forma generalista a árvores com flores e frutos, os principais hospedeiros para o fitopatógeno encontram-se na família Rosaceae e estão associados aos gêneros *Pyrus*, *Malus* e *Prunus*, que possui representantes nativos brasileiros (Kiyama e Simão-Bianchini, 2003). Com isto, tendo em vista a gravidade dos resultados da infecção onde as flores e os frutos poderiam ser afetados, causando consequências catastróficas tanto para a flora quanto para a fauna brasileira associada e levando em consideração sua característica de invasibilidade, recomenda-se a não utilização de *M. polystroma*.

### Método de identificação:

Devido à restrição de uso, quando houver pedidos de registros de fungos do gênero *Monilinia*, é necessário confirmar que o fungo proposto para ser registrado não seja da espécie *M. polystroma*. De acordo com os dados levantados, apenas diferentes fragmentos da região ITS têm-se mostrado eficientes para a identificação dessa espécie. Dessa maneira, sugere-se a utilização da metodologia proposta por Leeuwen e colaboradores (2002) baseados em dados moleculares produzidos em pesquisa anterior desenvolvida por Fulton e colaboradores (1999), que enquanto trabalhavam com um conjunto maior de isolados de *M. fructigena*, encontraram variações intraespécificas distintas entre a espécie e outros isolados do gênero observando quatro substituições na região do ITS1 e uma substituição na

região do ITS2, utilizando, portanto a amplificação dessas regiões para a identificação. Os *primers* utilizados foram ITS1-ext (amplifica a região ITS1, o rRNA 5.8s e a região ITS2) e ITS4, os quais podem ser visualizados na Tabela abaixo.

<b>Primers</b>	<b>Sequências</b>	<b>Referência</b>
ITS1 - extended	5' - GTAACAAGGTTCCGTAGGTG - 3'	Fulton et al 1999
ITS4	5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'	White et al., 1990.

### **Referências Bibliográficas:**

CABI Dataset: *Monilia polystroma* (Asiatic brown rot) (2020). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/34755>. Acesso em: 23 de fevereiro de 2021.

EPPO, 2020. EPPO Global database. In: EPPO Global database, Paris, France: EPPO. Disponível em: <https://gd.eppo.int/>. Acesso: 23 de fevereiro de 2020.

Fulton, C. E., van Leeuwen, G. C. M., e Brown, A. E. (1999). Genetic variation among and within *Monilinia* species causing brown rot of stone and pome fruits. *European Journal of Plant Pathology*, 105(5), 495–500.

Kiyama, C.Y. e Simão-Bianchini, R. (2003). Rosaceae In: Wanderley, M.G.L., Shepherd, G.J., Melhem, T.S., Giulietti, A.M., Kirizawa, M. (eds.) Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. Instituto de Botânica, São Paulo, vol. 3, pp: 285-294.

Leeuwen, G.C.M. van; Baayen, R.P.; Holb, I.J.; Jeger, M.J. (2002). Distinction of the Asiatic brown rot fungus *Monilia polystroma* sp. nov. from *M. fructigena*. *Mycological Research*, 106(4):444-451.

Petróczy, M., e Palkovics, L. (2009). First report of *Monilia polystroma* on apple in Hungary. *European Journal of Plant Pathology*, 125(2), 343–347.

Poniatowska, A., Michalecka, M., e Puławska, J. (2015). Genetic diversity and pathogenicity of *Monilinia polystroma*- the new pathogen of cherries. *Plant Pathology*, 65(5), 723–733.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. e Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, California. pp 315–322.

## II.32 *Neolivea tectonae*

### Classificação taxonômica:

Reino: Fungi  
Filho: Basidiomycota  
Classe: Pucciniomycetes  
Ordem: Pucciniales  
Família: Crossopsoraceae  
Gênero: *Neolivea*  
Espécie: *Neolivea tectonae*

### Motivo da inclusão na lista:

O fungo *Neolivea tectonae* (antes classificado como *Olivea tectonae*) é o agente etiológico da doença Ferrugem da Teca (CABI, 2020). A Teca (*Tectona* sp.) é uma planta de porte arbóreo e caule lenhoso originária da Índia e da China, mas cultivada mundialmente. É economicamente muito importante, uma vez que é utilizada na fabricação de móveis, conveses de barcos e outros artigos onde se deseja resistência na construção naval (De Piere et al., 2011). Os sintomas causados pela infecção são observados nas folhas das plantas doentes e se caracterizam em pequenas áreas necróticas angulares de marrom a cinza na superfície adaxial da folha. À medida que a doença progride, as lesões aumentam e coalescem para formar lesões necróticas maiores. As lesões também são observadas na inflorescência da planta (Cabral et al., 2010). O fitopatógeno é relatado na Ásia, África, América do Norte e do Sul e Oceania (CABI, 2020). No Brasil, são relatados casos no Espírito Santo, Mato Grosso, Minas Gerais, Tocantins e Sergipe (Mesquita et al., 2016; Cabral et al., 2010; De Piere et al., 2011). A família Lamiaceae abriga 356 espécies, distribuídas por todo território nacional (Reflora, s/d) e apesar da espécie *Tectona grandis*, principal hospedeira de *N. tectonae* não ser nativa do país, ressalta-se a possibilidade de infecção do fitopatógeno em outros representantes da família. Tal problema poderia acarretar perdas significativas para espécies nativas. Desta forma, esta possibilidade de infecção somada às vastas plantações de Teca no país (em 2010 chegava a 65 milhões de hectares) (Schuhli e Paludzyszyn Filho, 2010) representa um risco para a flora brasileira. Com isto, dada a possibilidade de interferir na dinâmica natural de espécies nativas e causar danos graves ao ambiente e à economia do país, recomenda-se a não utilização de *N. tectonae* sob quaisquer condições.

### Método de identificação:

Devido à restrição de uso ser apenas a *N. tectonae*, é necessário que seja demonstrada a certeza de que não se trate do patógeno em questão. Para a identificação deste microrganismo, Doilom e colaboradores (2016) demonstraram, após testes com diferentes *loci*, que é indicada a utilização de conjuntos de *primers* que contemplem regiões-alvo da região ITS e do gene que codifica o rRNA 18S (SSU) e o rRNA 28S (LSU) para a correta identificação de diversos fungos associados à ferrugem, dentre eles, *O. tectonae*. Assim, com base no referido trabalho, sugere-se a utilização de alguns dos conjuntos de *primers* para essas regiões utilizados no trabalho, seguido de sequenciamento e análise das sequências obtidas. As sequências dos *primers* sugeridos encontram-se na tabela abaixo:

Gene/região	Sequências dos primers (forward/reverse)	Referência
ITS	ITS1: 5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3' ITS4: 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'	White et al., 1990
LSU	LROR: 5' - ACCCGCTGAACCTAAGC - 3' LR5: 5' - ATCCTGAGGGAAACTTC - 3'	Moncalvo et al., 1995; Vilgalys e Hester, 1990
SSU	NS1: 5' - GTAGTCATATGCTGTCTC - 3' NS4: 5' - CTTCCGTCAATTCCCTTAAG - 3'	White et al., 1990

### Referências Bibliográficas:

CABI Dataset: *Olivea tectonae* (teak rust) (2020). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/37304#REF-DDB-140989>. Acesso em: 25 de fevereiro de 2021.

Cabral, P. G. C., Capucho, A. S., Pereira, O. L., Maciel-Zambolim, E., Freitas, R. L., Zambolim L. (2010). First report of teak leaf rust disease caused by *Olivea tectonae* in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*. 5 (1), 113-114.

De Pieri, C.; Passador, M.M.; Furtado, E.L.; Carvalho Junior, A.A. (2011). Novas observações sobre a ocorrência da ferrugem da teca (*Tectona grandis*) no Brasil e revisão taxonômica do patógeno *Summa Phytopathologica*, v.37, n.4, p.199-201.

Doilom, M., Dissanayake, A. J., Wanasinghe, D. N., Boonmee, S., Liu, J.-K., Bhat, D. J., Hyde, K. D. (2016). Microfungi on *Tectona grandis* (teak) in Northern Thailand. *Fungal Diversity*, 82(1), 107–182.

Mesquita, J. B., Santos, Í. T. B. F. dos, Ribeiro, G. T., Santos, M. J. C. dos. (2016). Rust (*Olivea neotectonae*) occurrence on teak plants in Sergipe, Brazil. (Ocorrência de ferrugem (*Olivea neotectonae*) em plantas de teca no estado de Sergipe.). *Summa Phytopathologica*. 42 (3), 278-279.

Moncalvo, J.-M., Wang, H.-H., & Hsieh, R.-S. (1995). Phylogenetic Relationships in Ganoderma Inferred from the Internal Transcribed Spacers and 25S Ribosomal DNA Sequences. *Mycologia*, 87(2), 223.

REFLORA. s/d. Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/>. Acesso em 25 de fevereiro de 2021.

Schuhli, G. S. e Paludzyszyn Filho, E. (2010). O cenário da Silvicultura de Teca e perspectivas para o melhoramento genético. *Pesquisa Florestal Brasileira*, Colombo, v.30, n.63, p. 217-230.

Vilgalys, R, Hester, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J. Bacteriol.*, 172:4238–4246.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. *PCR Protocols*, 315–322.

## II.33 *Ochropsora ariae*

### Classificação taxonômica:

Reino: Fungi  
Filo: Basidiomycota  
Classe: Pucciniomycetes  
Ordem: Pucciniales  
Família: Ochropsoraceae  
Gênero: *Ochropsora*  
Espécie: *Ochropsora ariae*

### Motivo da inclusão na lista:

*Ochropsora ariae* é um fitopatógeno que afeta uma ampla gama de representantes da família Rosaceae e um único gênero da família Ranunculaceae, causando danos às folhas, que passam a apresentar coloração e padrões anormais, murcha e eventual queda (CABI, 2020). Este fungo, apesar de afetar primária e majoritariamente as partes foliares, pode se tornar sistêmico e uma folha infectada frequentemente possui um pecíolo fortemente alongado, fazendo com que a folha “suba” acima das plantas circundantes, facilitando o acesso a novos hospedeiros e, consequentemente, à sua disseminação (Ono, 2006). Os estágios espermogonial e aelial ocorrem em hospedeiros integrantes do gênero *Anemone*, enquanto os estágios uredinal e telial se desenvolvem em vários tipos de Rosaceae (USDA, 2010). São registrados relatos de casos na Ásia, Europa e nos EUA (CABI, 2020). Não foram encontrados trabalhos relatando sua presença no Brasil. Todavia, ressalta-se a ação patogênica deste fungo em uma ampla gama de hospedeiros de duas importantes famílias da flora brasileira e para as quais possuímos espécies nativas, com destaque para o gênero *Anemone*, que possui espécies endêmicas brasileiras (Reflora, s/d), sendo este o principal gênero hospedeiro do fitopatógeno em dois de seus estágios do ciclo de vida. Dessa maneira, dado o risco representado pela disseminação e introdução deste fitopatógeno no país, recomenda-se a não utilização desta espécie.

### Método de identificação:

Devido à restrição de uso, sempre que houver pedidos de registro de fungos do gênero *Ochropsora* é preciso realizar uma identificação precisa no nível de espécie para garantir que ele não se trata de *O. ariae*. Segundo Ono (206), três dos quinze gêneros da família Uropyxidaceae (*Ochospora*, *Aplospora* e *Ceraceospora*) são intimamente relacionados e sua separação taxonômica é baseada no modo de produção de probasidium (esporos) e desenvolvimento do metabasidium. Não foram encontrados trabalhos que apresentassem métodos moleculares definidos que pudessem ser usados para a identificação de *O. ariae*, entretanto várias sequências de genes dessa espécie foram depositadas no GenBank na forma de submissões diretas, especificamente da região ITS, do gene que codifica o rRNA 28S (LSU) e do fator de elongação 1-alfa (TEF). Dessa maneira, para a identificação da espécie, em um primeiro momento, sugere-se amplificar porções desses genes com o uso de *primers* universais e comumente utilizados na literatura, os quais são sugeridos na Tabela abaixo.

Caso essa abordagem não forneça resolução taxonômica suficiente para a identificação no nível de espécies, as características morfológicas devem ser utilizadas. Para isto recomenda-se o trabalho de Aime e McTaggart (2020), onde são descritas características para a identificação do fungo em nível de

espécie. Sugere-se que a utilização do microrganismo seja negada caso a identificação através destas informações não seja apresentada.

Gene/região	Sequências dos <i>primers</i> (forward/reverse)	Referência
ITS	ITS5: 5'- GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG -3' ITS4: 5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'	White et al. (1990)
LSU	NL1 5'- GCATATCAATAAGCGGAGAAAAG-3' NL4 5'- CGTCCGTGTTCAAGACGG-3'	O'Donnell (1993)
TEF	EF1-728F: 5' - CATCGAGAAGTCGAGAAGG - 3' EF1-986R: 5' - TACTTGAAGGAACCCTTACC - 3'	Carbone & Kohn 1999

### Referências Bibliográficas:

Aime, M.C., McTaggart, A.R. (2020). A higher-rank classification for rust fungi, with notes on genera. *Fungal Systematics and Evolution*, 7: 21–47.

CABI Dataset: *Ochropsora ariae* (2020). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/36849>. Acesso em: 24 de fevereiro de 2021.

Carbone, I., & Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91(3), 553-556.

REFLORA. s/d. Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/>. Acesso em 24 de fevereiro de 2021.

O'Donnell, K.L. 1993. *Fusarium* and its near relatives. In The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics. Edited by D.R. Reynolds and J.W. Taylor. CAB International, Wallingford, U.K. pp. 225–233.

Ono, Y. (2006). Taxonomic implications of life cycle and basidium morphology of *Ochropsora ariae* and *O. nambuana* (Uredinales). *Mycoscience*, 47(3), 145–151.

USDA (2010). Yun, H.Y. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. . Invasive Fungi. Anemone-Rosaceae Rust - *Ochropsora ariae*. Last Update: 25 October, 2010. Disponível em: <https://nt.ars-grin.gov/taxadescRIPTIONS/factsheets/index.cfm?thisapp=Ochropsoraariae>. Acesso em: 24 de fevereiro de 2021.

White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B., and Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pages 315-322 in: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds. Academic Press, New York.

## II.34 *Pyrrhoderma noxium*

### Classificação taxonômica:

Reino: Fungi  
Filo: Basidiomycota  
Classe: Agaricomycetes  
Ordem: Hymenochaetales  
Família: Hymenochaetaceae  
Gênero: *Pyrrhoderma*  
Espécie: *Pyrrhoderma noxium*

### Motivo da inclusão na lista:

*P. noxium* (antes classificado como *Phellinus noxius*) é conhecido por ser o causador de uma grave doença em raízes de diversas plantas denominada “brown tea root” devido à incrustação na cor marrom-chá que as raízes desenvolvem após infecção. Ataca uma ampla gama de plantas tropicais, embora principalmente árvores. As folhas de uma árvore infectada amarelam e murcham, resultando em sintomas típicos de morte (CABI, 2020). Os sintomas podem se desenvolver lentamente ou a árvore pode murchar e ficar desfolhada em apenas alguns dias. O sintoma mais característico dessa doença é a incrustação marrom que cobre a superfície das raízes doentes. Este consiste em micélio marrom no qual o solo e pequenas pedras estão firmemente embutidos. O fungo se move em direção ao colo da árvore e, ocasionalmente, a incrustação pode ser visível acima do nível do solo. Na madeira doente, linhas escuras são visíveis devido à presença de hifas fúngicas. Em estágios avançados de decomposição, a madeira torna-se leve, seca e em forma de favo de mel. É um dos vários fungos associados à podridão do coração ou da base de árvores florestais e madeireiras (Ann et al., 2002). São registrados casos na África, Ásia, Oceania, América do Norte e Central, apesar de predominar em clima tropical. A lista de hospedeiros concentra espécies de importância econômica significativa, mas pela sua amplitude, observa-se um importante apelo ambiental também associado (Chang, 1995). Atualmente, ocorre em árvores pertencentes a 56 famílias, das quais 15 principais hospedeiras são associadas (Araucariaceae, Arecaceae, Casuarinaceae, Clusiaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Malvaceae, Meliaceae, Moraceae, Podocarpaceae, Rubiaceae, Salicaceae, Sapindaceae, Theaceae) (CABI, 2020). Uma vez presente em uma plantação, a doença tem o potencial de causar uma devastação se continuar no local, devido ao seu hábito de crescimento de se espalhar. Ao contrário de outros fungos semelhantes, não existem rizomorfos, a propagação ocorre por contato físico com as incrustações de raiz a raiz. Uma segunda forma de disseminação é feita por esporos transportados pelo vento que podem infectar tocos de árvores recém-cortadas ou feridas recentes (Hatori et al., 1996). Não foram encontrados relatos de caso de sua ocorrência no Brasil. Todavia, conhecendo seu potencial risco de introdução, dada a gravidade da fitopatologia causada por este fungo e levando-se em consideração seu potencial de infecção em um número elevado de famílias que abrigam milhares de espécies nativas da flora brasileira, recomenda-se a não utilização da espécie.

### Método de identificação:

Considerando a restrição de uso, quando houver pedidos de registro de fungos do gênero *Pyrrhoderma* sp. é necessário garantir que não se trata da espécie *P. noxium*. Dentre as opções de trabalhos descritos na literatura sugere-se utilizar uma abordagem molecular baseada no trabalho descrito por Wu e colaboradores (2020), no qual foi realizado um ensaio de PCR convencional, seguida de

sequenciamento e análise filogenética de fragmentos da região ITS, utilizando-se os *primers* ITS5 e ITS4. Adicionalmente, foram utilizados também *primers* desenhados em trabalhos anteriores para amplificar genes-alvo específicos para a espécie *P. noxium*, G1-F e G1-R. Os *primers* descritos podem ser visualizados na Tabela abaixo.

Gene/região	Sequências dos <i>primers</i> (forward/reverse)	Referência
ITS	ITS5: 5'- GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG -3' ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'	White et al. (1990)
Região específica para <i>P. noxium</i>	G1-F: 5'- GCCCTTCCTCCGCTTATTG - 3' G1-R: 5'- CTTGATGCTGGTGGGTCTCT- 3'	Wang et al. (2016)

### Referências Bibliográficas:

Ann, P-J., Chang, T-T., Ko, W-H. (2002). *Phellinus noxius* Brown Root Rot of Fruit and Ornamental Trees in Taiwan. *Plant Dis.*, vol.86, n.8, p. 820-826.

CABI Dataset: *Phellinus noxius* (brown tea root disease) (2020). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/40154>. Acesso em: 25 de fevereiro de 2021.

Chang, T.T. (1995). Decline of nine tree species associated with brown root rot caused by *Phellinus noxius* in Taiwan. *Plant Disease*, 79(9):962-965.

Hattori, T., Abe, Y., & Usugi, T. (1996). Distribution of clones of *Phellinus noxius* in a windbreak on Ishigaki Island. *Forest Pathology*, 26(2), 69–80.

Wang, Y. F., Meng, H., Gu, V., and Gu, J. D. 2016. Molecular diagnosis of the brown root-rot disease agent *Phellinus noxius* on trees and in soil by rDNA ITS analysis. *Appl. Environ. Biotechnol.* 1:81-91.

White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B., and Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pages 315-322 in: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds. *Academic Press*, New York.

Wu, Z. C., Chang, Y. Y., Lai, Q. J., Lin, H. A., Tzean, S. S., Liou, R. F., ... & Chung, C. L. (2020). Soil is not a reservoir for *Phellinus noxius*. *Phytopathology*, 110(2), 362-369.

## II.35 *Phyllactinia guttata*

### Classificação taxonômica:

Reino: Fungi  
Filo: Ascomycota  
Classe: Leotiomycetes  
Ordem: Erysiphales  
Família: Erysiphaceae  
Gênero: *Phyllactinia*  
Espécie: *Phyllactinia guttata*

### Motivo da inclusão na lista:

*Phyllactinia guttata* é o fungo responsável por causar o ódio, geralmente em árvores de madeira dura, mas é descrito ocorrendo em uma ampla gama de hospedeiros cobrindo várias famílias de plantas, como Actinidiaceae (kiwi), Betulaceae (amieiro europeu e avelã), Cornaceae (Cornelian-cherry), Rosaceae (marmelo e pêra europeia), Fagaceae (faga comum), Meliaceae (Chinaberry), Moraceae (amoreira), Anacardiaceae (pistache), Fabaceae (falsa-acácia), Vitaceae (videira) (CABI, 2020). Os sintomas começam com áreas circulares elevadas, revestidas pelo fungo com aspecto pulverulento branco visível. À medida que aumentam, as folhas mais novas aparecem distorcidas e podem formar-se lesões marrons necróticas. Pontos pretos podem aparecer no fungo branco quando a cleistotícia madura se desenvolve. As flores também podem ser infectadas, afetando seu desenvolvimento e fazendo com que fiquem distorcidas. Nas superfícies foliares superiores são observadas manchas cloróticas. O crescimento micelial é observado nas folhas, pecíolos e pedicelos, mas não nos frutos e ramos (Klein et al., 1998; Kurt e Soylu, 2001). Esse é um fitopatógeno bem distribuído, cuja ocorrência foi descrita na Ásia, Europa, América do Norte, África do Sul, Nova Zelândia e, dentre os países da América do Sul, apenas no Chile (CABI, 2020). Não foram encontrados relatos de casos no Brasil. Todavia, devido à ampla gama de hospedeiros que possui e, adicionalmente, ao fato de possuírem características de invasividade, a introdução deste fitopatógeno têm potencial de causar desequilíbrio ambiental, pois representantes das famílias citadas possuem importância econômica, são usadas como alimento e forrageio para diversas espécies em diferentes nichos, além de termos alguns representantes nativos das famílias hospedeiras no Brasil, principalmente Rosaceae, Meliaceae, Moraceae e Fabaceae (Barcelos et al., 2015; Cortez et al., 1998; Santos et al., 2015; Santos et al., 2010). Por tais motivos, recomenda-se a sua não utilização sob quaisquer condições.

### Método de identificação:

Devido às restrições de uso, sempre que houver pedidos de registro de fungos que pertençam ao gênero *Phyllactinia* sp. é necessário confirmar que não se trata, especificamente, da espécie *P. guttata*. Dentre os trabalhos levantados, sugere-se utilizar para essa identificação uma abordagem molecular baseada no trabalho descrito Mmbaga e colaboradores (2004), no qual foi realizada PCR convencional, seguida de sequenciamento e análise filogenética com o objetivo de identificar a espécie sem a ocorrência de ambiguidades com espécies semelhantes. Foram analisados fragmentos da região ITS, incluindo o gene 5,8S rRNA utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4. Adicionalmente, para obter uma resolução taxonômica precisa no nível de espécie, também foram utilizados primers desenhados para amplificar regiões específicas para *P. guttata*, sendo eles PG 1 e PG 2. Os primers descritos estão listados na Tabela abaixo.

