

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



**RESOLUÇÃO DO COMPLEXO DE ESPÉCIES
DE *PHOMOPSIS* E DOS SEUS TELEOMORFOS
DIAPORTHE NO HOSPEDEIRO *FOENICULUM
VULGARE***

Jorge Manuel Santos

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

2008

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



**RESOLUÇÃO DO COMPLEXO DE ESPÉCIES
DE *PHOMOPSIS* E DOS SEUS TELEOMORFOS
DIAPORTHE NO HOSPEDEIRO *FOENICULUM
VULGARE***

Jorge Manuel Santos

Dissertação orientada por

Prof. Doutor Rogério Tenreiro, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa

Doutor Alan J. L. Phillips, Centro de Recursos Microbiológicos, Faculdade de
Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

2008

ÍNDICE

	página
RESUMO	4
ABSTRACT	5
INTRODUÇÃO	6
MÉTODOS	
Isolados	11
Extracção de DNA	12
MSP-PCR	12
Análise filogenética	13
Diagnóstico de tipos conjugantes	14
Esporulação anamórfica e teleomórfica	15
Características culturais e taxas de crescimento	15
RESULTADOS	
1. Isolamentos	16
2. Caracterização molecular	
2.1 MSP-PCR	16
2.2 Análise filogenética	16
3. Estudos de conjugação	
3.1 Estudo dos genes <i>MAT</i>	18
3.2 Conjugação em cultura	18
4. Caracterização morfológica	
<i>Diaporthe angelicae</i>	20
<i>Diaporthe ambigua</i>	21
<i>Diaporthe lusitanicae</i>	24
<i>Diaporthe neotheicola</i>	26
DISCUSSÃO	28
REFERÊNCIAS	34
Agradecimentos	38
ANEXO I – Fluxo de trabalho	39
ANEXO II – Isolados	40
ANEXO III – Curvas de crescimento	42

RESUMO

As espécies anamórficas do género *Phomopsis* e os seus teleomorfos *Diaporthe* são endófitas e patogénicas numa vasta gama de hospedeiros vegetais, sendo responsáveis por diversas doenças, por vezes em plantas de interesse económico. Até à data, as espécies destes géneros têm sido definidas maioritariamente pela associação ao hospedeiro, e secundariamente pela sua micromorfologia. Contudo, trabalhos recentes demonstram que, devido à vasta gama de hospedeiros de certas espécies, a associação ao hospedeiro representa um carácter taxonómico de menor importância. Por sua vez, a plasticidade dos caracteres morfológicos e a sua sobreposição em espécies distintas, torna-os insuficientes para este objectivo. É portanto urgente uma revisão destes géneros para que conceitos morfológicos, biológicos e filogenéticos de espécie fidedignos possam ser aplicados a estes organismos. A estratégia adoptada para rever géneros tão vastos consistiu em seleccionar um hospedeiro de cada vez e caracterizar todas as espécies que nele ocorrem. Neste trabalho, uma intensiva recolha de *Phomopsis* e *Diaporthe* encontrados em *Foeniculum vulgare* ao longo de Portugal foi realizada, e, desta forma, uma colecção de isolados foi estabelecida. Os isolados foram caracterizados e agrupados de acordo com os seus perfis de MSP-PCR. Isolados representativos foram seleccionados para a construção de uma filogenia molecular baseada na região ITS do rDNA (ITS1–5.8S–ITS2). Os tipos conjugantes dos isolados foram diagnosticados por PCR, numa abordagem racional para a indução de teleomorfos *in vitro*. Para este efeito, *primers* “universais” para os *loci MAT* de *Diaporthe* foram desenhados. Conciliando dados morfológicos, culturais e moleculares, quatro espécies foram encontradas em *F. vulgare*. *Diaporthe angelicae* surge como o principal patogéneo deste hospedeiro em Portugal. Uma nova espécie, *Diaporthe lusitanicae*, é descrita e um novo teleomorfo (*Diaporthe neotheicola*) é relacionado com o seu anamorfo. Espécimes holótipo e culturas ex-tipo destas duas últimas espécies foram depositados em herbário e colecção pública de culturas.

Palavras-chave: MSP-PCR, ITS, filogenia, taxonomia, tipos conjugantes.