Gene/região	Sequências dos primers (forward/reverse)	Referência
ITS	ITS1: 5' - TTCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3' ITS4 5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'	White et al., 1990
Região específica para <i>P. guttata</i>	PG1: 5'- CTGAGCGTGAAGACTCTC - 3' PG2: 5'- GGTATCCCTACCTGATTC - 3'	Mmbaga et al., 2004

### Referências Bibliográficas:

Barcelos, L. B., & Heiden, G. (2015). Distribuição geográfica de espécies de amora (Rubus, Rosaceae) nativas do Brasil. In *Embrapa Clima Temperado-Artigo em anais de congresso (ALICE)*. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 24; ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 17., 2015, Pelotas.[Anais.]. Pelotas: UFPel, 2015.

CABI Dataset: *Phyllactinia guttata* (powdery mildew of hardwood trees) (2020). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/40821>. Acesso em: 28 de fevereiro de 2021.

Cortez, D. A. G., Cortez, L. E. R., Nakamura, T. U., & Nakamura, C. V. (1998). Atividade antibacteriana de extratos do caule de *Cedrela fissilis* Vell.(Meliaceae). *Acta Scientiarum. Health Sciences*, 20, 243-245.

Klein, L. A., Windham, M. T., and Trigiano, R. N. (1998). Natural occurrence of *Microsphaera pulchra* and *Phyllactinia guttata* on two *Cornus* species. *Plant Dis.* 82:383-385.

Mmbaga, M. T., Klopfenstein, N. B., Kim, M. S., & Mmbaga, N. C. (2004). PCR-based identification of *Erysiphe pulchra* and *Phyllactinia guttata* from *Cornus florida* using ITS-specific primers. *Forest Pathology*, 34(5), 321-328.

Santos, A. P., Zatta, D. T., Moraes, W. F., Bara, M. T. F., Ferri, P. H., Silva, M. D. R. R., & Paula, J. R. (2010). Composição química, atividade antimicrobiana do óleo essencial e ocorrência de esteróides nas folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(6), 891-896.

Santos, E., Pinheiro, R., Ferreira, E. J., & Almeida, M. (2015). Biometria de frutos e sementes e germinação de *Sorocea muriculata* MIQ. (Moraceae) nativa do Acre, Brasil. *ENCICLOPÉDIA BIOSFERA*, 11(22).

White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B., and Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pages 315-322 in: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds. *Academic Press*, New York.

## II.36 *Plenodomus tracheiphilus*

### Classificação taxonômica:

Reino: Fungi  
Filo: Basidiomycota  
Classe: Dothideomycetes  
Ordem: Pleosporales  
Família: Leptosphaeriaceae  
Gênero: *Plenodomus*  
Espécie: *Plenodomus tracheiphilus*

### Motivo da inclusão na lista:

*Plenodomus tracheiphilus* é um fungo patógeno de diversas espécies da família das Rutáceas e causa a doença do ‘mal seco’. Os primeiros sintomas aparecem na primavera e são registrados por clorose do caule e da folha seguida pela morte de galhos (EPPO, 2021). Crescimento de brotos da base dos ramos afetados e rebentos do porta-enxerto são uma resposta muito comum do hospedeiro à doença. Ramos ou setores individuais podem ser infectados inicialmente. Gradualmente, o patógeno afeta toda a árvore, que eventualmente morre. Quando a madeira de galhos ou troncos infectados é cortada ou arrancada da casca, a coloração rosa-salmão ou vermelho-alaranjada característica da madeira pode ser vista; esse sintoma interno está associado à produção de goma dentro dos vasos do xilema (Migheli et al., 2009). Além da forma mais comum de ‘mal seco’, duas outras formas da doença se distinguem: ‘mal fulminante’, em que a árvore sofre declínio e morre rapidamente, aparentemente devido à infecção radicular; e o ‘mal nero’, que se caracteriza por uma infecção crônica da árvore que causa o escurecimento do cerne (CABI, 2020). O fungo possui vetores de caminho para novas contaminações por plantas ou partes de plantas infectadas, água e vento (Balmas et al., 2005; Solel, 1976). São relatados casos na África, Ásia, Europa e Colômbia. Em 1948, Kantsch. e Gikaschvili, classificaram-no como *Phoma tracheiphila* e esta é a espécie que ainda aparece em muitas das listas de risco fitossanitário. Neste tocante, é listada como praga quarentenária de países dos continentes em que o fitopatógeno está presente e em países da América Latina onde ainda não foi identificado, como Argentina, Chile e Paraguai. *P. tracheiphila* é motivo de quarentena em organizações regionais de proteção de plantas como a APPPC, CPPC, COSAVE, IAPSC e NAPPO (CABI, 2020). Devido às suas implicações fitossanitárias e levando em consideração que a possibilidade de introdução no país possa levar a perdas de diversas espécies da família das Rutáceas, que possui mais de 34 gêneros nativos, abrangendo cerca de 194 espécies e cuja ocorrência é principalmente na Amazônia e Mata Atlântica (Ribeiro, 2015), destaca-se a importância de impedir a utilização de *P. tracheiphilus*.

### Método de identificação:

Considerando as restrições de uso, quando houver pedidos de registro de fungos do gênero *Plenodomus* sp., ou *Phoma* sp. que é seu nome anterior, é necessário confirmar se não se trata da espécie *P. tracheiphilus*, cuja utilização é negada. Para essa identificação, dentre as metodologias levantadas, sugere-se utilizar uma abordagem molecular baseada no trabalho descrito por Ezra e colaboradores (2007) na qual foi realizada PCR convencional utilizando os primers ITS1 e ITS4 para amplificar fragmentos da região ITS, seguida de sequenciamento e análise filogenética para se obter a caracterização molecular e identificação da espécie. Em seguida, foi feita a confirmação da

identificação de *P. tracheiphilus* utilizando *primers* específicos para esse fungo, desenvolvidos neste trabalho com base também nas sequências ITS, PtrachITSF e PtrachITSR. Os *primers* utilizados neste trabalho estão listados na Tabela abaixo:

Gene/região	Sequências dos <i>primers</i> (forward/reverse)	Referência
ITS	ITS1: 5'- 5'TTCCGTAGGTGAAACCTGCGG - 3' ITS4: 5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'	White et al., 1990
Região ITS específica para <i>P. tracheiphilus</i>	PtrachITSF: 5'- CAGGGGATGGCGGCCAGCC - 3' PtrachITSR: 5' - CCGTCCTGCACAAGGGCAGTGG - 3'	Ezra et al., 2007

### Referências Bibliográficas:

- Balmas, V., Scherm, B., Ghignone, S., Salem, A. O. M., Cacciola, S. O., e Micheli, Q. (2005). Characterisation of *Phoma tracheiphila* by RAPD-PCR, microsatellite-primed PCR and ITS rDNA sequencing and development of specific primers for in planta PCR detection. *European Journal of Plant Pathology*, 111(3), 235–247.
- CABI Dataset: *Phoma tracheiphila* (mal secco) (2020). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/18512>. Acesso em: 01 de março de 2021.
- EPPO, 2020. EPPOGlobal database. In: EPPO Global database, Paris, France: *Plenodomus tracheiphilus* (DEUTTR). Disponível em: <https://gd.eppo.int/taxon/DEUTTR>. Acesso em: 01 de março de 2021.
- Ezra, D., Kroitor, T., & Sadowsky, A. (2007). Molecular characterization of *Phoma tracheiphila*, causal agent of Mal secco disease of citrus, in Israel. *European journal of plant pathology*, 118(2), 183-191.
- Micheli, Q., Cacciola, S.O., Balmas, V., Pane, A., Ezra, D., di San Lio, G.M. (2009). Mal Secco disease caused by *Phoma tracheiphila*: A potential threat to Lemon Production Worldwide. *Plant Disease*, vol.93, n.9, p. 852-867.
- Ribeiro, C. C. (2015). *As Galipeinae (Galipeeae, Rutaceae) no estado da Bahia, Brasil* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Solel, Z. (1976). Epidemiology of Mal Secco Disease of Lemons. *Journal of Phytopathology*, 85(1), 90–92.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, diagnostics and forensics. In: Innis MA, Gelfand D.H, Sninsky J.J, White T.J, editors. *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press.

## II.37 *Pseudogymnoascus destructans*

### Classificação taxonômica:

Reino: Fungi  
Filo: Ascomycota  
Classe: Dothideomycetes  
Ordem: Leotiomycetes (*Incertae sedis*)  
Família: Pseudeurotiaceae  
Gênero: *Pseudogymnoascus*  
Espécie: *Pseudogymnoascus destructans*

### Motivo da inclusão na lista:

O fungo *Pseudogymnoascus destructans* é o patógeno que causa a síndrome do nariz branco (WNS), uma doença emergente dos morcegos que causa declínios populacionais sem precedentes. Acredita-se que o fungo tenha sido introduzido na América do Norte vindo da Europa ou Ásia, mas a extensão total de sua distribuição nativa é desconhecida (CABI, 2020). Os morcegos infectados podem desenvolver crescimento fúngico visível no nariz ou nas asas, despertar com mais frequência do torpor e experimentar uma cascata de mudanças fisiológicas que resultam em perda de peso, desidratação, desequilíbrios eletrolíticos e morte. *P. destructans* persiste em ambientes subterrâneos de locais de hibernação de morcegos (Khankhet et al., 2014). Este fungo foi detectado em morcegos ou em ambientes utilizados por morcegos para hibernação na América do Norte (Estados Unidos e Canadá), pelo menos 18 países europeus e na China. A distribuição nativa do fungo é desconhecida, mas, no mínimo, presume-se que inclua partes da Europa, onde há evidências de diversificação genética (Leopardi et al., 2015). A rota de introdução na América do Norte não foi determinada. A doença foi relatada em 5 províncias do leste do Canadá e 31 estados dos EUA, principalmente no centro e leste do país. Acredita-se que a disseminação subsequente seja impulsionada principalmente pelo movimento natural de morcegos entre manchas geograficamente restritas de habitat de hibernação, com variáveis climáticas que restringem a gama do patógeno. Isolados de *P. destructans* da América do Norte são clonais (Rajkumar et al., 2011), enquanto os da Europa são mais geneticamente diversos (Leopardi et al., 2015). Outra via considerada é a antropológica, por meio de roupas, calçados e pertences (especialmente equipamentos de espeleologia) (Ballmann et al., 2017). *P. destructans* é uma espécie descrita como invasiva pelo CABI no Compendium de Espécies Invasivas. Estima-se que milhões de morcegos norte-americanos morreram de síndrome do nariz branco (WNS), resultando em declínios dramáticos da população de morcegos regionais (Reynolds et al., 2016). Os morcegos insetívoros fornecem valiosos serviços de controle de pragas. Por exemplo, comem insetos que danificam plantações, florestas e transmitem doenças. Muitas espécies de morcegos em regiões tropicais e subtropicais também são importantes polinizadores e dispersores de sementes. Destaca-se que a mortalidade devida a WNS reduz os níveis em que as populações de morcegos fornecem esses serviços ecossistêmicos valiosos e insubstituíveis (Boyles et al., 2011). São descritos casos de infecções em populações de morcegos de 6 espécies de gêneros distintos e 17 espécies do gênero *Myotis*. Não foram encontrados relatos de casos na fauna de morcegos brasileiros *in situ*. Todavia, destaca-se que algumas espécies do gênero em que o patógeno é mais prevalente (*Myotis*) fazem parte da fauna brasileira, a exemplo de *Myotis riparius* e *Myotis levis* (Miranda et al., 2010; Dias e Peracchi, 2007), bem como populações do morcego da espécie *Eptesicus fuscus*, que são encontradas no norte

do Brasil e em outros países como portadores da doença WNS. Com isto, dada a sua importância epidemiológica, a gravidade da doença causada, a característica de invasibilidade desse fungo, e a possibilidade de causar desequilíbrio ao ambiente, comprometendo a fauna e até a flora indiretamente, recomenda-se a não utilização sob quaisquer condições.

### **Método de identificação:**

Quando houver pedidos de registro de fungos do gênero *Pseudogymnoascus* sp. ou *Geomycetes* sp. (antigo gênero desse patógeno), é necessário confirmar se não se trata da espécie *P. destructans*/ *G. destructans*. Para tanto, recentemente, trabalhos têm sido desenvolvidos com uso de qPCR, visando detectar, identificar e quantificar a presença desse fungo (Urbina et al., 2021). Contudo, devido aos custos do qPCR e por ser mais laborioso, sugere-se utilizar uma abordagem molecular baseada no trabalho descrito por Chaturvedi e colaboradores (2010) no qual foi realizada PCR convencional, seguida de sequenciamento e análise filogenética de fragmentos da região ITS (ITS1, 5.8S e ITS2) e da região D1/D2 do gene que codifica o RNA 28S (LSU) utilizando-se os primers ITS1 e ITS4 e os iniciadores V1798 e V1799, respectivamente, os quais podem ser visualizados na Tabela abaixo.

Gene/região	Sequências dos primers (forward/reverse)	Referência
ITS	ITS1 5' - TCCGTAGGTGAAACCTGC GG - 3' ITS4 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'	White et al. (1990)
LSU (D1/D2)	V1798: 5' - GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG - 3' V1799: 5' - GGTCCGTGTTCAAGACGG - 3'	White et al. (1990)

### **Referências Bibliográficas:**

- Ballmann, A. E., Torkelson, M. R., Bohuski, E. A., Russell, R. E., Blehert, D. S. (2017). Dispersal hazards of *Pseudogymnoascus destructans* by bats and human activity at hibernacula in summer. *Journal of Wildlife Diseases*, 53(4), 725-735.
- Boyles, J. G., Cryan, P. M., McCracken, G. F., & Kunz, T. H. (2011). Economic Importance of Bats in Agriculture. *Science*, 332(6025), 41–42.
- CABI Dataset: *Pseudogymnoascus destructans* (white-nose syndrome fungus). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/119002>. Acesso em: 03 de março de 2021.
- Chaturvedi, V., Springer, D. J., Behr, M. J., Ramani, R., Li, X., Peck, M. K., ... & Chaturvedi, S. (2010). Morphological and molecular characterizations of psychrophilic fungus *Geomycetes destructans* from New York bats with white nose syndrome (WNS). *PLoS one*, 5(5), e10783.
- Dias, D., e Peracchi, A.L. (2007). Primeiro registro de *Myotis riparius* Handley (Mammalia, Chiroptera, Vespertilionidae) no Estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 24(2), 508-511.

Khankhet, J., Vanderwolf, K.J., McAlpine, D.F., McBurney, S., Overy, D.P., Slavic, D., Xu, J. (2014). Clonal expansion of the *Pseudogymnoascus destructans* genotype in North America is accompanied by significant variation in phenotypic expression. *PLoS One*, 9(8):e104684.

Leopardi, S., Blake, D., Puechmaille, S.J. (2015). White-nose syndrome fungus introduced from Europe to North America. *Current Biology*, 25(6):R217-R219.

Minnis, A.M. e Lindner, D.L. (2013). Phylogenetic evaluation of *Geomycetes* and allies reveals no close relatives of *Pseudogymnoascus destructans*, comb. nov., in bat hibernacula of eastern North America. *Fungal Biology*, 117(9):638-649.

Miranda, J. M. D., N. Y. Kaku-Oliveira, L. C. Munster, I. P. Bernardi, R. F. Mororios & F. C. Passos. (2010). Primeiros dados de uma colônia reprodutiva de *Myotis levis* (I. Geoffroy, 1824) nos campos de Palmas, Paraná, Brasil (Vespertilionidae). *Chiroptera Neotropical*, 16(2):762-768.

Rajkumar, S.S., Li, X.J., Rudd, R.J., Okoniewski, J.C., Xu, J.P., Chaturvedi, S., Chaturvedi, V. (2011). Clonal genotype of *Geomycetes destructans* among bats with white nose syndrome, New York, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 17(7):1273-1276.

Reynolds, R.J., Powers, K.E., Orndorff, W., Ford, W.M., Hobson, C.S. (2016). Changes in rates of capture and demographics of *Myotis septentrionalis* (Northern Long-eared Bat) in western Virginia before and after onset of white-nose syndrome. *Northeastern Naturalist*, 23(2):195-204.

Urbina, J., Chestnut, T., Allen, J. M., & Levi, T. (2021). *Pseudogymnoascus destructans* growth in wood, soil and guano substrates. *Scientific reports*, 11.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, diagnostics and forensics. In: Innis MA, Gelfand D.H, Sninsky J.J, White T.J, editors. PCR Protocols: A guide to methods and applications. San Diego: Academic Press.

## II.38 *Raffaelea lauricola*

### Classificação taxonômica:

Reino: Fungi  
Filo: Ascomycota  
Classe: Sordariomycetes  
Ordem: Ophiostomatales  
Família: Ophiostomataceae  
Gênero: *Raffaelea*  
Espécie: *Raffaelea lauricola*

### Motivo da inclusão na lista:

*Raffaelea lauricola* é o agente causal da murcha das lauráceas. O gênero *Raffaelea* é considerado um grupo de fungos assexuados dentro da família Ophiostomataceae, e os membros desse gênero são tolerantes à cicloheximida e simbiontes de besouros da ambrosia (Harrington e Fraedrich, 2010). A murcha das lauráceas é responsável pela morte de centenas de milhões de árvores em todo o sudeste dos EUA (Hughes et al., 2017) e ao que parece, a doença está confinada a membros da família Lauraceae. Os sintomas são frequentemente observados em porções das árvores dentro de duas a quatro semanas após a infecção. A doença então se espalha por toda a copa, as árvores murcham completamente em 4 a 12 semanas após a inoculação (Mayfield et al., 2008). As folhas das árvores infectadas inicialmente caem com a perda de turgor e depois adquirem uma cor marrom-avermelhada à medida que morrem. Algumas folhas mais velhas podem inicialmente tornar-se cloróticas à medida que vão morrendo. Uma descoloração preta escura é observada no alburno do caule e dos ramos das plantas infectadas (Fraedrich et al., 2008; Fraedrich et al., 2015). Árvores de paisagem em parques e áreas residenciais também são afetadas. O abacate, cultivado comercialmente em pomares no sul da Flórida e em áreas residenciais como ornamental, também é afetado pela doença. O desenvolvimento dos sintomas no abacateiro é semelhante, com a diferença que as folhas tendem a cair dentro de 2 a 9 meses após o estabelecimento da infecção (Ploetz et al., 2017). A taxa de desenvolvimento da doença e os sintomas subsequentes nas plantas depende muito de seu tamanho e de fatores ambientais, como temperatura e condições de umidade. A doença parece progredir relativamente devagar em árvores infectadas no final da estação de crescimento, e árvores com murcha parcial da copa em apenas alguns ramos podem ser encontradas durante os meses de inverno. A doença progride muito mais rapidamente e as árvores morrem rapidamente durante os meses de primavera e verão, quando as árvores estão transpirando e crescendo ativamente (CABI, 2020). *R. lauricola* ocorre no sudeste da Ásia e na região sudeste dos EUA. O principal meio de transmissão é por seu parceiro simbótico, *X. glabratus*, um besouro nativo da Ásia. O fungo é transportado pelo besouro em micangias localizadas na cabeça do besouro atrás das mandíbulas. Nos EUA, os besouros adultos fazem seus ataques iniciais nos caules das árvores saudáveis, e o patógeno é transmitido (Fraedrich et al., 2008). A propagação da murcha através das raízes de hospedeiros suscetíveis não foi bem estudada, mas este meio de transmissão parece variar muito entre os vários hospedeiros. O movimento de *R. lauricola* através de raízes entre árvores é uma possibilidade, mas os padrões de mortalidade nas florestas sugerem que este pode não ser um modo de transmissão importante para esta espécie (Cameron et al., 2015). Em pomares de abacate, a disseminação de *R. lauricola* através de enxertos entre os abacateiros é considerada um meio de transmissão importante devido à rápida taxa na qual os focos de doenças se desenvolvem em torno de árvores recentemente infectadas (Ploetz et al., 2017). *R. lauricola* é uma espécie descrita como

invasiva pelo CABI no Compendium de Espécies Invasivas. Não foram encontrados relatos de casos do fungo, bem como de seu simbionte coleóptera no Brasil. Contudo, ressalta-se que representantes da família Lauraceae têm papel fundamental nos biomas brasileiros (Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa, Pantanal), sendo encontradas espécies nativas em todas as regiões do país (Reflora, 2020). Dadas as informações, por ser uma preocupação devido à fitopatologia causada, ter a capacidade de afetar espécies de grande valor ambiental, representando risco à biodiversidade brasileira, acrescido de sua capacidade de invasão em ambientes favoráveis, recomenda-se a sua não utilização.

### **Método de identificação:**

Quando houver pedidos de registro de fungos do gênero *Raffaelea* sp., é necessário confirmar que não se trata, especificamente, da espécie *R. lauricola*. Para tanto, sugere-se utilizar a abordagem descrita no trabalho de Dreaden e colaboradores (2014). Neste trabalho, inicialmente foram realizadas PCR para amplificação da subunidade menor do RNA ribossomal (SSU) com *primers* desenhados pelos autores, bem como foram utilizados outros dois conjuntos de *primers* específicos para a espécie *R. lauricola*, aumentando a precisão do método. Esses *primers* foram: CHK-F e CHK-R e IFW-F e IFW-R, os quais podem ser visualizados na Tabela abaixo. Os autores relatam ainda que esses iniciadores específicos não amplificaram outros táxons relacionados à espécie *R. lauricola* e também não amplificaram o DNA do hospedeiro. Além disso, podem ser utilizados tanto para PCR convencional quanto para qPCR.

Gene/região	Sequências dos <i>primers</i> (forward/reverse)
SSU	LWD3: 5'- AACCGTCAAAAGACAACAG - 3' LWD4: 5' - TTTCTAGGACCGCCGTAATG - 3'
Região específica para <i>R. lauricola</i> (1º Conjunto)	CHK-F 5' - GTTCCACAGCCTGGAAAACC -3' CHK-R 5' - GGTAGAGGACGATGGTTGGC -3'
Região específica para <i>R. lauricola</i> (2º Conjunto)	IFW-F 5' - TCGAGGTCGTGGACTACAGC-3' IFW-R 5' - GTGGGACTCGCTGATGAGG -3'

### **Referências Bibliográficas:**

CABI Dataset: *Raffaelea lauricola* (laurel wilt). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/109424>. Acesso em: 04 de março de 2021.

Cameron, R. S., Hanula, J., Fraedrich, S., Bates, C. (2015). Progression and impact of laurel wilt disease within Redbay and Sassafras populations in Southeast Georgia. *Southeastern Naturalist*, 14(4), 650-674.

Dreaden, T. J., Davis, J. M., Harmon, C. L., Ploetz, R. C., Palmateer, A. J., Soltis, P. S., & Smith, J. A. (2014). Development of multilocus PCR assays for *Raffaelea lauricola*, causal agent of laurel wilt disease. *Plant Disease*, 98(3), 379-383.

Fraedrich, S. W., Harrington, T. C., Rabaglia, R. J., Ulyshen, M. D., Mayfield, A. E., III, Hanula, J. L., Eickwort, J. M., Miller, D. R. (2008). A fungal symbiont of the Redbay ambrosia beetle causes a lethal wilt in redbay and other Lauraceae in the southeastern United States. *Plant Disease*, 92(2), 215-224.

Fraedrich, S. W., Harrington, T. C., Best, G. S. (2015). *Xyleborus glabratus* attacks and systemic colonization by *Raffaelea lauricola* associated with dieback of *Cinnamomum camphora* in the southeastern United States. *Forest Pathology*, 45(1), 60-70.

Harrington, T. C. e Fraedrich, S. W. (2010). Quantification of propagules of the laurel wilt fungus and other mycangial fungi from the redbay ambrosia beetle, *Xyleborus glabratus*. *Phytopathology*, 100(10), 1118-1123.

Hughes, M. A., Riggins, J. J., Koch, F. H., Cognato, A. I., Anderson, C., Formby, J. P., Dreaden, T. J., Ploetz, R. C., Smith, J. A.. (2017). No rest for the laurels: symbiotic invaders cause unprecedented damage to southern USA forests. *Biological Invasions*, 19(7), 2143-2157.

Mayfield, A. E., Peña, J. E., Crane, J. H., Smith, J. A., Branch, C. L., Ottoson, E. D., Hughes, M. (2008). Ability of the Redbay ambrosia beetle (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) to bore into young avocado (Lauraceae) plants and transmit the laurel wilt pathogen (*Raffaelea* sp.). *Florida Entomologist*, 91(3), 485-487.

Ploetz, R. C., Konkol, J. L., Pérez-Martínez, J. M., Fernandez, R. (2017). Management of laurel wilt of avocado, caused by *Raffaelea lauricola*. *European Journal of Plant Pathology*, 149(1), 133-143.

Reflora (2020). Lauraceae in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB143>. Acesso em: 04 de março de 2021.

## II.39 *Seiridium cardinale*

### Classificação taxonômica:

Reino: Fungi  
Filo: Ascomycota  
Classe: Sordariomycetes  
Ordem: Xylariales  
Família: Sporocadaceae  
Gênero: *Seiridium*  
Espécie: *Seiridium cardinale*

### Motivo da inclusão na lista:

*Seiridium cardinale* é o fungo responsável pela doença do cancro em uma ampla gama de representantes da família Cupressaceae. Foi descrito pela primeira vez por Wagener em 1939 como *Coryneum cardinale*. É um patógeno altamente perigoso, capaz de causar epidemias graves em populações de seus hospedeiros por todo o mundo. Estima-se que o veículo mais comum para a difusão mundial do cancro do cipreste tenha sido o comércio internacional de estoques infectados em viveiros (CABI, 2020). O risco de introdução do patógeno em áreas até então livres não se limita ao transporte ou comércio accidental de sementes, mudas, plantas em vasos e estoques de viveiro infectados, mas também inclui o comércio de madeira cortiçada infectada. A disseminação vatorial do inóculo em longas distâncias, mesmo em áreas isoladas, é garantida por insetos e provavelmente pássaros, que podem carregar o inóculo por longas distâncias (Tiberi et al., 2016). Nenhuma espécie hospedeira natural ou experimental de *S. cardinale* é conhecida fora da família Cupressaceae. O primeiro sinal de crescimento é um escurecimento ou vermelhidão da casca viva do caule ou ramos, no ponto de entrada do patógeno. A descoloração é seguida por uma leve depressão da área infectada, rachaduras ou fissuras longitudinais e exsudação resinosa, que provavelmente desempenham um papel na defesa da planta contra um patógeno que está invadindo a casca com potencial atividade sistêmica (Graniti, 1998). Posteriormente, cânceres lenticulares ou alongados se desenvolvem na casca ao redor do local da infecção, onde ocorre uma necrose do tecido da casca infectada, e estes podem envolver os ramos ou o caule das plantas jovens. Excrescências de tecidos da casca, anormalidades histológicas e necrose de células vegetais podem ocorrer em torno das áreas doentes. Em troncos e galhos grandes de árvores adultas, o aumento do cancro é um processo lento. Fluxos consistentes de resina exsudando de rachaduras formadas na área do cancro podem ser vistos na parte externa dos cancros, que podem se estender para caules e ramos infectados. Normalmente, setores da árvore ao lado dos cancros diminuem e morrem. Ocorre cloroze da folhagem e morte de galhos e copas de árvores (Ponchet e Andréoli, 1989; Spanos et al., 1999). A doença do cancro pode afetar grupos de árvores em florestas naturais, bosques, povoamentos, plantações e fileiras de quebra-ventos, bem como ciprestes ornamentais individuais em parques, jardins, cemitérios e locais históricos (Spanos et al., 1997). É uma espécie descrita como invasiva pelo CABI no Compendium de Espécies Invasivas. A infecção em árvores hospedeiras suscetíveis induz sintomas locais e sistêmicos. *S. cardinale* é relatado nos cinco continentes, variando sua presença de acordo com as condições climáticas e ambientais de cada país (CABI, 2020). Não foram encontrados relatos de casos de sua presença no Brasil. Todavia, dada a alta patogenicidade de *S. cardinale*, a ampla gama de hospedeiros na família Cupressaceae, que é abundante e com espécies nativas na região Sul do país, sua adaptação a vários ambientes e a possibilidade de transporte a longa

distância por vetores ou comércio de material infectado, somada à sua capacidade de invasividade, recomenda-se a sua não utilização.

### Método de identificação:

Quando houver pedidos de registro de fungos do gênero *Seiridium* sp., é necessário confirmar se não se trata da espécie *S. cardinale*. Para tanto, sugere-se utilizar a abordagem descrita no trabalho de Bonthond e colaboradores (2018). Neste trabalho, foram investigadas várias regiões gênicas com intuito de identificar diferentes espécies do gênero *Seiridium*, sendo elas a região ITS do rRNA, região parcial do fator de alongamento da tradução 1-alfa (TEF), β-tubulina (TUB) e a subunidade central da RNA polimerase II (RPB2). Contudo, os autores concluíram que destas regiões, a β-tubulina foi a que melhor separou as espécies, incluindo *S. cardinale*. Assim, sugere-se que seja realizada a PCR convencional, seguida de sequenciamento e análise filogenética dessa região utilizando os *primers* T1 e bt2b. Entretanto, caso apenas o uso dessa região não forneça resolução taxonômica suficiente, os demais *primers* para as outras regiões também devem ser acrescentados aos ensaios.

Gene/região	Sequências dos <i>primers</i> (forward/reverse)	Referência
TUB	T1: 5' - AACATGCGTGAGATTGTAAGT - 3' bt2b: 5' - ACCCTCAGTAGTGACCCCTGGC - 3'	O'Donnell & Cigelnik (1997)

### Referências Bibliográficas:

Bonthond, G., Sandoval-Denis, M., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2018). *Seiridium* (Sporocadaceae): an important genus of plant pathogenic fungi. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 40, 96.

CABI Dataset: *Seiridium cardinale* (cypress canker). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/49497>. Acesso em: 04 de março de 2021.

Glass, N. L., & Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and environmental microbiology*, 61(4), 1323-1330.

Graniti, A. (1998). Cypress Canker: A Pandemic in Progress. *Annual Review of Phytopathology*, 36(1), 91–114.

O'Donnell, K., & Cigelnik, E. (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus fusarium are non orthologous. *Molecular phylogenetics and evolution*, 7(1), 103-116.

Ponchet, J., Andréoli, C. (1989). Histopathology of cortical canker of cypress caused by *Seiridium cardinale*. *European Journal of Forest Pathology*, 19(4):212-221.

Spanos, K.A., Pirrie, A., Woodward, S. (1997). In vitro expression of resistance responses to *Seiridium* species in micropropagated shoots of *Cupressus sempervirens* and *Chamaecyparis lawsoniana*. *Canadian Journal of Botany*, 75(7):1103-1109.

Spanos, K.A., Pirrie, A., Woodward, S., Xenopoulos, S. (1999). Responses in the bark of *Cupressus sempervirens* clones artificially inoculated with *Seiridium cardinale* under field conditions. *European Journal of Forest Pathology*, 29(2):135-142.

Tiberi, R., Panzavolta, T., Bracalini, M., Ragazzi, A., Ginetti, B., Moricca, S. (2016). Interactions between insects and fungal pathogens of forest and ornamental trees. *Italian Journal of Mycology*, vol. 45. ISSN 2531-7342.

## **II.40 *Sirococcus clavigignenti-juglandacearum***

### **Classificação taxonômica:**

Reino: Fungi  
Filo: Ascomycota  
Classe: Sordariomycetes  
Ordem: Diaporthales  
Família: Gnomoniaceae  
Gênero: *Sirococcus*  
Espécie: *Sirococcus clavigignenti-juglandacearum*

### **Motivo da inclusão na lista:**

*S. clavigignenti-juglandacearum* é o fitopatógeno causador do cancro da noz. O hospedeiro principal é *Juglans cinerea*, que é nativa da América do Norte. Dois outros hospedeiros são naturalmente infectados na América do Norte: *Juglans nigra* (noz-negra) e *Juglans ailanthifolia* var. *cordiformis* (amêndoas) (CABI, 2020). Algumas outras Juglandaceae, Fagaceae, Betulaceae e Rosaceae foram consideradas suscetíveis à inoculação artificial em experimentos de laboratório (Orchard et al., 1982). Experimentos de laboratório por Ostry (1997) indicaram que *S. clavigignenti-juglandacearum* pode ser capaz de sobreviver em *Carya* spp. e possivelmente outras árvores como *Quercus* e *Prunus*. Os sintomas após infecção incluem cancros que podem ocorrer em todas as partes lenhosas, incluindo galhos, caules e raízes. Árvores de todas as idades e tamanhos, independentemente das condições do local, podem ser infectadas. Tisserat e Kuntz (1984) descobriram que a doença se desenvolve em um padrão característico. Os cânceres jovens são áreas alongadas e afundadas, que geralmente se originam em cicatrizes foliares, lenticelas, botões laterais, estômatos, feridas na casca, rachaduras naturais na casca e até mesmo esporadicamente em pontos aparentemente livres de qualquer lesão. Na primavera, um exsudato aquoso, preto como tinta sai das fissuras do cancro. No verão, permanecem manchas pretas e secas com fuligem, geralmente com uma margem esbranquiçada. Se a casca for removida, uma área elíptica marrom a preta do câmbio morto pode ser vista. Pequenos galhos e mudas jovens morrem rapidamente, mas a maioria dos cancros do caule das árvores mais velhas tornam-se perenes. Estes ocorrem principalmente na parte inferior do caule e nas partes expostas das raízes. Os cancros mais velhos são rodeados por camadas de calos e são orientados verticalmente, grandes, abertos ou parcialmente cobertos por casca desfiada. As árvores são mortas progressivamente à medida que os cancros envolvem o caule ou matam a copa da árvore. Brotos de tronco e sugadores de galhos frequentemente surgem abaixo da área circundada, mas são infectados subsequentemente e rapidamente mortos. Frutos de árvores infectadas são saudáveis e comestíveis (Ostry, 1997). O fungo está presente na América do Norte, (Canadá e nos EUA - amplamente distribuído) e foi relatada sua introdução na Holanda em 2013 (CABI, 2020). *S. clavigignenti-juglandacearum* é mais agressivo do que os fungos que causam o crestante da castanha (*Cryphonectria parasitica*). Existe um consenso geral entre os especialistas na doença de que o fungo apresenta um alto risco para outros continentes e justifica medidas fitossanitárias (Orchard, 1984; Fleguel, 1996 in Sambaraju et al., 2018; Nair, 1999). A transferência da semente com o patógeno é um dos principais fatores de risco a ser considerado. De acordo com Orchard (1984), o fungo pode ser transmitido internamente por sementes, sobrevivendo nos cotilédones de sementes infectadas estratificadas a 4°C até 18 meses. Os esporos são dispersos pela chuva ou névoa em curtas distâncias. Pelo vento, os esporos podem ser transportados até 45m e

por pequenas gotículas ou aerossóis com conídios, varridos acima da copa das árvores por turbulência de ar, por distâncias de maiores que 1 km (Tisserat e Kuntz, 1984). Acredita-se que os insetos sejam responsáveis pela disseminação do fungo em longas distâncias. Os pássaros também podem ser vetores. Além disso, insetos ou pássaros podem, ao causar feridas, aumentar os pontos de infecção (Ostry et al., 1997; Nair, 1999). Este fitopatógeno está descrito como invasivo pelo CABI no Compendium de Espécies Invasivas. Não foram encontrados relatos de casos no Brasil. Todavia, ressalta-se a importância da doença causada por este fungo e o risco de introdução do fitopatógeno no país, representando risco à biodiversidade de plantas pertencentes às famílias potenciais hospedeiras (Orchard, 1984; Nair, 1999), acrescida de sua capacidade de invasividade relatada. Com todos estes aspectos em questão, recomenda-se a não utilização da espécie.

### **Método de identificação:**

Quando houver pedidos de registro de fungos do gênero *Sirococcus* sp., é necessário confirmar se não se trata da espécie *S. clavigignenti-juglandacearum*. Para tanto, sugere-se utilizar a abordagem descrita no trabalho de Broders & Boland (2010). Neste trabalho, iniciadores específicos para esta espécie foram desenvolvidos com base nas regiões ITS1 e ITS2 do isolado ATCC 3662. São eles, os iniciadores *forward* SCJF e o *ITS4* universal como *reverse*, os quais estão descritos na Tabela abaixo. Esse conjunto de iniciadores foi testado em 48 isolados de *S. clavigignenti-juglandacearum* recuperados de árvores doentes e 26 espécies de outros fungos para confirmar a sua eficácia.

Gene/região	Sequências dos primers ( <i>forward/reverse</i> )	Referência
ITS de Região específica de <i>S. clavigignenti - juglandacearum</i>	ITS4 5'-TCCTTCCGCTTATTGATATGC-3' SCJF3 5' - GTGGAGTGAGGAGCAGAC-3'	White et al., 1990; Broders & Boland (2010)

### **Referências Bibliográficas:**

Broders, K. D., & Boland, G. J. (2010). Molecular diagnostic assay for detection of the butternut canker pathogen *Sirococcus clavigignenti-juglandacearum*. *Plant disease*, 94(8), 952-958.

CABI Dataset: *Sirococcus clavigignenti-juglandacearum* (butternut canker). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/50182>. Acesso em: 04 de março de 2021.

Fleguel, V.R. (1996). Information Report no. 20. A Literature Review of Butternut and the Butternut canker. Eastern Ontario Model Forest, Kemptville (CA) in Sambaraju, K. R., DesRochers, P., e Rioux, D. (2018). Factors Influencing the Regional Dynamics of Butternut Canker. *Plant Disease*, 102(4), 743–752.

Nair, V.M.G. (1999). Butternut canker - an International Concern. Biotechnology and plant protection in Forestry Science, 239-252; in USDA (2004). Disponível em: [https://www.nrs.fs.fed.us/pubs/gtr/gtr\\_nc243.pdf](https://www.nrs.fs.fed.us/pubs/gtr/gtr_nc243.pdf). Acesso em: 04 de março de 2021.

Orchard, L.P., Kuntz, J.E., Kessler, K.J. (1982). Reactions of *Juglans* species to butternut canker and implications for disease resistance. In: Black Walnut for the Future. USDA. Forest Service General

Technical Report NC 74, 27-31. USDA, Washington, USA; *in* USDA (2004). Disponível em: [https://www.nrs.fs.fed.us/pubs/gtr/gtr\\_nc243.pdf](https://www.nrs.fs.fed.us/pubs/gtr/gtr_nc243.pdf). Acesso em: 04 de março de 2021.

Orchard, L.P. (1984). Butternut Canker; Host Range, Disease Resistance, Seedling-Disease Reactions, and Seed-Borne Transmission. PhD thesis. University of Wisconsin, Madison, USA; *in* USDA (2004). Disponível em: [https://www.nrs.fs.fed.us/pubs/gtr/gtr\\_nc243.pdf](https://www.nrs.fs.fed.us/pubs/gtr/gtr_nc243.pdf). Acesso em: 04 de março de 2021.

Ostry, M.E., Katovich, S., Anderson, R.L. (1997). First report of *Sirococcus clavigignenti-juglandacearum* on black walnut. *Plant Disease*, 81(7):830; *in* USDA (2004). Disponível em: [https://www.nrs.fs.fed.us/pubs/gtr/gtr\\_nc243.pdf](https://www.nrs.fs.fed.us/pubs/gtr/gtr_nc243.pdf). Acesso em: 04 de março de 2021.

Tisserat, N., Kuntz, J.E. (1984). Butternut canker: development on individual trees and increase within a plantation. *Plant Disease*, 68(7):613-616; *in* USDA (2004). Disponível em: [https://www.nrs.fs.fed.us/pubs/gtr/gtr\\_nc243.pdf](https://www.nrs.fs.fed.us/pubs/gtr/gtr_nc243.pdf). Acesso em: 04 de março de 2021.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pages 315-322 in: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds. *Academic Press*, New York.

## II.41 *Thecaphora frezii*

### Classificação taxonômica:

Reino: Fungi  
Fil: Basidiomycota  
Classe: Ustilaginomycetes  
Ordem: Urocystidales  
Família: Glomosporiaceae  
Gênero: *Thecaphora*  
Espécie: *Thecaphora frezii*

### Motivo da inclusão na lista:

*Thecaphora frezii* é um fitopatógeno conhecido por causar a doença do carvão do amendoim. Espécies do gênero *Arachis* (Fabaceae) são os únicos hospedeiros relatados para *T. frezii* (Rago et al., 2017). A infecção é localizada e as plantas infectadas não apresentam sintomas aéreos. Os frutos afetados apresentam hipertrofia e consistência esponjosa, e os grãos podem ser substituídos, parcial ou totalmente, por uma massa de esporos marrom-avermelhados. Ocorrem lesões nas vagens e sementes (CABI, 2020). *T. frezii* produz teliósporos que podem sobreviver em um estado de dormência metabólica no solo, sem a presença de hospedeiros vivos. Quando o amendoim penetra no solo, seus exsudatos interrompem a dormência telial, que promove a germinação dos esporos e inicia infecções locais. O micélio dicariótico pode penetrar no ginóforo do amendoim no solo, colonizar os tecidos e substituir as células por teliósporos marrom-avermelhados (Marinelli et al., 2008). Durante o processo de descascamento, os teliósporos são liberados e depositados no solo. Cazón et al. (2016) estudaram a duração da sobrevivência dos teliósporos no solo, observando que a capacidade de infecção dos teliósporos de *T. frezii* foi mantida por pelo menos 4 anos em uma parcela experimental. A dispersão natural acontece quando teliósporos são dispersos pelo vento de um campo infectado para campos adjacentes (Rago et al., 2017). Este processo é favorecido durante a época da colheita. O fungo também pode ser movido pela dispersão natural de sementes infestadas. A introdução accidental ocorre, em sua maior parte, pelas fábricas de processamento de amendoim. Durante o processo de descascamento, milhões de teliósporos são liberados dos frutos afetados. Esses teliósporos são carregados pelo vento para campos adjacentes. Os teliósporos também podem ser transportados por máquinas agrícolas de campos infectados para outras províncias ou países limítrofes. O patógeno pode se dispersar em longas distâncias para diferentes países ou continentes por meio do comércio de sementes infectadas (Marraro Acuña e Haro, 2011). Este fitopatógeno está descrito como invasivo pelo CABI no Compendium de Espécies Invasivas. A doença foi relatada em lavouras comerciais de amendoim na Argentina, mas ocorre em amendoins silvestres no Brasil e na Bolívia (Soave et al., 2014). No Brasil, o gênero *Arachis* engloba 65 espécies, sendo destas, 47 endêmicas, fazendo do país o maior responsável pela conservação da diversidade genética do gênero. O gênero abriga espécies de importância econômica para uso alimentar, forrageiro, ornamental ou para a contenção de erosão (Rocha e Valls, 2017). Dada a fitopatologia causada pelo fungo *T. frezii*, sua capacidade de invasividade relatada, somado ao prejuízo ambiental que sua infecção pode causar aos representantes da flora brasileira de Fabaceae, recomenda-se a sua não utilização.

### **Método de identificação:**

Quando houver pedidos de registro de fungos do gênero *Thecaphora* sp., é necessário confirmar se não se trata da espécie *T. frezii*. Para essa identificação, sugere-se utilizar a abordagem descrita no trabalho de Cazón e colaboradores (2016). Neste trabalho, a região ITS de quatro isolados de *T. frezii* foi amplificada e sequenciada. Foi montada uma sequência consenso dessa região e um par de *primers* específicos para esse patógeno foi sintetizada, sendo eles TF-2F e TF-2R, os quais podem ser visualizados na Tabela abaixo. Esses *primers* foram confirmados quanto à especificidade e sensibilidade para identificação de *T. frezii*.

Gene/região	Sequências dos <i>primers</i> (forward/reverse)	Referência
Iniciadores específicos para <i>T. frezii</i> .	TF-2F: 5'- ATGT-CA A AGAGTGCAGA AGAC - 3' TF-2R: 5'- TATCTT-GCTGGTAGGCTGTT - 3'	Cazón et al. (2016)

### **Referências Bibliográficas:**

CABI Dataset: *Thecaphora frezii* (peanut smut). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/72512303>. Acesso em: 04 de março de 2021.

Cazón, L.I., Conforto, C., Fernández, F. D., Paredes, J. A., Rago, A. M. (2016). Molecular detection of *Thecaphora frezii* in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seeds. *Journal of Plant Pathology*, 98(2), 327-330.

Marinelli, A., March, G. J., Oddino, C. (2008). Biological and epidemiological aspects of peanut smut (*Arachis hypogaea* L.) caused by *Thecaphora frezii* Carranza & Lindquist. *AgriScientia*, 25(1/2), 1-5.