ABSTRACT

Anamorphic *Phomopsis* species and their *Diaporthe* teleomorphs are endophytes and pathogens on a wide range of plant hosts, being responsible for several diseases, sometimes in plants of economic importance. Until now, species within these genera have been described mainly on the basis of host association, and to a lesser extent on their micromorphology. However, recent studies have revealed that host association is of minor taxonomic importance, due to the wide host ranges of some species. On the other hand, morphological characters are not always suitable for species definition because of their plasticity and overlapping between distinct species. Therefore, a revision of these genera is needed so that reliable morphological, biological and phylogenetic species concepts can be established. The approach selected for revising such large genera was to study a single host at a time and fully characterize all the species that occur on it. In this study, an intensive sampling of *Phomopsis* species and *Diaporthe* teleomorphs found on *Foeniculum vulgare* throughout Portugal was done and a collection of isolates was established. Isolates were characterized and grouped according to their MSP-PCR profiles. Representative isolates were selected for a molecular phylogeny based on the rDNA ITS region (ITS1–5.8S–ITS2). Mating types were diagnosed by PCR means, towards a rational strategy for the induction of teleomorphs *in vitro*. For this purpose, “universal” primers for the *MAT loci* of *Diaporthe* were designed. Combining morphological, cultural and molecular data, four species were distinguished from *F. vulgare*. *Diaporthe angelicae* is the main pathogen of this host in Portugal. A new species, *Diaporthe lusitanicae*, is described and the teleomorph of *Phomopsis theicola* (*Diaporthe neotheicola*) is connected to its anamorph and described as a new species. Holotype specimens and ex-type cultures for these last two species were deposited in an international, publicly accessible herbarium and culture collection.

Key words: MSP-PCR, ITS, phylogeny, taxonomy, mating types.

INTRODUÇÃO

Phomopsis (Sacc.) Bubák é um género de fungos filamentosos *Coelomycetes*, i.e., fungos anamórficos com produção de conídios (esporos mitóticos) no interior de estruturas de frutificação assexuada fechadas e especializadas – *conidiomata*. No caso destes fungos, o *conidioma* tem forma esférica e uma abertura apical, tomando a designação de picnídio. Apresentam micélio septado e ramificado e os seus conidióforos, hifas especializadas na produção de conídios, são simples ou ramificados, curtos ou muito longos, septados, cilíndricos, hialinos e formados na face interna da parede do picnídio. As células conidiogénicas, suportadas pelos conidióforos, são enteroblásticas, fialídicas, cilíndricas a filiformes, podendo apresentar *collarette* (prolongamento da camada mais externa da sua parede celular) e espessamento periclinal da parede celular a nível do *locus* conidiogénico estacionário. Os conídios podem ser de dois tipos principais: conídios α , hialinos, unicelulares, fusiformes ou ovais e com gotas citoplasmáticas; e conídios β , hialinos unicelulares, filiformes, rectilíneos ou curvos, sem gotas citoplasmáticas. Algumas espécies podem ainda apresentar conídios γ , com forma intermédia entre as duas anteriores (Sutton, 1980).

Os teleomorfos de *Phomopsis* pertencem ao género ascomicete *Diaporthe* Nitschke. Neste género, o corpo de frutificação sexuado – ascocarpo – é um peritécio. Os peritécios têm também forma globosa e formam-se dentro do substrato onde o fungo cresce, irrompendo para o exterior através de um pescoço peritecial mais ou menos longo. Podem organizar-se solitariamente ou em grupos, compreendidos dentro de uma área entostromática, marginada por uma linha ectostromática escura, pelo menos em alguns pontos. No seu interior encontram-se ascos, grandes células em forma de saco clavado ou cilíndrico, unitunicados (com apenas uma parede celular) e com anel apical conspícuo e refringente, muito característico deste género. Inicialmente sésseis, são libertados da parede do peritécio quando maduros, ficando livres no seu interior. O hamatécio é constituído por paráfises, hifas originadas a partir da base do peritécio, que desaparecem com a maturidade do *ascoma*. No interior dos ascos encontram-se os ascósporos (esporos meióticos), fusóides ou elipsóides, bicelulares, hialinos, por vezes com apêndices extracelulares terminais e organizados uni a bisseriadamente no interior do asco (Wehmeyer, 1933).