Marraro Acuña, F., Haro, R.J. (2011). [English title not available]. (Carbón del maní (*Thecaphora frezii*): su incidencia en rotaciones de cultivo). In: XXVI Jornada Nacional del Maní, Córdoba, Argentina, 15 September, 28-30.

Rago, A.M., Cazón L.I., Paredes, J.A., Molina, J. P. E., Conforto, E. C., Bisonard, E. M., Oddino, C. (2017). Peanut smut: from an emerging disease to an actual threat to Argentine peanut production. *Plant Disease*, 101(3), 400-408.

Rocha, R.A. e Valls, J.F.M. (2017). O gênero *Arachis* L. (Fabaceae) no Rio Grande do Sul. *Rev. Bras. Bioci.*, Porto Alegre, v. 15, n.3, p. 99-118, jul./set.

Soave, J., Bianco, C., Burgoa, R., Montaño, R., Rago, A. et al. (2014). [English title not available]. (Primera detección de carbón del maní (*Thecaphora frezii*) en Bolivia). In: 3º Congreso Argentino de Fitopatología, Tucumán, Argentina, 4-6 June, 211.

## **II.42 *Thekopsora areolata***

### **Classificação taxonômica:**

Reino: Fungi  
Filo: Basidiomycota  
Classe: Pucciniomycetes  
Ordem: Pucciniales  
Família: Coleosporiaceae  
Gênero: *Thekopsora*  
Espécie: *Thekopsora areolata*

### **Motivo da inclusão na lista:**

*T. areolata* é o fungo causador da ferrugem da cereja, um parasita obrigatório com etapas de seu ciclo de vida em espécies de *Picea* (Pinaceae) e folhas de *Prunus* (Rosaceae). Os sintomas incluem a espermogonia esbranquiçada na parte externa das escamas de cones infectados que geram um líquido açucarado com um odor forte. A aécia hemisférica ou arredondada na superfície interna das escamas faz com que os cones se abram precocemente e/ou permaneçam abertos em tempo úmido. Quantidades de aeciósportos amarelos são eliminadas. A infecção resultante das folhas de *Prunus* causa manchas angulares, violetas ou marrom-avermelhadas na superfície superior da folha, com pústulas urediniais amarelas que desprendem urediniosportos na superfície inferior. As télitas estão na epiderme das folhas, eventualmente causando descoloração marrom-avermelhada a marrom-escura nas manchas na superfície superior (CABI, 2020). A necrose do tecido foliar pode resultar em um efeito de “buraco de tiro”, quando o tecido afetado se desprende. Hietala e colaboradores (2008) também relataram crescimento torto que frequentemente acompanhava lesões necróticas marrom-escuras na casca das mudas e nos brotos líderes das mudas. Reportado na Europa e Ásia, o fungo é uma praga regulamentada para os EUA (Kaitera e Tillman-Sutela, 2013; CABI, 2020). Não é relatado em países temperados do hemisfério sul. Existe o risco de introdução dessa ferrugem em partes temperadas do hemisfério sul, onde espécies de *Picea* introduzidas são cultivadas em plantações. A dispersão natural ocorre pelos basidiósporos, aeciósportos e urediniosportos da maioria das ferrugens que são distribuídos pelo vento. A introdução accidental pode ocorrer pelo transporte de *T. areolata* em cones usados para enfeites, por mudas e árvores jovens sem esporulação externa (Hietala et al., 2008). Não foram encontrados relatos de casos no Brasil. Apesar de não haver relatos de sua ocorrência no país, devido ao risco de introdução e à possibilidade de impactos ambientais e econômicos para várias espécies cultivadas pertencentes à família Pinaceae e às espécies de plantas nativas da família Rosaceae, como as de *Prunus* (Kiyama e Simão-Bianchini, 2003), recomenda-se a não utilização de *Thekopsora areolata*.

### **Método de identificação:**

Considerando as restrições de uso, quando houver pedidos de registro de fungos do gênero *Thekopsora* sp., é necessário confirmar se não se trata, especificamente, de *T. areolata*. Dentre os trabalhos levantados e que permitem identificação em nível de espécie, sugere-se utilizar a abordagem descrita no trabalho de Kaitera e colaboradores (2017). Neste trabalho, para identificação das espécies fúngicas, a região do espaçador transcrito interno ribossomal (ITS2) foi amplificada utilizando os primers ITS7 e ITS4B, os quais podem ser visualizados na Tabela abaixo, seguido de sequenciamento e análise filogenética. O mesmo se mostrou eficiente na identificação da espécie.

Gene/região	Sequências dos <i>primers</i> (forward/reverse)	Referência
ITS2	FITS7 5'- GTGARTCATCGAATCTTG - 3' ITS4B 5'- CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG - 3'	Ihrmark et al. 2012; Gardes & Bruns (1993)

### Referências Bibliográficas:

CABI Dataset: *Thekopsora areolate* (cherry spruce rust). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/45892>. Acesso em: 04 de março de 2021.

Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2, 113– 118.

Hietala, A.M.; Solheim, H.; Fossdal, C.G. (2008). Real-time PCR-based monitoring of DNA pools in the tri-trophic interaction between Norway spruce, the rust *Thekopsora areolata*, and an opportunistic ascomycetous *Phomopsis* sp. *Phytopathology*, 98(1):51-58.

Ihrmark K, Bödeker I, Cruz-Martinez K, Friberg H, Kubartova A, Schenck J, Strid Y, Stenlid J, Brandström-Durling M, Clemmensen KE, Lindahl BD. (2012) New primers to amplify the fungal ITS2 region—evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiology Ecology*. Dec 1;82(3):666-77.

Kaitera, J., e Tillman-Sutela, E. (2013). Germination capacity of *Thekopsora areolate* aeciospores and the effect of cone rusts on seeds of *Picea abies*. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 29(1), 22– 26.

Kaitera, J., Kauppila, T., & Hantula, J. (2017). New Picea hosts for *Chrysomyxa ledi* and *Thekopsora areolata*. *Forest Pathology*, 47(6), e12365.

Kiyama, C.Y. e Simão-Bianchini, R. (2003). Rosaceae In: Wanderley, M.G.L., Shepherd, G.J., Melhem, T.S., Giulietti, A.M., Kirizawa, M. (eds.) *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. Instituto de Botânica, São Paulo, vol. 3, pp: 285-294.

## **II.43 *Tilletia controversa***

### **Classificação taxonômica:**

Reino: Fungi  
Filo: Basidiomycota  
Classe: Exobasidiomycetes  
Ordem: Tilletiales  
Família: Tilletiaceae  
Gênero: *Tilletia*  
Espécie: *Tilletia controversa*

### **Motivo da inclusão na lista:**

*Tilletia controversa* é o agente etiológico da doença do trigo anão. O trigo (*Triticum* spp.) é o principal hospedeiro deste fitopatógeno. Ocionalmente, outras Poaceae (68 espécies) foram descritas como passíveis de serem infectadas naturalmente (CABI, 2020). A identificação da doença é difícil, uma vez que tanto as características do organismo causal quanto a expressão dos sintomas do hospedeiro variam amplamente. Uma planta infectada não demonstra nenhum sinal óbvio de doença até que surjam as espigas, mas seu caule é geralmente mais curto do que em plantas saudáveis e pode ter mais perfilhos. As orelhas caídas são um pouco mais estreitas do que as saudáveis, mas, à medida que o amadurecimento avança, as glumas são afastadas lateralmente, dando-lhes uma aparência característica. Os soros são esféricos e contêm uma massa pulverulenta negra de teliósporos rodeados por um tegumento marrom-acinzentado espesso (Baylis, 1958; Hardison et al, 1959). Sua ocorrência é descrita mundialmente, (África, Ásia, Europa, América do Norte, Oceania, América do Sul). Como o principal modo de dispersão é por sementes, as safras de trigo de países onde ocorre o fungo devem ser examinadas durante a estação de crescimento e consideradas livres de *T. controversa*. Os esporos deste fitopatógeno sobrevivem entre as safras como teliósporos no solo e na semente. Os esporos podem permanecer viáveis no solo por 3-10 anos na ausência de trigo e podem passar pelo trato digestivo de galinhas e vacas sem perder sua viabilidade (CABI, 2020). Eles normalmente germinam após uma exposição ao pré-condicionamento à luz e pelo menos 3-5 semanas a cerca de 5 °C. Nas culturas de gramíneas, a infecção está aparentemente confinada aos botões secundários do caule da grama semeada na primavera anterior (Halisky, 1965). Adicionalmente, esta espécie de fungo está descrita como invasiva pelo CABI no Compendium de Espécies Invasivas. Não foram encontrados relatos de casos no Brasil. Todavia, ressalta-se que a família Poaceae possui representantes da flora silvestre brasileira, sendo estimadas 1.500 espécies distribuídas em aproximadamente 180 gêneros (Reflora, s/d), além de diversas espécies nativas. Isto demonstra um alto risco para a diversidade brasileira, uma vez que causaria impacto tanto direto quanto indireto na flora e, ainda, na fauna que utiliza essas espécies para forrageio. Desta forma, além de sua reconhecida ação fitopatogênica, devido ao seu alto potencial de invasividade e risco à diversidade brasileira, recomenda-se a não utilização de *T. controversa*.

### **Método de identificação:**

Considerando a restrição de uso, quando houver pedidos de registro de fungos do gênero *Tilletia* sp., é necessário confirmar que não se trata da espécie *T. controversa*. Para tanto, dentre os trabalhos levantados, sugere-se utilizar a abordagem descrita no trabalho de Liu e colaboradores (2009). Neste trabalho, foi desenvolvido um marcador SCAR (região amplificada caracterizada por sequência) com

base em um total de 30 combinações de iniciadores testados por AFLP para detectar polimorfismos entre *T. controversa* e espécies relacionadas, resultando num padrão polimórfico específico para *T. controversa*. Dessa forma, segundo os autores, esta abordagem permite distinguir *T. controversa* de fungos patogênicos semelhantes. Essa região específica foi então acessada por meio de PCR convencional utilizando os iniciadores SC-0149 e SC-02415, que são apresentados na Tabela abaixo.

Gene/região	Sequências dos primers (forward/reverse)	Referência
Região específica para <i>T. controversa</i>	SC-0149: 5'- CTCCGACGACGAAGTATAGCG - 3' SC-02415: 5'- GGTATACGCCGGCACCATATGC - 3'	Liu et al. (2009)

#### Referências Bibliográficas:

Baylis, R.J. (1958). Studies of *Tilletia controversa*, the cause of dwarf bunt of winter wheat. *Canadian Journal of Botany*, 36:17-32.

CABI Dataset: *Tilletia controversa* (dwarf bunt of wheat). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/53924>. Acesso em: 04 de março de 2021.

Halisky, P. M. (1965). Physiologic specialization and genetics of the smut fungi. III. *The Botanical Review*, 31(1), 114–150.

Hardison, J. R., Meiners, J. P., Hoffmann, J. A., Waldher, J. T. (1959) Susceptibility of Gramineae to *Tilletia Contraversa*, *Mycologia*, 51:5, 656-664.

Liu, J. H., Gao, L., Liu, T. G., & Chen, W. Q. (2009). Development of a sequence-characterized amplified region marker for diagnosis of dwarf bunt of wheat and detection of *Tilletia controversa* Kühn. *Letters in applied microbiology*, 49(2), 235-240.

Reflora (s/d). Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 04 de março de 2021.

## II.44 *Trichoconiella padwickii*

### Classificação taxonômica:

Reino: Fungi  
Filo: Ascomycota  
Classe: Dothideomycetes  
Ordem: Pleosporales  
Família: Pleosporaceae  
Gênero: *Trichoconiella*  
Espécie: *Trichoconiella padwickii*

### Motivo da inclusão na lista:

*T. padwickii*, anteriormente classificado como *Alternaria padwickii*, é um fungo de reprodução assexuada que infecta principalmente sementes de cultivares de arroz. É um dos vários fungos responsáveis pela descoloração e podridão das sementes, mas também foi detectado como um patógeno que apodrece a bainha do vegetal (Mathur et al., 2004). A espécie foi relatada causando manchas nas folhas de gramíneas (*Axonopus compressus*) na Costa Rica (UK CAB International, 1984; USDA-ARS, 2010), em sementes de milheto, de *Sorghum halepense* e de eucalipto em regiões da Índia, e sobre a erva invasora, *Marsilea quadrifolia* (CABI, 2020). No Brasil, é registrada na gramínea *Brachiaria decumbens* e também em cultivares de arroz, que apesar de não serem espécies nativas brasileiras, são de grande importância no setor da agricultura e pecuária (Soave et al., 1985; Farias et al., 2007). A espécie apresenta capacidade indeterminada de sobreviver em restos de plantas e no solo como esclerócio, que é uma massa compacta de micélio endurecido contendo reservas alimentares (CABI, 2020). Destaca-se seu conhecido potencial de invasibilidade, sendo considerada uma espécie invasora introduzida na África, Ásia, Europa, Américas do Norte e do Sul, e tendo sido registrada como nativa apenas na Austrália. Desta forma, considerando seu potencial invasivo, a possibilidade de infecção em exemplares das famílias Poaceae, Myrtaceae e Asteraceae, para as quais possuímos números elevados de representantes silvestres e, principalmente, nativos da flora brasileira, aliado à sua capacidade de perdurar como esclerócio nos locais após a infecção, recomenda-se a não utilização deste fungo, devido aos potenciais prejuízos ambientais que possam ocorrer.

### Método de identificação:

Dada a restrição de uso ser para a espécie *T. padwickii*, sempre que houver pedidos de registros representantes que pertençam ao gênero *Trichoconiella* ou *Alternaria*, que é sua classificação anterior, é imprescindível garantir que não se trate da espécie em questão, sendo necessário então sua identificação precisa. Consultando o GenBank, observa-se que há sequências da região ITS e do gene que codifica o fator de elongação 1-alfa (TEF) depositadas para esse isolado. Portanto, para sua identificação sugere-se utilizar a abordagem descrita no trabalho de Udayashankar e colaboradores (2012), com algumas modificações, que para padronizar ensaios de detecção de *Alternaria helianthi*, promoveu a amplificação e identificação também de diversas outras espécies do gênero, inclusive, *A. padwickii*. Foi utilizado para tal, a amplificação de partes da região ITS, utilizando-se os primers ITS1 e ITS4, mas sugere-se também adicionar ao ensaio a utilização de primers universais responsáveis pela amplificação de fragmentos do TEF, caso apenas a região ITS não apresente resolução suficiente. Os primers utilizados no trabalho e sugeridos podem ser visualizados na Tabela abaixo.

Gene/região	Sequências dos primers (forward/reverse)	Referência
ITS	ITS1: 5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3' ITS4: 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'	White et al., 1990
TEF	EF1-728F: 5' - CATCGAGAAGTTCGAGAAGG - 3' EF1-986R: 5' - TACTTGAAGGAACCCTTACC - 3'	Carbone & Kohn 1999

### Referências Bibliográficas:

CABI Dataset: *Trichoconiella padwickii* (stackburn disease). (2020). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/4519>. Acesso em: 03 de fevereiro de 2021.

Carbone, I., & Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91(3), 553-556.

Farias, C.R.J.; Afonso, A.P.S.; Brancão, M.F.; Pierobom, C.R. (2007). Ocorrência de *Alternaria padwickii* (Ganguly) em sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) (Poaceae) produzidas em quatro regiões orizícolas do Rio Grande do Sul e seu efeito sobre plântulas. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.74, n.3, p.245-249.

Mathur, S.K., Nath, R., Mathur, S.B. (1973). Seedborne fungi of pearl millet (*Pennisetum typhoides*) and their significance. *Seed Science and Technology*, 1(4):811-820.

Mathur, S.B., Talukder, M.H., Veena, M.S. and Mortensen, C.N. (2004). Effect of manual cleaning on health and germination of rice seeds. *Seed Sci. & Technol.*, 32, 405-415.

Soave, J.; Pizzinatto, M.A.; Urberti filho, J.A.; Azzini, L.E.; Camargo, O.B.A.; Villela, O.; Gallo, P.B. (1985). Comportamento de cultivares de arroz irrigado em relação a fungos manchadores de sementes. *Bragantia*, Campinas, 44 (1): 331-346.

Udayashankar, A. C., Nayaka, S. C., Archana, B., Anjana, G., Niranjana, S. R., Mortensen, C. N., ... & Prakash, H. S. (2012). Specific PCR-based detection of *Alternaria helianthi*: the cause of blight and leaf spot in sunflower. *Archives of microbiology*, 194(11), 923-932.

UK CAB International. (1984). *Alternaria padwickii*. Distribution Maps of Plant Diseases, December (Edition 4). Wallingford, UK: CAB International, Map 314. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20046500314>. Acesso em: 03 de fevereiro de 2021.

USDA-ARS. (2010). Germplasm Resources Information Network (GRIN). Online Database. Beltsville, Maryland, USA: National Germplasm Resources Laboratory. Disponível:

<https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxon/taxonomysearch.aspx>. Acesso em: 03 de fevereiro de 2021.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.

## **II.45 *Uromycladium* spp.**

### **Classificação taxonômica:**

Reino: Fungi  
Filo: Basidiomycota  
Classe: Pucciniomycetes  
Ordem: Pucciniales  
Família: Pileolariaceae  
Gênero: *Uromycladium*

### **Motivo da inclusão na lista:**

Diversas espécies de fungos do gênero *Uromycladium* são conhecidas por causarem a ferrugem com formação de galhas em mais de 100 plantas hospedeiras (em sua maioria da família Fabaceae), tendo como principais hospedeiros espécies diferentes de Acáias. Representantes do gênero são nativos da Australásia, compreendendo a Indonésia, Austrália, Nova Caledônia e Papua Nova-Guiné. (Doungsa-Ard et al., 2018). Em outros 8 países da Ásia, 2 da Oceania e 1 da África do Sul, este fungo foi relatado como espécie invasiva, introduzida por ação do vento ou antrópica (accidental ou proposital) (CABI, 2020). Os sintomas da ferrugem causada por espécies do gênero incluem a formação de galhas, que variam em tamanho, de pequenas a muito grandes, de cor marrom-avermelhada, nos caules, galhos, folhas, inflorescências e vagens. Essas galhas formadas podem persistir por alguns meses ou até mesmo vários anos. Aparência de “vassouras de bruxa” também são descritas em algumas plantas hospedeiras (Rahayu et al., 2009). Não foram encontrados trabalhos com relatos de casos no Brasil. Entretanto, destaca-se sua conhecida característica de invasibilidade tanto dentro quanto fora da sua área nativa, além de ser tolerante a condições adversas, ter longa vida e alto potencial reprodutivo (CABI, 2020). Desta forma, considerando esse potencial invasivo, a ampla gama de plantas hospedeiras que possuem, as quais têm parentesco em nível de família com diversos representantes silvestres da flora brasileira, aliado à sua dispersão pelo vento, espalhando-se rapidamente e dificultando o controle após introduzido no local, recomenda-se a não utilização de fungos deste gênero, devido aos potenciais prejuízos ambientais que possam ocorrer.

### **Método de identificação:**

Devido à restrição de uso se estender a todas as espécies do gênero *Uromycladium*, é necessário que qualquer solicitante que pretenda registrar fungos pertencentes à família Pileolariaceae, demonstre que o mesmo não se trate do gênero em questão. Para a identificação destes microrganismos, testes moleculares baseados na amplificação de apenas uma região gênica tem se mostrado eficazes apenas em nível de classe ou família (Doungsa-Ard et al., 2015). Dessa maneira, para identificação em nível de gênero, indica-se utilizar a abordagem descrita no trabalho de Doungsa-Ard e colaboradores (2018), com adaptações, que utilizaram, para essa identificação, a região ITS e os genes que codificam o rRNA 28S (LSU), e o rRNA 18S (SSU), seguido de sequenciamento e análise das sequências obtidas. As sequências dos primers utilizados para essas regiões se encontram na tabela abaixo.

Gene/região	Sequências dos primers (forward/reverse)	Referência
ITS	ITS1F: 5'-CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA-3' ITS4B: 5'-CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG-3'	Gardes & Bruns 1993
LSU	Rust2inv: 5'-GATGAAGAACACAGTGAAA-3' LR7: 5'-TACTACCACCAAGATCT-3'	Aime 2006; Vilgalys & Hester 1990
SSU	NS1: 5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC -3' Rust 18SR: 5'-ACCTTGTACGACTTTACTTC-3'	White et al. 1990; Aime 2006

### Referências Bibliográficas:

Aime MC (2006) Toward resolving family-level relationships in rust fungi (Uredinales). *Mycoscience* 47:112–122.

CABI Dataset: *Uromycladium* spp. that cause gall rusts. (2020). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/55738#toImpactSummary>. Acesso em: 01 de fevereiro de 2021.

Doungsa-ard, C., McTaggart, A. R., Geering, A. D. W., & Shivas, R. G. (2018). Diversity of gall-forming rusts (*Uromycladium*, Pucciniales) on *Acacia* in Australia. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 40(1), 221–238.

Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2(2), 113–118.

Moncalvo, J.-M., Wang, H.-H., & Hseu, R.-S. (1995). Phylogenetic Relationships in *Ganoderma* Inferred from the Internal Transcribed Spacers and 25S Ribosomal DNA Sequences. *Mycologia*, 87(2), 223.

Rahayu, S., Lee SuSee, Nor Aini, A. S. (2009). *Uromycladium tepperianum*, the gall rust fungus from *Falcaria moluccana* in Malaysia and Indonesia. *Mycoscience*, 51(2), 149-153.

Vilgalys, R, Hester, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J. Bacteriol.*, 172:4238–4246.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. *PCR Protocols*, 315–322.

## **II.A. ADENDO**

Após construção do documento principal do produto, contendo as fichas dos táxons listados na tabela II.2, uma análise mais aprofundada foi realizada individualmente com cada fungo em relação às doenças causadas por eles, considerando fatores como ciclo biológico de vida do fungo, os principais nichos que ocupa, condições favoráveis à disseminação da doença, a proximidade taxonômica de espécies nativas brasileiras com os hospedeiros do fungo, dentre outros. Após essa análise, concluiu-se que alguns dos táxons originalmente selecionados não possuíam grande potencial de se disseminar em território nacional e, principalmente, afetar plantas e animais nativos brasileiros, ou seja, de causar graves desequilíbrios ambientais no país. Dessa maneira, após essa nova análise, esses táxons foram removidos do documento principal. Entretanto, devido ao fato de serem fungos que não foram considerados totalmente isentos de algum risco, as fichas dos mesmos foram agrupadas neste adendo como uma forma de alerta. Eles deixam de ser fungos, *a priori*, proibidos de serem registrados e utilizados. Porém recomenda-se que caso haja pedidos de registros dos mesmos, seus documentos apresentados sejam minuciosamente avaliados para se determinar o risco-benefício de sua utilização e só após esta análise criteriosa, a decisão a respeito desse *status* de uso seja tomada.

## **II.A1. *Amylostereum areolatum***

### **Classificação taxonômica:**

Reino: Fungi  
Filo: Basidiomycota  
Classe: Agaricomycetes  
Ordem: Russulales  
Família: Steraceae  
Gênero: *Amylostereum*  
Espécie: *Amylostereum areolatum*

### **Motivo da inclusão na lista:**

*Amylostereum areolatum* é um fungo saprofítico que ocorre em troncos caídos e tocos de conífera, decompondo-os e formando extensos ramos nos caules danificados (Vasiliauskas et al., 1998). Adicionalmente, *A. areolatum*, assim como outras espécies do gênero *Amylostereum* são fungos simbiontes de vespas da madeira dos gêneros *Sirex* e *Urocerus*, e as fêmeas introduzem os esporos dos fungos nas árvores vivas durante a postura dos ovos, os quais provocam o fechamento dos vasos de condução de seiva, levando ao processo de morte da árvore. Dessa maneira, como larvas da vespa têm atividade de escavação e o fungo causa o apodrecimento da madeira, a simbiose inseto-fungo é ainda mais prejudicial às árvores hospedeiras (Slippers et al., 2003; Iede & Zanetti, 2007). Dentre as árvores hospedeiras do fungo estão inclusas importantes espécies comerciais de madeira macia, principalmente pinheiros. A introdução de *A. areolatum* devastou centenas de milhares de plantações de *Pinus radiata* na Nova Zelândia, e Austrália e em países da América do Sul também causou grande mortalidade em plantações de pinheiros (Vasiliauskas et al., 1998; Slippers et al., 2003). Na América do Norte é considerada uma praga com risco muito alto para pinheiros nativos e exóticos e continua a matar um número significativo de árvores e a se espalhar para áreas anteriormente não afetadas na Austrália, África do Sul e América do Sul (Bergeron et al., 2011; Vasiliauskas et al., 1998; Slippers et al., 2003). No Brasil, vespas do gênero *Sirex* foram introduzidas accidentalmente em 1988 e elas, juntamente com o fungo simbionte *A. areolatum*, são consideradas uma das principais pragas em cultivos de *Pinus* no país, os quais representam um importante recurso socioeconômico para o país, devido à sua grande participação na cadeia produtiva da madeira, na recuperação de áreas degradadas e na geração de empregos (Iede & Zanetti, 2007; Bergeron et al., 2011). Adicionalmente, possuímos algumas espécies de pinheiros nativos da família Araucariaceae, como *Araucaria angustifolia*, o que torna a introdução desse fungo invasivo ainda mais preocupante.

### **Método de identificação:**

Devido à restrição de uso de *A. areolatum*, é preciso garantir, quando houver pedidos de registro de fungos do gênero *Amylostereum*, que os mesmos não se tratem dessa espécie, confirmação que deverá ser realizada pelo solicitante do registro. As principais regiões utilizadas para essa identificação, de acordo com os trabalhos levantados, são sequências do rDNA 18S e 28S, sequências do espaçador transrito interno (ITS) e do espaçador intergênico (IGS), além de genes que codificam enzimas específicas como peroxidases e lacases, dentre outros. O maior problema é a grande dificuldade em distinguir a espécie *A. areolatum* de *A. chailletii*, mas alguns conjuntos de primers foram sintetizados e utilizados com sucesso para esse fim. Para a identificação da *A. areolatum* sugere-se utilizar a

metodologia descrita no trabalho de Olatinwo e colaboradores (2013), que testaram diferentes conjuntos de *primers* desenhados em trabalhos anteriores para amplificar fragmentos da região IGS desses fungos, mas não obtiveram sucesso na distinção entre eles e por isso desenharam um par de *primers* específicos para a espécie *A. areolatum* a partir de porções ainda menores (193 pb) dessa região. Esses *primers* se encontram descritos na tabela abaixo e demonstraram eficiência na identificação específica de *A. areolatum*.

<i>Gene/região</i>	<i>Sequências dos primers (forward/reverse)</i>	<i>Referências</i>
Região específica de <i>A. areolatum</i>	AA1 F: 5' – TTCAACCTCGGTTGGACTTC – 3' AA1R: 5' – CAAGCACCCCTACATTTG – 3'	Olatinwo et al., 2013

### **Referências Bibliográficas:**

- Bergeron, M. J., Leal, I., Foord, B., Ross, G., Davis, C., Slippers, B., ... & Hamelin, R. C. (2011). Putative origin of clonal lineages of *Amylostereum areolatum*, the fungal symbiont associated with *Sirex noctilio*, retrieved from *Pinus sylvestris*, in eastern Canada. *Fungal Biology*, 115(8), 750-758.
- Iede, E. T., e Zanetti, R. (2007). Ocorrência e recomendações para o manejo de *Sirex noctilio* Fabricius (Hymenoptera, Siricidae) em plantios de *Pinus patula* (Pinaceae) em Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 51(4), 529-531.
- Olatinwo, R., Allison, J., Meeker, J., Johnson, W., Streett, D., Aime, M. C., & Carlton, C. (2013). Detection and identification of *Amylostereum areolatum* (Russulales: Amylostereaceae) in the mycangia of *Sirex nigricornis* (Hymenoptera: Siricidae) in central Louisiana. *Environmental entomology*, 42(6), 1246-1256.
- Vasiliauskas, R., Stenlid, J., & Thomsen, I. M. (1998). Clonality and genetic variation in *Amylostereum areolatum* and *A. chailletii* from northern Europe. *New Phytologist*, 139(4), 751-758.
- Slippers, B., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D., & Wingfield, M. J. (2003). A review of the genus *Amylostereum* and its association with woodwasps. *South African Journal of Science*, 99(1-2), 70-74.

## II.A2. *Ciborinia camelliae*

### Classificação taxonômica:

Reino: Fungi  
Filo: Ascomycota  
Classe: Leotiomycetes  
Ordem: Helotiales  
Família: Sclerotiniaceae  
Gênero: *Ciborinia*  
Espécie: *Ciborinia camelliae*

### Motivo da inclusão na lista:

O fungo *Ciborinia camelliae* foi descrito pela primeira vez no Japão em 1919 e durante muitas décadas recebeu a denominação de *Sclerotinia camelliae*, sendo reclassificado para o gênero *Ciborinia* em 1979 devido às suas características morfológicas, principalmente a presença de tecido hospedeiro na medula esclerótial do fungo (CABI, 2021). Esse fungo é o agente causal da ‘mancha das flores’, uma ferrugem que até o momento sabe-se afetar apenas espécies de camélias, sendo *Camelliajaponica* o principal hospedeiro relatado no Japão, países europeus, Nova Zelândia, e EUA. Mas acredita-se que todas as variedades e espécies são susceptíveis à doença, apesar de ainda não haver relatos científicos publicados comprovando essa suscetibilidade (Taylor & Long, 2000; Denton-Giles et al., 2013). *C. camelliae* é considerada a praga mais destrutiva das camélias, sendo as partes florais das plantas as únicas afetadas. Escleródios se formam nas pétalas infectadas e permanecem dormentes nos restos das plantas até a próxima temporada. Os primeiros sintomas observados são pontos marrons nas pétalas das flores, que aumentam e coalescem rapidamente em condições climáticas favoráveis, causando lesões necróticas e crestamentos que tornam toda a pétala marrom. Isso provoca a murcha da flor, fazendo com que toda ela ou pétalas individuais caiam prematuramente das plantas (Taylor & Long, 2000). Além da Ásia sabe-se que a doença se tornou comum em muitas regiões temperadas do mundo onde camélias são cultivadas, de forma que se encontra disseminada pelos EUA, além de ter sido reportada na Nova Zelândia e em alguns países da Europa (Inglaterra, França, Alemanha, Suíça, Espanha e Portugal). Acredita-se que há a presença do fungo em todos os países nos quais as camélias são cultivadas como plantas paisagísticas (Taylor & Long, 2000; Van toor et al., 2005a). A principal forma de disseminação do fungo é pelo transporte dos ascósporos por correntes de ar e também pelas chuvas, o que pode ocorrer por longas distâncias. A partir disso infectam novas plantas e reiniciam a infecção se as condições climáticas são favoráveis, sendo temperaturas mais frias, abaixo de 24°C, as ideais. *C. camelliae* causou sérios danos às flores de camélias em plantas de paisagens no sul dos EUA e em outros países, levando a grandes destruições em plantios, sendo considerada uma doença muito difícil de controlar (Taylor & Long, 2000). Por isso vem sendo regulamentada e está, por exemplo, na lista A1 de pragas quarentenárias da EPPO. No Brasil, foram relatadas a presença de outros fungos que também afetam plantas de camélias, muito cultivadas como espécies ornamentais no país, mas não foram encontrados trabalhos que comprovem a presença de *C. camelliae* em território brasileiro. As camélias são plantas nativas da Ásia, mas pelo fato do fungo ser considerado um patógeno invasivo, que tem alto potencial de disseminação e que causa prejuízos tanto econômicos quanto ambientais graves, considera-se importante avaliar minuciosamente seu uso em território brasileiro, para que não possa promover desequilíbrios ao nosso ecossistema.

## Método de identificação:

Sempre que houver pedidos de registro de fungos do gênero *Ciborinia*, é preciso garantir que não se trate da espécie *C. camelliae*. Para tal é necessária uma identificação precisa do isolado em nível de espécie. A maioria dos trabalhos levantados utiliza protocolos visando a caracterização filogenética entre diferentes isolados da espécie, mas sem especificar protocolos que sejam válidos para sua identificação (Van Toor et al., 2005). Entretanto, em consulta ao Genbank (GenBank, 2021) pode-se observar que há sequências de vários genes e regiões depositados no banco de dados, tais como ITS, beta tubulina (TUB) e a segunda maior subunidade da RNA polimerase II (RPB2). Dessa maneira, sugere-se utilizar para essa identificação, uma ou mais dessas regiões, a depender da capacidade resolutiva obtida. Se apenas uma das regiões for suficiente para obtenção de identificação precisa e sem ambiguidades com outras espécies, apenas ela pode ser utilizada. Caso contrário, deve-se acrescentar a amplificação das demais regiões para que seja feita ao final a análise conjunta desses genes. Sugere-se para essa amplificação, o uso dos *primers* universais para essas regiões listados abaixo, que são os universalmente mais utilizados na maioria dos trabalhos.

Gene/região	Sequências dos <i>primers</i> (forward/reverse)	Referências
ITS	ITS1: 5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3' ITS4: 5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3'	White et al., 1990
TUB	T1: 5'- AACATGCGTGAGATTGTAAGT - 3' T2: 5'- TAGTGACCCTGGCCCAGTTG - 3'	O'Donnell & Cigelnik 1997
RPB2	RPB2for: 5' – GATGATCGTGATCATTTGG – 3' RPB2rev: 5' – CCCATAGCTGCTTACCCAT – 3'	Staats et al., 2005

## Referências Bibliográficas:

CABI (2021). Datasheet: *Ciborinia camelliae* (Flower blight). Disponível em <https://www.cabi.org/isc/datasheet/49113> Acesso em 21 de fevereiro de 2021.

Denton-Giles, M., Bradshaw, R. E., & Dijkwel, P. P. (2013). *Ciborinia camelliae* (Sclerotiniaceae) induces variable plant resistance responses in selected species of *Camellia*. *Phytopathology*, 103(7), 725-732.

GenBank (2021). Datasheet: *Ciborinia camelliae*. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=Ciborinia+camelliae> Acesso em 22 de Fevereiro de 2021.

O'Donnell, K.L. (1993). *Fusarium* and its near relatives. In The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics. Edited by D.R. Reynolds and J.W. Taylor. CAB International, Wallingford, U.K. pp. 225–233.

Staats, M., van Baarlen, P., & van Kan, J. A. (2005). Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular biology and Evolution*, 22(2), 333-346.

- Taylor, C. H., & Long, P. G. (2000). Review of literature on camellia flower blight caused by *Ciborinia camelliiae*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 28(2), 123-138.
- Van Toor, R. F., Jaspers, M. V., & Stewart, A. (2005)a. Effect of soil microorganisms on viability of sclerotia of *Ciborinia camelliiae*, the causal agent of camellia flower blight. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 33(2), 149-160.
- Van Toor, R. F., Ridgway, H. J., Butler, R. C., Vjaspers, M., & Stewart, A. (2005)b. Assessment of genetic diversity in isolates of *Ciborinia camelliiae* Kohn from New Zealand and the United States of America. *Australasian Plant Pathology*, 34(3), 319-325.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.

## **II.A3. *Coniferiporia weiri***

### **Classificação taxonômica:**

Reino: Fungi  
Fil: Basidiomycota  
Classe: Agaricomycetes  
Ordem: Hymenochaetales  
Família: Hymenochaetaceae  
Gênero: *Coniferiporia*  
Espécie: *Coniferiporia weiri*

### **Motivo da inclusão na lista:**

*Coniferiporia weiri* é um fungo considerado agente etiológico da doença da podridão radicular laminada que afeta abetos, principalmente o abeto de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*), cedros, como *Thuja* spp. e *Cupressus* spp., além de cicutas e pinheiros (Hansen & Goheen, 2000; Jeger et al., 2018; EPPO, 2021). Os sintomas causados pela doença podem não se tornar perceptíveis até que 50% ou mais do sistema radicular das árvores afetadas tenha sido destruído, sendo o crescimento terminal reduzido um dos primeiros sintomas. Nos estágios posteriores da infecção da raiz, as árvores afetadas apresentam amarelecimento da copa, bem como redução do crescimento terminal e lateral dos ramos. Também pode ocorrer resinose basal ou grandes exsudações na base do caule ou na raiz, além de manchas irregulares ou manchas em forma de meia lua de cores marrom-avermelhada a marrom-chocolate, geralmente no cerne, toco recém-cortado ou em seções transversais da raiz. As infecções radiculares eventualmente levam à decomposição laminada da raiz, fazendo com que as árvores doentes frequentemente morram e caiam (Hansen & Goheen, 2000; Jeger et al., 2018). *C. weiri* é comumente encontrado em grandes tocos de árvores antigas em áreas florestais, onde pode viver várias décadas como saprófita. A infecção se espalha de árvore em árvore, através do contato de mudas ou árvores saudáveis com madeira infectada (Hansen & Goheen, 2000). Além disso, a doença pode se disseminar também pela dispersão de basidiósporos e causa sérios prejuízos econômicos e aos serviços ecossistêmicos, devido à redução de crescimento e morte de árvores (Jeger et al., 2018). O patógeno não possui ampla distribuição, sendo encontrado principalmente em alguns estados dos EUA e alguns países asiáticos (Hansen & Goheen, 2000; Jeger et al., 2018). Entretanto, devido à gravidade da doença que causa, *C. weiri* é considerado um organismo prejudicial e regulamentado em algumas regiões da África, América, Ásia e na União Europeia, estando sua entrada proibida, uma vez que tem potencial de se disseminar para outras regiões que possuam a presença dos hospedeiros e condições climáticas favoráveis (Jeger et al., 2018). Dessa maneira e, principalmente, pelo fato de possuirmos espécies nativas no país da ordem Pinales, tais como *Araucaria angustifolia*, *Podocarpus lambertii* e *Podocarpus se lowii* (Vieira, 2017), que é mesma ordem de diversas espécies afetadas pelo patógeno, destaca-se a importância de se avaliar rigorosamente a entrada e utilização de *C. weiri* no país.

### **Método de identificação:**

Considerando a restrição de uso, sempre que houver pedidos de registro de fungos do gênero *Coniferiporia* é preciso assegurar que não se trate, especificamente, da espécie *C. weiri*. Para essa identificação no nível de espécie sugere-se utilizar a metodologia apresentada no trabalho de Zhou e colaboradores (2016), que buscou analisar a taxonomia e filogenia de mais de 90 espécies da ordem

Hymenochaetales, incluindo, dentre elas, *C. weiri*. e outras espécies do gênero *Coniferiporia*. Para essa análise foram realizadas reações de PCR convencional para amplificar fragmentos da região ITS, utilizando-se os primers ITS5 e ITS4, e da maior subunidade do RNA ribossomal (LSU), com o uso dos primers LR0R e LR7. Os primers descritos podem ser visualizados na Tabela abaixo.

Gene/região	Sequências dos primers (forward/reverse)	Referências
ITS	ITS5: 5' - GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG - 3' ITS4: 5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'	White et al., 1990
LSU	LR0R: 5' – ACSCGCTGAACCTAACGC – 3' LR7: 5' – TACTACCACCAAGATCT – 3'	Moncalvo et al. 1993; Vilgalys & Hester 1990

### Referências Bibliográficas:

- Jeger, M... (2018). Pest categorisation of *Coniferiporia sulphurascens* and *Coniferiporia weiri*. *ej EFSA Journal*, 16(6), 5302.
- Harrington, C. A., & Thies, W. G. (2007). Laminated root rot and fumigant injection affect survival and growth of Douglas-Fir. *Western Journal of Applied Forestry*, 22(3), 220-227.
- Moncalvo, J.-M., Wang, H.-H., and Hsue, R.-S. 1995. Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia*, 87: 223–238
- Vieira, L. D. N. (2017). Estrutura e evolução do genoma plastidial em Araucariaceae Henkel & W. Hochst. e Podocarpaceae Endl.
- Vilgalys, R., & Hester, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of bacteriology*, 172(8), 4238-4246.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.
- Zhou, L. W., Vlasák, J., & Dai, Y. C. (2016). Taxonomy and phylogeny of *Phellinidium* (Hymenochaetales, Basidiomycota): a redefinition and the segregation of *Coniferiporia* gen. nov. for forest pathogens. *Fungal Biology*, 120(8), 988-1001.

## **II.A4. *Crumenulopsis sororia***

### **Classificação taxonômica:**

Reino: Fungi  
Fil: Ascomycota  
Classe: Leotiomycetes  
Ordem: Helotiales  
Família: Cenangiaceae  
Gênero: *Crumenulopsis*  
Espécie: *Crumenulopsis sororia*

### **Motivo da inclusão na lista:**

*Crumenulopsis sororia* é considerado um patógeno necrofítico, que afeta ramos e caules de várias espécies de *Pinus*, principalmente pinheiros escoceses (*Pinus sylvestres*), sendo *Digitosporium piniphilum* sua forma anamórfica (Ennos e McConnell, 2003; CABI, 2021). Esse fungo geralmente invade o sistema vascular das plantas através de pequenas feridas e a infecção leva à destruição do tecido do hospedeiro, gerando um cancro na casca e madeira das árvores. Adicionalmente, há a produção de resina, que aumenta gradualmente até a saturação, internamente ocorre a necrose do câmbio e pode haver também formação de coloração preta na madeira e casca da árvore afetada, dependendo da espécie arbórea, devido à produção de um pigmento preto pelo patógeno, o que facilita a identificação da doença. Os caules e ramos das árvores afetadas podem ficar achatados na área do cancro e serem circundados por vários outros cancros, de modo que as árvores se tornam atrofiadas e muitas vezes morrem (Ennos e McConnell, 2003; CABI, 2021). *C. sororia* era considerado endêmico da Escócia, mas na verdade sua presença também foi identificada em outros países europeus como Dinamarca, Estônia, Finlândia, França, Alemanha, Holanda, Rússia, Eslováquia e o Reino Unido (CABI, 2021). Sabe-se que ele também infecta espécies nativas e/ou introduzidas de *Pinus* na Europa e na América do Norte, além disso, acredita-se que sua não identificação em outros países com condições climáticas favoráveis, tais como clima temperado, baixa pluviosidade e alta umidade do solo, pode ser atribuída à dificuldade de distingui-lo de fungos relacionados, como a espécie *C. pinicola* (Groves, 1969; CABI, 2021). A infecção e disseminação de *C. sororia* ocorre através de ascósporos, que são liberados por apotecios em condições úmidas, os quais são transportados a longas distâncias principalmente através do ar e, posteriormente, germinarão na casca dos brotos das coníferas hospedeiras, dando origem aos micélios haplóides que reiniciarão o ciclo da doença (Hayes, 1975). O fungo possui características de invasividade além da facilidade de disseminação, tais como pequeno tamanho, alto potencial reprodutivo e dificuldade de controle (CABI, 2021). Adicionalmente, causa grave prejuízo econômico, pois mesmo quando não leva à morte da árvore, pode tornar sua madeira inutilizável. No Brasil não há a presença do patógeno, mas além de ser possível encontrar plantações de pinheiros em algumas regiões, há algumas espécies de pinheiros nativos da família Araucariaceae, como *Araucaria angustifolia*, o que torna a introdução desse fungo invasivo ainda mais preocupante.

### **Método de identificação:**

Devido à restrição de utilização da espécie *C. sororia*, sempre que houver pedidos de registro de fungos do gênero *Crumenulopsis* é preciso garantir que não se trate dessa espécie em questão. Para realizar essa confirmação, sugere-se utilizar, com algumas adaptações, a metodologia utilizada no trabalho de

Partel e colaboradores (2016), que estudou *Encoelia*, que é outro gênero da ordem Helotiales, buscando sua melhor reclassificação e posicionamento filogenético, mas para tal sequenciou mais de 70 espécies de diferentes famílias, espécies e gêneros pertencentes a essa ordem, inclusive *C. sororia*. Para o estudo foram utilizados o sequenciamento de fragmentos dos genes que codificam a região ITS, o rRNA 28s (LSU), rRNA 18s (SLU), fator de elongação 1-alfa (tef1), RNA polimerase II subunidade RPB1 (rpb1) e RNA polimerase II subunidade RPB2 (rpb2), mas com o uso de diversos *primers* distintos para algumas dessas regiões. Entretanto, apenas a região ITS e os genes LSU e rpb2 puderam ser amplificados para *C. sororia*. Dessa maneira, sugere-se manter o sequenciamento desses mesmos genes, porém com a utilização de um único *primer* para cada região, considerando tanto os dados obtidos no trabalho quanto em outros trabalhos que utilizaram o sequenciamento dessas regiões. Os *primers* sugeridos se encontram descritos na Tabela abaixo:

<b>Gene/região</b>	<b>Sequências dos <i>primers</i> (forward/reverse)</b>	<b>Referências</b>
<i>ITS</i>	ITS5: 5' – GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG -3' ITS4: 5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3'	White et al. 1990
<i>LSU</i>	LR0R: 5' – ACCCGCTGAACTTAACGC – 3' LR7: 5' – TACTACCACCAAGATCT – 3'	Moncalvo et al. 1993; Vilgalys and Hester 1990
rpb2	RPB2-5F: 5' – GAYGAYMGWGATCAYTTYGG – 3' RPB2-7cR: 5' – CCCATRGCTTGYTTRCCCAT – 3'	Liu et al. 1999

### Referências Bibliográficas:

CABI (2021). Datasheet: *Crumenulopsis sororia*. Disponível em <https://www.cabi.org/isc/datasheet/16278>. Acesso em: 27 de fevereiro de 2021.

Ennos, R. A., & McConnell, K. C. (2003). Variation in host resistance and pathogen selective value in the interaction between *Pinus sylvestris* and the fungus *Crumenulopsis sororia*. *Heredity*, 91(3), 193-201.

Groves, J. W. (1969). *Crumenulopsis*, a new name to replace *Crumenularehm*. *Canadian Journal of Botany*, 47(1), 47-51.

Hayes, A. J., & Ahmad, A. M. (1975). Cultural characteristics of *Crumenula sororia*. *Transactions of the British Mycological Society*, 65(3), 403-412.

Liu, Y. J., Whelen, S., & Hall, B. D. (1999). Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular biology and evolution*, 16(12), 1799-1808.

Moncalvo, J.-M., Wang, H.-H., and Hsieh, R.-S. 1995. Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia*, 87: 223–238

Pärtel, K., Baral, H. O., Tamm, H., & Pöldmaa, K. (2017). Evidence for the polyphyly of Encoelia and Encoelioideae with reconsideration of respective families in Leotiomycetes. *Fungal Diversity*, 82(1), 183-219.

Vilgalys, R., and Hester, M. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*, 172: 4238–4246

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.

## **II.A5. *Didymascella thujina***

### **Classificação taxonômica:**

Reino: Fungi  
Filo: Ascomycota  
Classe: Leotiomycetes  
Ordem: Heliotiales  
Família: Cenangiaceae  
Gênero: *Didymascella*  
Espécie: *Didymascella thujina*

### **Motivo da inclusão na lista:**

*Didymascella thujina* é um fungo biotrófico patogênico que causa a ferrugem das folhas do cedro, infectando algumas espécies do gênero *Thuja*, como *T. occidentalis* e, principalmente, *T. plicata*, uma conífera conhecida como Cedro Vermelho Ocidental, nativa do oeste da América do Norte (Aldana, 2018; Fan et al., 2008; CABI, 2021). A doença é considerada atualmente a mais importante em mudas de cedros e embora todas as idades de plantas possam ser afetadas pelo fungo, ele infecta principalmente plantas jovens, tendo alta fatalidade em viveiros (Trotter et al., 1996; CABI, 2021). A infecção ocorre através da penetração direta de *D. thujina* nas folhas de *T. plicata*, ocorrendo o crescimento dos micélios intercelulares que penetram nas células e se desenvolvem em haustórios. Os primeiros sintomas aparecem como vários pequenos pontos de cor creme na superfície superior de cada folha de cedro e à medida que a infecção progride essas manchas, posteriormente, se desenvolvem em lesões que se aglutanam fazendo com que toda a folha se torne marrom (Aldana, 2018; CABI, 2021). Esse fungo só tem registro de ocorrência, até o momento, nos EUA e Canadá, além de alguns países na Europa, tais como Áustria, Bélgica, Dinamarca, França, Itália, Polônia, Espanha, Reino Unido, regiões nas quais causou graves prejuízos econômicos (Fernandez-Magan, 1974; Trotter et al., 1996; CABI, 2021). A disseminação de *D. thujina* ocorre principalmente por meio da dispersão a longas distâncias dos seus ascósporos pelo vento, os quais possuem superfície lisa, mas quando liberado se torna verrugosa, pois libera uma matriz extracelular que o adere ao hospedeiro (Kope, 2000). *D. thujina* é considerado um fungo que possui características de invasividade, dentre as quais a alta taxa de reprodução e disseminação de esporos, os quais continuam viáveis por até 5 meses após hibernação a temperaturas de 5°C (Pawsey, 1960). Além disso, existe o risco da doença das folhas do cedro ser capaz de se estabelecer onde quer que as espécies de *Thuja* estejam presentes. No Brasil ainda não há relatos da presença de *D. thujina* e não possuímos representantes nativos de espécies do gênero *Thuja*, mas possuímos representantes nativos de espécies de cedros do gênero *Cedrela*, como o cedro-rosa (Xavier et al., 2003). Como não se pode garantir ainda totalmente o potencial infectivo do fungo, essas espécies poderiam ser ameaçadas pela sua introdução, motivo pelo qual considera-se importante avaliar cautelosamente sua utilização.

### **Método de identificação:**

Considerando as restrições de uso da espécie *D. thujina*, quando houver pedidos de registro e utilização de fungos do gênero *Didymascella*, é necessário realizar a precisa identificação para garantir que não se trata, especificamente, da espécie *D. thujina*. Além de *D. thujina*, existem outras 4 espécies no gênero *Didymascella* e apesar de serem fungos relativamente bem estudados, há uma escassez muito grande de estudos moleculares a respeito do gênero e, inclusive, considerando todo o gênero, só há

uma sequência gênica da espécie depositada no GenBank e que se trata de uma submissão direta. Dessa maneira, a identificação molecular da espécie é muito dificultada. Por isso, sugere-se que nessa situação, em um primeiro momento, sempre que houver pedidos de registro de fungos que pertençam à família Cenangiaceae, sejam utilizados métodos moleculares de identificação aplicados para gêneros em geral dessa família para confirmar que o isolado não pertença ao gênero *Didymascella*. Para essa identificação, sugere-se utilizar metodologia descrita no trabalho de Kowalski e colaboradores (2018), que realizaram análises moleculares filogenéticas de fragmentos da região ITS, do gene que codifica o rRNA 28S (LSU) e de regiões intergênicas (IGS) de gêneros dessa e de outras famílias próximas. Os primers utilizados no trabalho são apresentados na tabela abaixo. Caso haja identificação positiva e sem ambiguidades com outros gêneros da família, o uso do microrganismo fica garantido. Entretanto, caso não seja possível excluir com confiabilidade a possibilidade do isolado pertencer ao gênero *Didymascella* e à espécie *D. thujina*, características morfológicas do microrganismo devem ser apresentadas para confirmar que não se trata dessa espécie.

Dentre as características apresentadas é fundamental estarem contempladas informações do asco, ascocarpo, apotécio, ascósporos e hifas. Sugere-se utilizar com base para a comparação dessas estruturas as informações presentes no trabalho de Kope (2000). Caso essas informações não sejam apresentadas o uso do microrganismo fica negado.

Gene/região	Sequências dos primers (forward/reverse)	Referência
ITS	ITS1F: 5' - CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA - 3' ITS4: 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'	Gardes & Bruns 1993; White et al. 1990
LSU	LR0R: 5' - ACCCGCTGAACCTAACGC - 3' LR5: 5' - ATCCTGAGGGAAACTTC - 3'	Vilgalys & Hester 1990
IGS	IGS-12a: 5' - AGTCTGTGGATTAGTGGCCG - 3' NS1R: 5' - GAGACAAGCATATGACTAC - 3'	Carbone & Kohn, 1999

### Referências Bibliográficas:

Aldana, J. A. (2018). Resistance mechanisms to *Didymascella thujina* (Durand) Maire in *Thuja plicata* Donn ex D. Don, *Thuja standishii* (Gord.) Carrière and *Thuja standishii* x *plicata* (Doctoral dissertation).

CABI (2021). Datasheet: *Didymascella thujina*. Disponível em <https://www.cabi.org/isc/datasheet/18896> Acesso em 28 de fevereiro de 2021.

Carbone, I., & Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91(3), 553-556.

Chen, C. H., Hsieh, S. Y., Yeh, Y. H., & Kirschner, R. (2020). *Cladocillium musae*, a new genus and species of cercosporoid fungi (Mycosphaerellaceae) on wild banana in Taiwan. *Mycological Progress*, 19(9), 837-843.

Fan, S., Grossnickle, S. C., & Russell, J. H. (2008). Morphological and physiological variation in western redcedar (*Thuja plicata*) populations under contrasting soil water conditions. *Trees*, 22(5), 671-683.

Fernandez, M. (1974). New attacks on Thuja trees in Galician nurseries. *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Recursos Naturales*, (1), 187-199.

Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2(2), 113–118.

Kope, H. H. (2000). *Didymascella thujina*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 22(4), 407-409.

Kowalski, T., Boroń, P., Bartnik, C., & Rossa, R. (2018). Morphological and molecular characterization of *Leptomelanconium allescheri* associated with necrotic lesions on *Pinus mugo* needles in the Polish Tatra Mountains. *Forest Pathology*, 48(3), e12420.

Kurtzman, C. P., & Robnett, C. J. (1997). Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5'end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *Journal of clinical microbiology*, 35(5), 1216-1223.

Trotter, D., Shrimpton, G., & Kope, H. H. (1996). The Effects of Keithia Blight on Outplanting Performance of Western Redcedar Container Seedlings at Two Reforestation Sites in British Columbia--Preliminary Results. In *Forest and Conservation Nursery Associations: 1994 National Proceedings* (p. 196). DIANE Publishing.

Vilgalys, R. & M. Hester. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172: 4238-4246.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.

Xavier, A., Santos, G. A. D., & Oliveira, M. L. D. (2003). Enraizamento de miniestaca caulinar e foliar na propagação vegetativa de cedro-rosa (*Cedrela fissilis* Vell.). *Revista Árvore*, 27(3), 351-356.

## **II.A6. *Fusicladium effusum***

### **Classificação taxonômica:**

Reino: Fungi  
Filho: Ascomycota  
Classe: Dothideomycetes  
Ordem: Venturiales  
Família: Venturiaceae  
Gênero: *Fusicladium*  
Espécie: *Fusicladium effusum*

### **Motivo da inclusão na lista:**

*Fusicladium effusum*, (sinônimo de *Venturia effusa*) é o fungo agente causador da principal doença que atinge principalmente árvores da noqueira-pecã (*Carya illinoinensis*), mas também outras espécies do mesmo gênero, e que é chamada de sarna da noqueira-pecã (de Souza et al., 2019). Em condições ambientais favoráveis para que o fungo complete seu ciclo de vida, geralmente associadas com altas umidades, a infecção por este fungo causa lesões em brotos, folhas e frutos, essas lesões vão da cor cinza-escuro até o preto e geralmente se expandem até cobrir todo o órgão, resultando em perda de área fotossintética. Desfolhamento e queda de nozes podem ocorrer se a infecção for grave e na fruta, o prejuízo econômico é maior porque essa doença causa a redução do tamanho da noz, devido ao baixo enchimento do grão e, adicionalmente, também pode levar à redução da frutificação no ano seguinte devido ao estresse das plantas. (Gottwald & Bertrand, 1983). A sarna da noqueira-pecã é uma doença policíclica, com menos de 7 a 9 dias entre infecção e esporulação, permitindo que epidemias se desenvolvam rapidamente (Bock et al., 2016). O fungo é introduzido em novas áreas por meio do movimento de material do hospedeiro infectado e os conídios são dispersos pelo vento ou por respingos de chuva. O primeiro relato da doença foi em 1885 nos EUA e atualmente esse patógeno se apresenta bem distribuído ao redor do planeta, com registros da sua ocorrência na África, principalmente África do Sul; América do Norte: Canadá, México, Estados Unidos; América do Sul: Argentina, Paraguai e Brasil, além da Nova Zelândia (Oceania). A doença causada por *F. effusum* pode resultar em perdas econômicas severas em cultivares suscetíveis e danos resultantes para a indústria da noz-pecã, o que é agravado pelas características do fungo, que é considerado invasivo tanto dentro quanto fora de sua área nativa (Bock et al., 2016; CABI, 2021). No Brasil, apesar de não haver hospedeiros nativos do fungo, a maior preocupação é com as áreas plantadas da noqueira-pecã na região Sul (de Souza et al., 2019) e dado que folhas ou caules infectados podem carregar o patógeno, aumentando a chance de que materiais infectados em viveiros possam ser usados em vários locais, torna-se necessário o controle da disseminação do fungo para se evitar maiores desequilíbrios ecológicos e econômicos.

### **Método de identificação:**

Diante da restrição de uso, quando houver pedidos de registro de fungos do gênero *Fusicladium sp.* é necessário confirmar se não se trata da espécie *F. effusum*. Para essa confirmação, sugere-se utilizar a abordagem baseada no trabalho descrito por Seyran e colaboradores (2010) no qual o uso da PCR convencional, seguido de sequenciamento e análise filogenética, mostrou-se eficiente para identificar a referida espécie, assim como para posicioná-la em relação a outros membros relacionados da família Venturiaceae. Para essa identificação foram utilizados os primers Cytbf e Cytbr desenvolvidos a partir de sequências do Citocromo B, os quais podem ser visualizados na tabela abaixo.

<b>Primers</b>	<b>Sequências</b>
Cytbf	5'- CCTTTGTATTAGCDGCWTAG-3'
Cytbr	5'- GGAGTTGCATAGGRTTWGC - 3'

**Referências Bibliográficas:**

Bock, C. H., Chen, C., Yu, F., Stevenson, K. L., & Wood, B. W. (2016). Draft genome sequence of *Fusicladium effusum*, cause of pecan scab. *Standards in genomic sciences*, 11(1), 1-7.

CABI (2021). Datasheet: *Fusicladium effusum*. Disponível em <https://www.cabi.org/isc/datasheet/13719> Acesso em 21 de fevereiro de 2021.

de Souza, R.S., Marco, R.D., Lima, A.D.V., da Silva, G.F., Farias, P.D.M. and Martins, C., 2019. Incidência de sarna na coleção de trabalho de nogueira-pecã conduzida em sistema de produção orgânica. In *Embrapa Clima Temperado-Artigo em anais de congresso (ALICE)*. In: SIMPÓSIO SUL-AMERICANO DA NOZ-PECÃ, 2., 2019, Cachoeira do Sul. Anais. Brasília, DF: Embrapa, 2019. 119 p. Carlos Roberto Martins, Editor técnico (CPACT). p. 98-101.

Gottwald TR, Bertrand PF. on Pecan Scab Development and Nut Quality. *Phytopathology*. 1983 Jan 1;73:714-8.

Seyran, M., Nischwitz, C., Lewis, K. J., Gitaitis, R. D., Brenneman, T. B., & Stevenson, K. L. (2010). Phylogeny of the pecan scab fungus *Fusicladium effusum* G. Winter based on the cytochrome b gene sequence. *Mycological progress*, 9(2), 305-308.

## **II.A7. *Geosmithia morbida***

### **Classificação taxonômica:**

Reino: Fungi  
Fil: Ascomycota  
Classe: Sordariomycetes  
Ordem: Hypocreale  
Família: Bionectriaceae  
Gênero: *Geosmithia*  
Espécie: *Geosmithia morbida*

### **Motivo da inclusão na lista:**

*Geosmithia morbida* é o agente causador da praga conhecida como doença de mil cânceres, que acomete muitas espécies de dois gêneros de árvores produtoras de nozes pertencentes à família Juglandaceae (*Juglans* e *Pterocarya*). O nome dessa doença se dá por causa dos vários cânceres que o fungo causa em ramos e caules dessas plantas (Tisserat et al., 2009; Hishinuma et al., 2016). A doença foi relatada pela primeira vez nos estados do oeste dos EUA na década de 1990, mas não foi oficialmente documentada até 2009 (Tisserat et al., 2009). O fungo é transmitido às plantas mediante a ação do besouro do galho da noz (*Pityophthorus juglandis*) e, possivelmente, de outras espécies. O besouro carrega esporos dos fungos que são introduzidos na árvore durante a construção da galeria (CABI, 2021). Nos estágios iniciais da doença, as árvores apresentam pequenos cânceres que se desenvolvem ao redor de galhos, galhas e até mesmo no tronco das árvores. Os cânceres somente ficam visíveis após a perda de uma fina camada de casca externa, podendo ainda não exibir nenhuma aparência externa na casca, observando-se apenas os pequenos orifícios de entrada do besouro. Rachaduras na casca às vezes se formam também perto das galerias em galhos de pequeno diâmetro, dando-lhes uma aparência áspera e um tanto irregular. Esses cânceres formados interrompem o fluxo de nutrientes pela árvore e à medida que a doença progride, ocorre o desbaste geral das copas e até mesmo a morte das árvores, que pode ocorrer ao longo de 2-3 anos (Tisserat et al., 2009; CABI, 2021). A doença causa perdas econômicas, impactos sociais, além da disseminação do fungo poder ter impactos significativos nas florestas, reduzindo a riqueza de espécies e a disponibilidade de forragem para a vida selvagem (Daniels et al., 2016). Adicionalmente, *G. morbida* é um fungo considerado invasivo inclusive fora de sua área nativa e possui características favoráveis à sua disseminação tais como ser altamente adaptável a diferentes ambientes, ser altamente móvel localmente, generalista e que possui alta variabilidade genética, difícil de detectar, controlar e altamente provável de ser transportado internacionalmente (CABI, 2021). Atualmente, essa doença tem sido detectada em várias regiões dos Estados Unidos e, na Europa, apenas na Itália (CABI, 2021). No Brasil, não se têm registros desse patógeno e nem espécies nativas dos gêneros sabidamente afetados pelas plantas, contudo existem áreas plantadas de nogueiras, especialmente na região Sul (Boscardin & Costa, 2018), o que alerta para a necessidade de controle da introdução desse patógeno no nosso país para se evitar desequilíbrios ambientais e também econômicos, considerando seu potencial de invasibilidade.

### **Método de identificação:**

Tendo em vista o exposto, quando houver pedidos de registro de fungos do gênero *Geosmithia* sp., é necessário confirmar que não se trata da espécie com restrições de uso, *G. morbida*. Para essa confirmação, sugere-se utilizar a abordagem baseada no trabalho descrito por Moore e colaboradores (2019) no qual o uso da PCR convencional, seguido de sequenciamento e análise filogenética, mostrou-se eficiente para identificar a espécie. Foram utilizados os primers GmF3 e GmR13, que foram desenvolvidos especificamente para a espécie em questão visando amplificar fragmentos do gene que codifica a β-tubulina (TUB).

Gene/região	Sequências dos primers (forward/reverse)	Referências
TUB	GmF3: 5' - CAGGCGAGGAGAACGAGAA - 3' GmR13: 5' - GAGTCAGTGTTCTGACCGCA - 3	Moore et al., 2019

### **Referências Bibliográficas:**

Boscardin, J., & Costa, E. C. (2018). A nogueira-peçã no Brasil: uma revisão entomológica. *Ciência Florestal*, 28(1), 456-468.

CABI (2021) Dataset: *Geosmithia morbida*. Disponível em <https://www.cabi.org/isc/datasheet/117952>  
Acesso em 21 de fevereiro de 2021.

Daniels, D. A., Nix, K. A., Wadl, P. A., Vito, L. M., Wiggins, G. J., Windham, M. T., ... & Hadziabdic, D. (2016). Thousand cankers disease complex: a forest health issue that threatens Juglans species across the US. *Forests*, 7(11), 260.

Hishinuma, S. M., Dallara, P. L., Yaghmour, M. A., Zerillo, M. M., Parker, C. M., Roubtsova, T. V., ... & Seybold, S. J. (2016). Wingnut (Juglandaceae) as a new generic host for *Pityophthorus juglandis* (Coleoptera: Curculionidae) and the thousand cankers disease pathogen, *Geosmithia morbida* (Ascomycota: Hypocreales). *The Canadian Entomologist*. 148 (1): 83-91., 148(1), 83-91.

Moore, M., Juzwik, J., Miller, F., Roberts, L., & Ginzel, M. D. (2019). Detection of *Geosmithia morbida* on numerous insect species in four eastern States. *Plant Health Progress*, 20(3), 133-139.

Tisserat, N., Cranshaw, W., Leatherman, D., Utley, C., & Alexander, K. (2009). Black walnut mortality in Colorado caused by the walnut twig beetle and thousand cankers disease. *Plant Health Progress*, 10(1), 10.

## **II.A8. *Gremmeniella abietina***

### **Classificação taxonômica:**

Reino: Fungi  
Filo: Ascomycota  
Classe: Leotiomycetes  
Ordem: Helotiales  
Família: Drepanopezizaceae  
Gênero: *Gremmeniella*  
Espécie: *Gremmeniella abietina*

### **Motivo da inclusão na lista:**

*Gremmeniella abietina* é o agente causador da doença de Brunchorstia, que é uma doença que infecta florestas de coníferas, causando cancro do caule e morte de rebentos (Hellgren & Barklund, 1992). A infecção de *G. abietina* pode ser detectada de várias maneiras. Os sintomas dessa doença são vários, desde o tecido vascular morto das agulhas dos brotos infectados, até a ferrugem dos rebentos que ocorre após o tempo de alongamento normal dos rebentos. Além disso, podem ocorrer bases típicas de agulhas marrom-avermelhadas, estendendo-se gradualmente até a ponta, seguido de moldagem por agulha como resultado da morte desses brotos. O sintoma da ferrugem dos rebentos está geralmente concentrado nas partes inferiores da copa, onde ocorre morte e distorção dos galhos terminais, o que ocasionalmente leva à morte da árvore (Santamaría et al., 2003; Cabi, 2021). Esse patógeno está amplamente disseminado na Europa com aproximadamente 30 países registrando contaminação. Na Ásia esse patógeno também foi relatado na Geórgia, Japão e Coréia do Sul e na América do Norte também tem sido relatada no Canadá e nos Estados Unidos (Cabi, 2021). No Brasil não se tem registros ainda desse patógeno. Contudo, visto que o Brasil tem coníferas, embora em menor quantidade que países temperados, o fato de termos possíveis plantas susceptíveis reforça o alerta para o controle da introdução desse fungo.

### **Método de identificação:**

Quando houver pedidos de registro de fungos do gênero *Gremmeniella* sp., é necessário confirmar se eles não se tratam da espécie *G. abietina*. Para essa confirmação, sugere-se utilizar a abordagem descrita no trabalho de Zeng e colaboradores (2005), o qual desenvolveu um método baseado em nested-PCR a partir da amplificação de regiões específicas para essa espécie usandodois conjuntos de *primers* desenhados para o gene que codifica o rRNA 18S (SSU). Nessa abordagem primeiramente são utilizados*primers* universais para essa região, NS1 e NS2, como forma de enriquecer esses amplicons e, sem seguida, são utilizados os dois conjuntos de *primers* específicos, NS.Grem3 e NS.Grem5; NS.Grem4 e NS.Grem6. Como forma de aumentar a confiabilidade e robustez da identificação sugere-se que todos os amplicons gerados sejam sequenciados e analisados filogeneticamente e não apenas o produto final. Os *primers* utilizados podem ser visualizados na tabela abaixo.

<b>Gene/região</b>	<b>Sequências dos primers (forward/reverse)</b>	<b>Referências</b>
SSU	NS1: 5'- GTAGTCATATGCTTGTCTC - 3' NS2: 5'- CTTCCGTCAATTCCCTTAAG - 3'	White et al. (1990)
Iniciadores específicos para a espécie <i>G. abietina</i>	NS.Grem3: 5'- AACCTTGAACCTGGTGGTT - 3' NS.Grem5: 5'- CACTGATCCGACCGGGT - 3' NS.Grem4: 5'-TGGTGGAGTGTGCCACT - 3' NS.Grem6: 5'- CCTTTCGGACAAGGAAGG - 3'	Zeng et al. (2005)

**Referências bibliográficas:**

CABI Dataset: *Gremmeniella abietina* (*Brunchorstia disease*). Disponível em:  
<https://www.cabi.org/isc/datasheet/25892> Acesso em: 5 de março de 2021

Hellgren, M., & Barklund, P. (1992). Studies of the life cycle of *Gremmeniella abietina* on Scots pine in southern Sweden. *European Journal of Forest Pathology*, 22(5), 300-311.

Santamaria, O., Pajares, J. A., & Diez, J. J. (2003). First report of *Gremmeniella abietina* on *Pinus halepensis* in Spain. *Plant Pathology*, 52(3).<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20033102496>.

Zeng, Q. Y., Hansson, P., & Wang, X. R. (2005). Specific and sensitive detection of the conifer pathogen *Gremmeniella abietina* by nested PCR. *BMC microbiology*, 5(1), 1-9.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocols: A guide to methods and applications Edited by: InnisMA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ. San Diego, Academic Press:315-322.

## **II.A9. *Lachnellula willkommii***

### **Classificação taxonômica:**

Reino: Fungi  
Fil: Ascomycota  
Classe: Leotiomycetes  
Ordem: Helotiales  
Família: Lachnaceae  
Gênero: *Lachnellula*  
Espécie: *Lachnellula willkommii*

### **Motivo da inclusão na lista:**

*Lachnellula willkommii* é um fungo fitopatógeno que causa o cancro do Lariço europeu. Tem sua origem no Japão, mas se estabeleceu na Europa, onde se tornou conhecido devido aos seus danos às plantações de espécies exóticas e nativas a partir do século XIX. Ele ataca e se espalha entre os vários tipos de *Larix*, da família Pinaceae, uma vez introduzido e é considerado o patógeno mais destrutivo desse gênero (Giroux & Bilodeau, 2020). Entretanto, existem relatos da presença e infecção do fungo em outros gêneros botânicos, como membros de *Abies*, *Pinus* e *Pseudotsuga* spp. Foi detectado como invasor na América do Norte em duas ocasiões; uma vez no nordeste dos EUA na década de 1920 e uma vez nas províncias marítimas orientais do Canadá na década de 1980. (CABI, 2020). A disseminação local do fungo entre as árvores parece depender da disseminação e sobrevivência dos ascósporos transportados pelo ar (Ostaff, 1985). Os sintomas causados por *L. willkommii* incluem a morte da casca em crescimento, resultando em inchaços nos galhos menores e cânceres afundados nos caules maiores. A casca quebra, se solta e é possível observar um processo resinoso. Então, uma crista de madeira se desenvolve ao redor de cancros crescentes nos ramos e troncos conforme a árvore se desenvolve. Acima do cancro, as folhas ficam amarelas ou murcham e morrem cedo. Se o tronco for cingido, galhos e árvores jovens morrerão (Sinclair & Lyon, 2005). *L. willkommii* está presente na Ásia, América do Norte e é amplamente distribuído na Europa (CABI, 2020). O patógeno afeta significativamente a população de espécies suscetíveis, causando prejuízos econômicos e desequilíbrios ambientais, além de ser considerada uma espécie invasiva tanto dentro quanto fora da sua área nativa (CABI, 2020). Inclusive é regulamentado como uma praga de quarentena na Europa, Canadá e EUA (Giroux & Bilodeau, 2020). Não foram encontrados relatos da ocorrência de casos no Brasil. Todavia, ressalta-se que este fungo pode trazer um potencial risco de infecção em espécies de coníferas silvestres brasileiras caso seja introduzido no país. Desta forma, devido a possibilidade de impactos ambientais em caso de introdução e dada sua conhecida capacidade de invasibilidade, recomenda-se a uma avaliação minuciosa antes da aprovação para uso de *L. willkommii*.

### **Método de identificação:**

Devido à restrição de uso, para registros de espécies do gênero *Lachnellula* é necessário garantir que o fungo não seja da espécie *L. willkommii*. Segundo a USDA (2010), *L. willkommii* e *L. occidentalis* são morfologicamente semelhantes, e, sua diferenciação é muito importante, visto que o primeiro se trata de um fitopatógeno e o segundo de um fungo endofítico natural. Portanto, destaca-se que a análise molecular é de crucial importância para a identificação da espécie. Entretanto, não foram encontrados na literatura trabalhos que testassem ou desenhassem primers capazes de promover essa identificação.

Recentemente, no trabalho de Giroux & Bilodeau, 2020 o sequenciamento do genoma da espécie foi realizado, assim como de outras espécies do gênero, com o objetivo de identificar marcadores moleculares capazes de distingui-lo das outras espécies do gênero, mas os mesmos ainda não foram publicados. Dessa maneira e considerando que em nível de gênero é possível identificar esses fungos utilizando *primers* que amplificam fragmentos da região ITS, e dos genes que codificam o rRNA 28S e a RNA polimerase II, sugere-se, em um primeiro momento, que sempre que houver pedidos de registros de quaisquer outros microrganismos do gênero *Lachnellula*, sejam utilizados métodos moleculares para determinar se eles não pertencem às demais espécies do gênero. Para tal, indica-se utilizar a metodologia descrita no trabalho de Hosoya e colaboradores (2010), que utilizaram esses três marcadores para identificar espécies da família Hyaloscypheaceae, incluindo representantes de *Lachnellula*. Caso haja identificação positiva e sem ambiguidades com outras espécies do gênero, o uso do microrganismo fica garantido. Entretanto, se não for possível excluir com confiabilidade a possibilidade do isolado pertencer a espécie *L. willkommii*, devem ser apresentadas informações de características morfológicas que comprovem que o fungo em questão não se trata dessa espécie. Sugere-se utilizar como base para a apresentação dessas informações, o trabalho de Oguchi (1981), que descreve com riqueza dados para identificação em nível de espécie de *L. willkommii*. Caso essas informações não sejam apresentadas, recomenda-se que a utilização do microrganismo seja negada.

Gene/região	Sequências dos <i>primers</i> (forward/reverse)	Referência
ITS	ITS1F: 5'- CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA - 3' ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	White et al. 1990
LSU	NL1: 5' – GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG – 3' NL4: 5' – GGTCCGTGTTCAAGACGG – 3'	O'Donnell 1993
RPB2	RPB2-P6F: 5' - TGGGGWYTSgtmtgyCCTGC - 3' RPB2-P7R: 5' - CCCATSGCYTGYTTACCCAT - 3'	Liu et al., 1999

### Referências Bibliográficas:

CABI Dataset: *Lachnellula willkommii* (European larch canker) (2020). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/30017>. Acesso em: 19 de fevereiro de 2021.

Giroux, E., & Bilodeau, G. J. (2020). Whole Genome Sequencing Resource of the European Larch Canker Pathogen *Lachnellula willkommii* for Molecular Diagnostic Marker Development. *Phytopathology*, 110(7), 1255-1259.

Hosoya, T., Sasagawa, R., Hosaka, K., Gi-Ho, S., Hirayama, Y., Yamaguchi, K., ... & Kakishima, M. (2010). Molecular phylogenetic studies of *Lachnum* and its allies based on the Japanese material. *Mycoscience*, 51(3), 170-181.

Liu, Y. J., Whelen, S., & Hall, B. D. (1999). Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular biology and evolution*, 16(12), 1799-1808.

Magasi, L.P.; Pond, S.E. (1982). European larch canker: a new disease in Canada and a new North American host record. *Plant Disease*, 66(4):339.

O'Donnell, K.L. (1993). *Fusarium* and its near relatives. In The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics. Edited by D.R. Reynolds and J.W. Taylor. *CAB International*, Wallingford, U.K. pp. 225–233.

Ostaff, D.P. (1985). Age distribution of European larch canker in New Brunswick. *Plant Disease*, 69(9):796-798.

Sinclair, W. A., & Lyon, H. H. (2005). Diseases of trees and shrubs (No. Ed. 2). *Comstock Publishing Associates*.

USDA (2010). Chalkley, D. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. . Invasive Fungi. European Larch canker-*Lachnellula willkommii*. Last Update: 25 October, 2010. Disponível em: <https://nt.ars-grin.gov/taxadescrptions/factsheets/index.cfm?thisapp=Lachnellulawillkommii>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2021.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. e Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. *Academic Press*, San Diego, California. pp 315–322.

Yde-Andersen, A. (1979). Host spectrum, host morphology and geographic distribution of larch canker, *Lachnellula willkommii*. *Forest Pathology*, 9(3-4), 211–219.

## **II.A10. *Leptographium procerum***

### **Classificação taxonômica:**

Reino: Fungi  
Filو: Ascomycota  
Classe: Sordariomycetes  
Ordem: Ophiostomatales  
Família: Ophiostomataceae  
Gênero: *Leptographium*  
Espécie: *Leptographium procerum*

### **Motivo da inclusão na lista:**

*L. procerum* é considerado, na verdade, um complexo de espécies fúngicas da família Ophiostomataceae, do qual fazem parte *L. procerum*, *L. profanum*, *L. sibiricum*, *L. pinidensiflorae*, *L. bhutanense*, *L. sinoprocerum*, *L. gracile* e *L. latens* (Yin et al., 2014). A doença causada pelo complexo é comumente referida como declínio da raiz, ou declínio do pinheiro, mas na maioria dos casos se manifesta como murcha nas folhas (Lackner e Alexander, 1982). Os fungos são associados a besouros e gorgulhos que infestam raízes de pinheiros facilitando sua transmissão (Yin et al., 2014). Os sintomas da doença são semelhantes aos causados pela infestação pelo gorgulho do colo da raiz, com o qual pode ser facilmente confundido (Wingfield, 1983). Um dos primeiros sintomas é a redução do crescimento em altura, seguida de descoloração da coroa. Uma mancha escura pode ser observada nas raízes das árvores doentes, que progride rapidamente para cima. Em infecções graves, é observada exsudação de resina. Os sintomas associados ao declínio da raiz do pinheiro incluem longos períodos de quebra de botões, retardo do alongamento dos brotos, curvatura dos brotos em crescimento, perda de turgescência nas agulhas mais velhas, murchamento das agulhas mais jovens, escurecimento das agulhas e presença de madeira embebida em resina e estriada de preto na base do caule com cancro basal. Além disso, *L. procerum* atua no sistema vascular das plantas, onde corrói as paredes celulares e migra de uma célula para outra através das fossetas. A água no caule é reduzida, levando à dessecação da folhagem e do alburno e, finalmente, à morte prematura (Leininger et al., 1990; Otrosina et al., 1997; Butnor et al., 2000; Yin et al., 2014; CABI, 2020). A presença desses fungos é relatada na Europa e na América do Norte e eles também foram introduzidos na África do Sul e na Nova Zelândia (CABI, 2020). Não foram encontrados relatos de casos no Brasil. Adicionalmente, é considerado um fungo com potencial invasivo (CABI, 2020). Desta forma, dado a essas características e a possibilidade de impactos econômicos e ambientais em caso de introdução, recomenda-se uma avaliação criteriosa para aprovação de utilização desse complexo de espécies.

### **Método de identificação:**

Dada a restrição de utilização ser em nível de espécie, é necessário que quando houver pedidos de registros de fungo do gênero *Leptographium*, seja confirmado que o mesmo não se trate de nenhuma espécie do complexo *L. procerum*. Os principais genes utilizados para a identificação desses fungos, são o gene que codifica o rRNA 28S (LSU) juntamente com porções da região ITS, a beta-tubulina (TUB) e o fator de elongação 1-alfa (TEF). Dentre os trabalhos levantados, indica-se para a identificação dessas espécies, a utilização da abordagem descrita no trabalho de Yin e colaboradores (2014), que utilizou *primers* para amplificar fragmentos desses genes com o objetivo de reavaliar as relações filogenéticas e delineamento de todas as espécies relatadas no complexo, assim como outros

fungos do gênero. Adicionalmente, no trabalho também foram utilizados *primers* para distinguir entre as espécies do complexo, mas como a restrição se estende a todo o complexo *L. procerum*, não há a necessidade de utilização desses *primers* adicionais. Os *primers* utilizados no trabalho e sugeridos podem ser visualizados na Tabela abaixo:

Gene/região	Sequências dos <i>primers</i> (forward/reverse)	Referência
LSU	ITS3: 5' - GCATCGATGAAGAACGCAGC - 3' LR3: 5' - CCGTGTTCAGACGGG - 3'	White et al., 1990
TUB	T10: 5' - ACGATAGGTTCACCTCCAGAC - 3' Bt2b: 5' - AACCTCAGTAGTGACCCCTGGC - 3'	O'Donnell and Cigelnik 1997; Glass & Donaldson 1995
TEF	EF1-F: 5' - TGCGGTGGTATCGACAAGCGT - 3' EF2-R: 5' - AGCATGTTGTCGCCGTTGAAG - 3'	Jacobs et al. 2004

### Referências Bibliográficas:

Butnor, J. R., Seiler, J. R., & Gray, J. A. (1999). Influence of Procerum Root Disease on the Water Relations of Eastern White Pine (*Pinus strobus* L.). *Journal of Sustainable Forestry*, 10(1-2), 95–105.

CABI Dataset: *Leptographium procerum* (white pine root decline)(2020). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/30117#totaxonomicTree>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2021.

Duong, T. A., de Beer, Z. W., Wingfield, B. D., & Wingfield, M. J. (2013). Characterization of the mating-type genes in *Leptographium procerum* and *Leptographium profanum*. *Fungal Biology*, 117(6), 411–421.

Glass, N. L., & Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and environmental microbiology*, 61(4), 1323-1330

Jacobs, K., Bergdahl, D. R., Wingfield, M. J., Halik, S., Seifert, K. A., Bright, D. E., & Wingfield, B. D. (2004). *Leptographium wingfieldii* introduced into North America and found associated with exotic *Tomicus piniperda* and native bark beetles. *Mycological research*, 108(4), 411-418.

Lackner, A.L.; Alexander S.A. (1982). Occurrence and pathogenicity of *Verticiladiella procera* in Christmas tree plantations in Virginia. *Plant Disease*, 66(3):211-212

Leininger, T. D., Winner, W. E., and Alexander, S. A. (1990). Root disease incidence in eastern white pine plantations with and without symptoms of ozone injury in the Coweeta Basin of North Carolina. *Plant Dis.* 74: 552-554.

O'Donnell, K., & Cigelnik, E. (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus fusarium are non-orthologous. *Molecular phylogenetics and evolution*, 7(1), 103-116.

Otrosina, W. J., Hess, N. J., Zarnoch, S. J., Perry, T. J., and Jones, J. P. (1997). Blue-stain fungi associated with roots of southern pine trees attacked by the southern pine beetle, *Dendroctonus frontalis*. *Plant Dis.* 81:942-945.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. e Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. *Academic Press*, San Diego, California. pp 315–322.

Wingfield, M.J. (1983). Association of *Verticiladiella procera* and *Leptographium terrebrantis* with insects in the Lake States. *Canadian Journal of Forest Research*, 13(6):1238-1245.

## **II.A11. *Phyllachora maydis***

### **Classificação taxonômica:**

Reino: Fungi  
Filو: Ascomycota  
Classe: Sordariomycetes  
Ordem: Phyllachorales  
Família: Phyllachoraceae  
Gênero: *Phyllachora*  
Espécie: *Phyllachora maydis*

### **Motivo da inclusão na lista:**

*P. maydis* é um fungo ascomiceto peritecial, conhecido por causar a doença da mancha de alcatrão no milho (Hock et al., 1992; 1995). Este fitopatógeno é membro de um grande gênero de fungos, *Phyllachora*, que causam 'manchas de alcatrão' em gramíneas diversas da família Poaceae (CABI, 2020). Os sintomas iniciais são pequenas manchas amarelo-acastanhadas em cada lado da folha. Um tecido discoide escuro que rodeia os peritécios (clípeo), cobrindo os ascos, circundado por uma estreita borda clorótica, desenvolve-se no local. As manchas são circulares a ovais, às vezes angulares ou irregulares, e podem coalescer para formar listras de até 10 mm de comprimento (Valle-Torres et al., 2020), o que leva a folha a perder área foliar verde. Algumas manchas aumentam ao redor dos ascos, com uma área inicialmente encharcada de água tornando-se necrótica (Bajet et al., 1994); isso é chamado de sintoma de "olho de peixe" (Hock et al., 1992). A infecção apenas por *P. maydis* geralmente causa um baixo nível de necrose. Danos mais graves são observados quando ocorre associação deste fitopatógeno com outro fungo, *Monographella maydis* (Hock et al., 1995). . Porém, este dano é relatado como suficiente para levar a grandes perdas, pois quando as condições favorecem a doença, as folhas podem estar totalmente mortas em 21-30 dias. O fungo se espalha das folhas mais baixas para as folhas superiores, bainhas das folhas e cascas das espigas em desenvolvimento (Bajet et al., 1994). A dispersão deste fungo ocorre pelo transporte de ascósporos feita pelo vento ou respingos da chuva que caem sobre o milho contaminado (CABI, 2021). Este fungo é relatado em partes mais frias e altas do México, América Central (Hock et al., 1995). É considerada espécie introduzida em países da América do Sul e nos EUA (Ruhl et al., 2016). Não foram encontrados relatos de casos no Brasil. Apesar dos relatos de casos serem apenas para cultivares de *Zea mays* (milho) destaca-se que a introdução deste microrganismo é danosa, considerando as perdas econômicas. Dados todos esses fatores, a gravidade da doença causada e da fácil dispersão do fungo após instalação no ambiente recomenda-se a uma avaliação criteriosa da utilização de *P. maydis*.

### **Método de identificação:**

Devido à restrição de uso, quando houverem pedidos de registros de fungos do gênero *Phyllachora*, a identificação em nível de espécie deve ser realizada para garantir que não se trata de *P. maydis*. Diversos trabalhos recentes que buscaram identificar a ocorrência de *P. maydis* em diferentes localizações e plantações conseguiram obter identificação precisa e sem ambiguidades para essa espécie utilizando-se apenas a amplificação de fragmentos da região ITS por meio de PCR convencional (McCoy et al., 2018; McCoy et al., 2019; Malvick et al., 2020). Dessa maneira, sugere-

se utilizar para essa identificação os conjuntos de *primers* e condições utilizadas com êxito por esses autores, os quais podem ser visualizados na Tabela abaixo.

Gene/região	Sequências dos <i>primers</i> (forward/reverse)	Referência
ITS	ITS4: 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3' ITS5: 5' - GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG - 3'	McCoy et al., 2018; Malwick et al., 2020
ITS	ITS1F: 5' - CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA - 3' ITS4: 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'	McCoy et al., 2019; Malwick et al., 2020
ITS	ITS1F: 5' - CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA - 3' ITS4A: 5' - CGCCGTTACTGGGGCAATCCCTG - 3'	McCoy et al., 2018

### Referências Bibliográficas:

Bajet, N.B.; Renfro, B.L.; Valdez, C.J.M. (1994). Control of tar spot of maize and its effect on yield. International Journal of Pest Management, 40(2):121-125. In: *Phyllachora maydis*. Sader-Senasica. Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Ficha técnica. Tecámac, Estado de México, 11 p

CABI Dataset: *Phyllachora maydis* (black spot of maize) (2020). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/40876>. Acesso em: 27 de fevereiro de 2021.

Hock, J.; Dittrich, U.; Renfro, B.L.; Kranz, J. (1992). Sequential development of pathogens in the maize tarspot disease complex. *Mycopathologia*, 117(3):157-161.

Hock, J.; Kranz, J.; Renfro, B.L. (1995). Studies on the epidemiology of the tar spot disease complex of maize in Mexico. *Plant Pathology*, 44(3):490-502.

McCoy, A. G., Romberg, M. K., Zaworski, E. R., Robertson, A. E., Phibbs, A., Hudelson, B. D., ... & Chilvers, M. I. (2018). First report of tar spot on corn (*Zea mays*) caused by *Phyllachora maydis* in Florida, Iowa, Michigan, and Wisconsin. *Plant Disease*, 102(9), 1851.

McCoy, A. G., Roth, M. G., Shay, R., Noel, Z. A., Jayawardana, M. A., Longley, R. W., ... & Chilvers, M. I. (2019). Identification of fungal communities within the tar spot complex of corn in Michigan via next-generation sequencing. *Phytobiomes journal*, 3(3), 235-243.

Malwick, D. K., Plewa, D. E., Lara, D., Kleczewski, N. M., Floyd, C. M., & Arenz, B. E. (2020). First report of tar spot of corn caused by *Phyllachora maydis* in Minnesota. *Plant Disease*, 104(6), 1865-1865.

Ruhl, G., Romberg, M.K., Creswell, T., Wise, K.A. (2016). First Report of Tar Spot on Corn Caused by *Phyllachora maydis* in the United States. *Plant Disease*, 100: 1496.

Valle-Torres, J., Ross, T., Plewa, D. E., Avellaneda, C., Check, J., Chilvers, M. I., *et.al.* (2020). Tar spot: an understudied disease threatening corn production in the Americas. *Plant Disease*. doi:10.1094/pdis-02-20-0449-fe.

## **II.A12. *Podosphaera spiraeae***

### **Classificação taxonômica:**

Reino: Fungi  
Fil: Ascomycota  
Classe: Leotiomycetes  
Ordem: Erysiphales  
Família: Erysiphaceae  
Gênero: *Podosphaera*  
Espécie: *Podosphaera spiraeae*

### **Motivo da inclusão na lista:**

*Podosphaera spiraeae* é um fitopatógeno nativo do Japão que co-evoluiu com seu hospedeiro *Spiraea japonica*, que é uma planta ornamental também nativa do Japão. *P. spiraeae* se espalhou por todo o mundo, provavelmente por meio da indústria de horticultura (CABI, 2020). Apesar dos principais relatos de infecção ocorrerem em espécies de *Spirae*, há relatos de sua ocorrência em espécies de *Aruncus*, ambos da família Rosaceae (Braun et al., 2019). Os sintomas observados após acometimento das plantas são manchas brancas nas superfícies superior e inferior das folhas da planta hospedeira, com crescimento do fungo, podendo levá-las a se enrolar ou dobrar. Os caules gravemente infectados são frequentemente desfigurados e distorcidos. O fungo hiberna como micélios nos botões dormentes ou como casmotécios e infecta os brotos emergentes na primavera. Podem ocorrer áreas necróticas foliares, bem como resultar em planta anã ou com senescência precoce (Piatek, 2004). A dispersão acontece pelo vento através de esporos assexuados, conhecidos como conídios, que se espalham entre as plantas hospedeiras viáveis. O caminho de invasão de longa distância mais provável é através da indústria de viveiros, que comumente comercializa plantas de *Spiraea* (Talgo et al., 2011). São descritos casos na Ásia, Europa, EUA e Austrália (CABI, 2020). Destaca-se que o fitopatógeno é um parasita obrigatório, cujas infecções são favorecidas por climas quentes e úmidos e tendem a sobreviver aos invernos como hifas dentro de botões dormentes. Os brotos emergentes encontram-se fortemente infectados na primavera (Gubler et al., 1999). Não foram encontrados relatos de casos no Brasil. Porém, além de sua reconhecida ação fitopatogênica, a espécie é descrita como invasiva pelo CABI no Compendium de Espécies Invasivas. Por isso, dada a gravidade da doença causada, somada à possibilidade de infecção em representantes da família Rosaceae, e considerando-se a possibilidade de invasividade relatada, recomenda-se uma avaliação criteriosa de utilização desta espécie.

### **Método de identificação:**

Quando houver pedidos de registro de fungos do gênero *Podosphaera* sp., é necessário confirmar se não se trata da espécie *P. spiraeae*. Para tanto, sugere-se utilizar uma abordagem molecular baseada no trabalho descrito por Moparthi e colaboradores (2018) no qual foi realizada PCR convencional, seguida de sequenciamento e análise filogenética. A região do espaçador transcrito interno completo (ITS) e a extremidade 5' da subunidade grande de rRNA contendo D1, D2 e D3 foram amplificadas utilizando os iniciadores ITS1-F e TW14, permitindo amplificação precisa e sem ambiguidade com outras espécies. Os primers utilizados podem ser visualizados na Tabela abaixo.

Gene/região	Sequências dos primers (forward/reverse)	Referência
ITS	ITS1F 5' - CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA - 3' TW14 5'- GCTATCCTGAGGGAACTTC - 3'	Gardes & Bruns (1993) Hamby et al. (1988)

### Referências Bibliográficas:

Braun, U., Preston, C.D., Cook, R.T.A., Götz, M., Takamatsu, S. (2019). *Podosphaera lini* (Ascomycota, Erysiphales) revisited and re-united with Oidium lini. *Plant Pathology & Quarantine*, 9(1), 128–138.

CABI Dataset: *Podosphaera spiraeae* (Japanese spiraea powdery mildew). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/57273799#124bc164-6ee5-419d-838d-0b0e6d4de419>. Acesso em: 02 de março de 2021.

Gardes M, Bruns TD. (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology*. Apr;2(2):113-8.

Gubler, W.D., Rademacher, M.R., Vasquez, S.J. (1999). Control of Powdery Mildew Using the UC.

Davis Powdery Mildew Risk Index. APSnet Feature Articles. Online. doi: 10.1094/APSnetFeature-1999-0199. Disponível: <https://www.apsnet.org/edcenter/apsnetfeatures/Pages/UCDavisRisk.aspx>. Acesso em: 04 de março de 2021.

Hamby RK, Sims L, Issel L, Zimmer E. (1988) Direct ribosomal RNA sequencing: optimization of extraction and sequencing methods for work with higher plants. *Plant Molecular Biology Reporter*. Jun 1;6(3):175-92

Moparthi S, Grove GG, Bradshaw M.(2018) First Report of Powdery Mildew on *Spiraea japonica* Caused by *Podosphaera spiraeae* in the United States. *Plant Disease*. Mar 19;102(3):682. Disponível em<https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-09-17-1419-PDN> Acesso em 01 de março de 2021

Piatek, M. (2004). Miscellaneous Novelties on Powdery Mildew Fungi from Poland. Polish *Botanical Journal*, 49(2): 151–159.

Talgø, V., Sundheim, L., Gjærum, H. B., Herrero, M. L., Suthaparan, A., Toppe, B., Stensvand, A. (2011). Powdery Mildews on Ornamental Trees and Shrubs in Norway. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 5 (1), 86-92.

## **II.A13. *Sphaerulina musiva***

### **Classificação taxonômica:**

Reino: Fungi  
Filo: Ascomycota  
Classe: Dothideomycetes  
Ordem: Mycosphaerellales  
Família: Mycosphaerellaceae  
Gênero: *Sphaerulina*  
Espécie: *Sphaerulina musiva*

### **Motivo da inclusão na lista:**

*S. musiva* (sinônimo de *Septoria musiva*) causa a doença da mancha das folhas e cancro do caule em espécies de álamo. As infecções nas folhas primárias começam logo após o desenvolvimento das folhas na primavera por ascósporos transportados pelo ar, dispersos por pseudotécios que amadurecem nas folhas caídas durante o inverno. A infecção também pode ser causada pela formação de conídios em picnídios de inverno. Lesões foliares se desenvolvem entre 1 e 2 semanas após a infecção e os picnídios são formados após 1 ou 2 semanas adicionais em um ou ambos os lados da lesão. No início da estação, as lesões nas folhas são encontradas em grande número principalmente na folhagem de ramos inferiores, mas mais tarde serão encontrados em toda a coroa. As lesões aumentam rapidamente em tamanho e número durante as condições ambientais favoráveis (Ostry, 1987; Sinclair e Lyon, 2005). Conídios (hialinos, cilíndricos, retos ou ligeiramente curvos, septados variadamente) (EPPO, 2021) são exsudados em massas rosadas durante condições úmidas e são dispersos pela água para infectar folhas novas ou caules (Sinclair e Lyon, 2005). Ascósporos (hialinos, 1-septados) são transportados pelo ar e dispersos em grande número durante o clima quente (22–26°C) e úmido. Tanto ascósporos como conídios estão presentes ao longo da estação de crescimento (Ostry, 1987). Os ascósporos e conídios infectam os caules através de feridas, lenticelas, estípulas ou pecíolos das folhas (EPPO, 2021). Em caules maiores, a madeira é morta na medula formando um cancro distorcido atenuado nas laterais (Sivanesan, 1990). A incidência e a gravidade da doença dependem em grande medida da suscetibilidade do hospedeiro, que varia muito entre as espécies e clones (Callan, 1998; Sinclair e Lyon, 2005), mas não é dependente da idade da árvore (Sivanesan, 1990). Os danos causados por manchas foliares e cancros são mais graves em locais áridos e secos do que em locais amenos e mais úmidos (Hansen et al., 1994). O estresse hídrico também foi observado aumentando o desenvolvimento do cancro em experimentos de inoculação (Maxwell et al., 1997). Este fitopatógeno integra a Lista A1 da EPPO. São descritos relatos de infecção na América do Norte, América do Sul e Europa. Há relatos de sua ocorrência no Brasil. O Álamo é uma espécie florestal plantada no Vale do Rio Iguaçu, nos Municípios de Porto União (SC), Paula Freitas (PR) e União da Vitória (PR), para uso na indústria de fósforos. Apesar de não se tratar de uma espécie nativa, tem grande importância econômica, social e ambiental para a região onde ocorre. Atualmente, a área plantada no país é estimada em 5.000 ha (Santos et al, 2010). Considerando os dados apresentados, torna-se importante o controle de sua disseminação no território brasileiro, uma vez que o patógeno se encontra introduzido, visando evitar o desequilíbrio entre as regiões de cultivo da espécie e as relações ambientais, bem como as relações sociais e econômicas com a comunidade envolvida no plantio e beneficiamento do Álamo. Para tal, recomenda-se a não utilização de *S. musiva*.

### **Método de identificação:**

Considerando a restrição de uso, quando houver pedidos de registro de fungos do gênero *Sphaerulina* sp., é necessário confirmar se não se trata da espécie *S. musiva*. Para tanto, sugere-se utilizar a abordagem descrita no trabalho de Feau e colaboradores (2005), que estudou a variabilidade genética da espécie como forma de projetar *primers* específicos para sua identificação. Neste trabalho, foi feita a PCR convencional, utilizando os *primers* desenhados especificamente para a espécie *S. musiva* a partir do alinhamento de sequências das regiões ITS, 18S e 5.8S de vários isolados dessa espécie, seguido do sequenciamento e análise filogenética dos dados. Os *primers* utilizados no trabalho foram *forward* Smusf e *reverse* Smusr, os quais podem ser visualizados na Tabela abaixo.

Gene/região	Sequências dos <i>primers</i> (foward/reverse)	Referência
Região específica de <i>S. musiva</i>	SMUSF5'- AGA-GAACGTGGCGCCCC - 3' SMUSR5'- CCAGGCTTGAGTGGTTGTACT - 3'	Feau et al. (2005)

### **Referências Bibliográficas:**

Callan, B.E. (1998). Diseases of *Populus* in British Columbia: a diagnostic manual. Canadian Forest Service, Victoria, British Columbia, Canada, 157 pp; *in* EFSA Panel on Plant Health (EFSA PLH Panel): Pest categorisation of *Sphaerulina musiva*. *EFSA Journal*, (2018); 16(4):5247.

EPPO (2021). EPPO Global database, Paris, France: *Sphaerulina musiva* (MYCOPP). Disponível em: <https://gd.eppo.int/taxon/MYCOPP>. Acesso em: 04 de março de 2021.

Feau N, Weiland JE, Stanosz GR *et al.*, 2005. Specific and sensitive PCR-based detection of *Septoria musiva*, *S. populincola* and *S. populi* the causes of leaf spot and stem canker on poplars. *Mycological Research* 109, 1015– 28.

Maxwell, D.L., Kruger, E.L. e Stanosz, G.R. (1997). Effects of water stress on colonization of poplar stems and excised leaf disks by *Septoria musiva*. *Phytopathology*, 87, 381–388; *in* EFSA Panel on Plant Health (EFSA PLH Panel): Pest categorisation of *Sphaerulina musiva*. *EFSA Journal*, (2018); 16(4):5247.

Ostry, M.E. (1987). Biology of *Septoria musiva* and *Marssonina brunnea* in hybrid *Populus* plantations and control of *Septoria* canker in nurseries. *Forest Pathology*, 17, 158–165. *in* EFSA Panel on Plant Health (EFSA PLH Panel): Pest categorisation of *Sphaerulina musiva*. *EFSA Journal*, (2018); 16(4):5247.

Santos, A. F. dos, Machado, E. B., Stanosz, G. R., Smith, D. R. (2010). Primeiro relato da ocorrência de *Septoria musiva* em álamo no Brasil. *Tropical Plant Pathology*, vol. 35, 1, 052-053.

Sinclair, W.A. e Lyon, H.H. (2005). Diseases of trees and shrubs. 2<sup>nd</sup> Edition. Comstock Publishing Associates, adivision of Cornell University Press, Ithaca, NY. 660 pp; *in* EFSA Panel on Plant Health (EFSA PLH Panel): Pest categorisation of *Sphaerulina musiva*. *EFSA Journal*, (2018); 16(4):5247.

Sivanesan, A. (1990). List of sets, index of species, and list of accepted names for some obsolete species names in CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria Sets 1–100, Nos. 1–1000, issued January 1964–March 1990.*Mycopathologia*, 111, 91–108; *in* EFSA Panel on Plant Health (EFSA PLH Panel): Pest categorisation of *Sphaerulina musiva*. *EFSA Journal*, (2018); 16(4):5247.

## **II.A14. *Sporisorium* sp.**

### **Classificação taxonômica:**

Reino: Fungi  
Filo: Basidiomycota  
Classe: Ustilaginomycetes  
Ordem: Ustaginales  
Família: Ustilaginaceae  
Gênero: *Sporisorium*

### **Motivo da inclusão na lista:**

Espécies do gênero *Sporisorium* (primeiramente classificadas como *Ustilago*) são conhecidas por causar a doença da sujeira da cana-de-açúcar. Este fitopatógeno afeta diversas espécies da família Poaceae, do gênero *Saccharum*. O fungo substitui o ovário e a semente das flores individuais por pequenos corpos contendo esporos compactados a pulverulentos, escuros. A disseminação dos esporos deixa a columela ereta, pálida e estreita no centro da flor. O sintoma mais óbvio da infecção é o longo soro em forma de chicote que emerge do ponto de crescimento e frequentemente se estende acima do topo da planta infectada. Também podem ser produzidos a partir de brotos laterais originados de botões. Em grande parte de seu ciclo de vida, no entanto, o fungo é sistêmico na planta e não produz sintomas identificáveis, exceto por uma aparência "gramada" em casos graves (CABI, 2020). Esta aparência resulta da produção de numerosos caules fracos e finos no lugar das habituais canas vigorosas. São relatados casos presentes em cinco continentes (Ásia, África, Europa, Oceania e Américas – do Norte, Central e do Sul). A dispersão natural dos esporos em plantas infectadas é principalmente impulsionada pelo vento (Trione, 1990). A introdução accidental pode ocorrer se esporos estiverem presentes no estoque de plantio vegetativo, sementes verdadeiras importadas para fins de reprodução ou em hastes de *Saccharum* sp. que são comercializados ou usados na construção (CABI, 2020). No Brasil, a presença do fungo causando infecção é relatada no Ceará, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, e São Paulo (Sundar et al., 2012; CABI e EPPO, 2008). Dada a conhecida presença no país, à possível interferência em espécies cultivares e silvestres, levando a uma perda econômica e ambiental, recomenda-se a não utilização de espécies de *Sporisorium*.

### **Método de identificação:**

Devido à restrição de uso se estender a todas as espécies do gênero *Sporisorium*, quando houver pedidos de registro de fungos da família Ustilaginaceae é necessário confirmar se que o isolado não pertence ao gênero *Sporisorium* sp. Dentre os trabalhos levantados, sugere-se utilizar a abordagem descrita no trabalho de Stoll e colaboradores (2005). Neste trabalho, foi feita a PCR convencional, sequenciamento e análise filogenética da região ITS e de fragmentos do gene que codifica o rRNA 28S (LSU). Os primers utilizados foram: M-ITS 1 e ITS4 para a região ITS e NL 1 e NL 4 para a região LSU, os quais podem ser visualizados na Tabela abaixo:

Gene/região	Sequências dos primers (forward/reverse)	Referência
ITS	ITS4 5'-TCCTTCCGCTTATTGATATGC-3' M-ITS1 5'-GGTGAACCTGCAGATGGATC-3'-3'	White et al. (1999) Stoll et al. (2003)
LSU	NL1 5' - GCATATCAATAAGCGGAGAAAAG-3' NL4 5' - CGTCCGTGTTCAAGACGG-3'	O'Donnell (1993)

### Referências Bibliográficas:

CABI Dataset: *Sporisorium sacchari* (Asian sugarcane smut). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/108969>. Acesso em: 04 de março de 2021.

\_\_\_\_\_. Dataset: *Sporisorium scitamineum* (sugarcane smut). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/55949>. Acesso em: 04 de março de 2021.

CABI e EPPO. (2008). *Sporisorium scitamineum*. [Distribution map]. Distribution Maps of Plant Diseases, April (Edition 7). Wallingford, UK: CABI, Map 79.

O'donnell, K. (1993). *Fusarium* and its near relatives. The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics, 225-233.

Stoll, M., Piepenbring, M., Begerow, D., & Oberwinkler, F. (2003). Molecular phylogeny of *Ustilago* and *Sporisorium* species (Basidiomycota, Ustilaginales) based on internal transcribed spacer (ITS) sequences. *Canadian Journal of Botany*, 81(9), 976-984.

Stoll, M., Begerow, D., & Oberwinkler, F. (2005). Molecular phylogeny of *Ustilago*, *Sporisorium*, and related taxa based on combined analyses of rDNA sequences. *Mycological research*, 109(3), 342-356.

Sundar, A.R.; Barnabas, E.L.; Malathi, P.; Viswanathan, R. A. (2012). Mini-Review on Smut Disease of Sugarcane Caused by *Sporisorium scitamineum*, Botany, InTech.

Trione, E. J. (1990). Growth and sporulation of *Ustilago scitaminea*, in vivo and in vitro. *Mycological Research*, 94(4), 489–493.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pages 315-322 in: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds. Academic Press, New York.

## **II.A15. *Sirococcus tsugae***

### **Classificação taxonômica:**

Reino: Fungi  
Filo: Ascomycota  
Classe: Sordariomycetes  
Ordem: Diaporthales  
Família: *Incertae sedis*  
Gênero: *Sirococcus*  
Espécie: *Sirococcus tsugae*

### **Motivo da inclusão na lista:**

A infecção por *Sirococcus tsugae* é responsável por causar a ferrugem em diversas espécies da família Pinaceae (*Tsuga* sp. – cicutas, e *Cedrus*). As pináceas têm agulhas dispostas em espiral semelhantes a esporas. Na primavera, as árvores afetadas exibem agulhas mortas nos brotos, brotos mortos, cancro e exsudação de goma. As agulhas mortas são muito distintas, pois têm uma cor rosa característica e só se tornam marrons com o avançar da temporada. Os corpos frutíferos de *S. tsugae* podem ser observados nas agulhas mortas. Galhos afetados podem exibir cancro. No entanto, estes são frequentemente indistintos e caracterizados por uma ligeira redução no diâmetro do ramo juntamente com uma mudança da cor da casca de verde para um vermelho/roxo mais escuro. O sangramento de resina da casca também pode acompanhar esses sintomas em alguns casos. Os corpos frutíferos de *S. tsugae* podem ser vistos na superfície dos cancros durante os meses de inverno e na primavera. Galhos podem morrer se forem cingidos. Lesões marrons são evidentes no tecido do floema da casca e podem se estender dos brotos afetados aos ramos subtendentes e ao tronco principal, onde podem se espalhar longitudinalmente. Na cicuta ocidental, a doença é especialmente aparente em povoamentos naturais em regeneração avançada no sub-bosque. Pode afetar uma ou mais pontas de brotos em uma única árvore. Em *Tsuga mertensiana*, o fungo causa a ferrugem dos brotos (Forest Research, s/d). Até recentemente, *S. tsugae* só era registrado no oeste da América do Norte, onde ocorre em várias espécies de cicuta e cedro. Mas, foi confirmado na Geórgia e nos estados do nordeste dos EUA (Stanosz et al., 2011). Foi relatado pela primeira vez no Reino Unido em 2014 e 2015, quando foi encontrado em vários locais na Inglaterra, Escócia e País de Gales e, desde então, também na Irlanda do Norte (Rossman et al, 2008). Os conídios do fungo são dispersos localmente por respingos de chuva e é provável que ventos fortes possam dispersá-los em distâncias maiores. Não há informações sobre o potencial de transmissão de *S. tsugae* via sementes. Os caminhos para a disseminação também incluem mudas de plantas infectadas (Forest Research, s/d). É uma espécie considerada importante na Lista de Alerta de Pragas pela EPPO (2015). Não foram encontrados relatos deste fitopatógeno no Brasil. Contudo, destaca-se que na vegetação brasileira há espécies não nativas da família Pinaceae que poderiam ser afetadas (*Cedrus atlantica*, *Cedrus deodara*, *Cedrus libani*) (Reflora, s/d) pela introdução deste fungo e refletir negativamente na flora silvestre das regiões Sul e Sudeste, onde estão presentes. E, por tais motivos, recomenda-se a não utilização de *Sirococcus tsugae*.

### **Método de identificação:**

Devido à restrição de uso, quando houver pedidos de registro de fungos do gênero *Sirococcus* sp. é necessário confirmar se não se trata da espécie *S. tsugae*. Para tanto, dentre os trabalhos levantados, sugere-se utilizar a abordagem descrita no trabalho de Munck e colaboradores (2018). Neste trabalho,

que visava identificar a espécie, foi feita a PCR convencional utilizando *primers* específicos e desenhados previamente para a identificação de *S. tsugae*, seguido do sequenciamento e análise filogenética dos dados. Os *primers* utilizados foram *forward* SirTf e o *reverse* SirTr2, os quais estão descritos na Tabela abaixo.

Gene/região	Sequências dos <i>primers</i> (forward/reverse)	Referência
Região específica de <i>S. tsugae</i>	SIRTF: 5'- CCGGTGGCCCCTATAACG - 3' SIRTR2: 5' - AGAGAACCGCTGGACTTC - 3'	Smith & Stanosz (2008)

### Referências Bibliográficas:

EPPO (2015). EPPO Global database, Paris, France: *Sirococcus tsugae* (SIROTS). Disponível em: <https://gd.eppo.int/taxon/SIROTS>. Acesso em: 04 de março de 2021.

Forest Research. (s/d). *Sirococcus* blight (*Sirococcus tsugae*). Forestry Commission – UK. Disponível em: <https://www.forestryresearch.gov.uk/tools-and-resources/pest-and-disease-resources/sirococcus/>. Acesso em: 04 de março de 2021.

Munck, I. A., Morin, R. S., Ostrofsky, W. D., Searles, W., Smith, D. R., & Stanosz, G. R. (2018). Impact of *Sirococcus* shoot blight (*Sirococcus tsugae*) and other damaging agents on eastern hemlock (*Tsuga canadensis*) regeneration in Northeastern USA. *Forest Ecology and Management*, 429, 449-456.

Reflora (s/d). Pinaceae in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB610170>. Acesso em: 04 de março de 2021.

Rossman, A. Y., Castlebury, L. A., Farr, D. F., & Stanosz, G. R. (2008). *Sirococcus conigenus*, *Sirococcus piceicola* sp. nov. and *Sirococcus tsugae* sp. nov. on conifers: anamorphic fungi in the Gnomoniaceae, Diaporthales. *Forest Pathology*, 38(1), 47–60.

Smith, D. R., & Stanosz, G. R. (2008). PCR primers for identification of *Sirococcus conigenus* and *S. tsugae*, and detection of *S. conigenus* from symptomatic and asymptomatic red pine shoots. *Forest Pathology*, 38(3), 156–168.

Stanosz, G. R., Smith, D. R., Sullivan, J. P., Mech, A. M., Gandhi, K. J. K., Dalusky, M. J., ... Fraedrich, S. W. (2011). Shoot Blight Caused by *Sirococcus tsugae* on Eastern Hemlock (*Tsuga canadensis*) in Georgia. *Plant Disease*, 95(5), 612–612.