O género *Diaporthopsis* Fabre (1883) foi criado para albergar espécies em tudo semelhantes a *Diaporthe*, à excepção dos ascósporos asseptados que estas apresentam. No entanto, Castlebury *et al.* (2003) demonstrou que a espécie tipo deste género, *Diaporthopsis angelicae* (Berk.) Wehm., se insere morfológica e filogeneticamente no género

Diaporthe, considerando *Diaporthopsis* um sinónimo de *Diaporthe*. Desta forma, actualmente o género *Diaporthe* inclui também espécies com ascósporos asseptados.

O género *Diaporthe* inclui espécies fitopatogénicas num grande número de hospedeiros lenhosos e herbáceos, sendo maioritariamente encontradas no seu estado anamórfico (*Phomopsis*). Muitas das espécies podem causar graves prejuízos ao infectar plantas de interesse económico, como seja o caso de árvores de fruto e videiras (*Vitis vinifera* L.), provocando cancrios, podridões, *diebacks* e necroses, entre outras patologias. Estes fungos podem ainda viver como endófitos, sem causar qualquer dano ao hospedeiro, podendo tornar-se patogénicos quando o hospedeiro se encontra senescente ou sob condições de stress. Outras espécies apresentam ainda comportamento saprofítico. Exemplos de agentes patogénicos são *Phomopsis amygdali* (Delacr.) J.J. Tuset & M.T. Portilla, responsável pela descoloração e morte de caules de pessegueiro (Farr *et al.*, 1999), *Diaporthe helianthi* Munt.-Cvetk., Mihaljč. & M. Petrov, o agente causal do cancro do caule do girassol (Muntanola-Cvetkovic *et al.*, 1991), *Diaporthe phaseolorum* (Cooke & Ellis) Sacc., agente causal do cancro do caule da soja (Black *et al.*, 1996) e *Phomopsis viticola* (Sacc.) Sacc., um importante patógeno da videira (Mostert *et al.*, 2001).

As espécies de *Diaporthe* foram caracterizadas essencialmente pela associação aos hospedeiros até que Wehmeyer (1933), ao rever a taxonomia deste género, colocou muitos nomes em sinonímia, reduzindo 650 espécies descritas a cerca de 70. No entanto, a sua revisão baseou-se apenas em caracteres morfológicos de espécimes de herbário dos teleomorfos, não tendo em conta qualquer carácter anamórfico ou cultural. Como resultado, alguns dos seus sinónimos já foram rejeitados (e.g. Linders e van der Aa, 1995; Phillips, 2003). Também as espécies de *Phomopsis* têm sido baseadas largamente na associação aos hospedeiros, havendo mais de 1000 espécies descritas (Uecker, 1988). É reconhecido actualmente que o hospedeiro constitui uma característica taxonómica de menor importância, pois a mesma espécie pode ocorrer em vários hospedeiros e num mesmo hospedeiro podem ocorrer mais de uma espécie fúngica (Rehner e Uecker, 1994). No entanto, este género ainda não foi taxonomicamente revisto. Mostert *et al.* (2001) encontrou seis espécies de *Phomopsis* na videira. Mais tarde, van Niekerk *et al.* (2005) adicionou mais nove à lista. No entanto, apenas *P. viticola* é um patógeno virulento da videira. Estes dados sugerem que a inespecificidade de hospedeiro pode levar a que espécies herbáceas comuns actuem como hospedeiros alternativos e reservatório de patógenos de cultivares de relevância económica.

Posto isto, estudos significativos de epidemiologia e controlo de doenças vegetais não poderão dispensar a correcta identificação dos agentes patogénicos, algo igualmente

essencial para a implementação de medidas fitossanitárias internacionais. Existe portanto a urgente necessidade de formular conceitos de espécie robustos e descrições claras e inequívocas para as espécies de *Phomopsis* e *Diaporthe*. Alguns progressos têm sido feitos neste sentido. Por exemplo, Mostert *et al.* (2001) desenvolveu um conceito firme para *P. viticola*, Phillips (1999) estabilizou o conceito de *Diaporthe perijuncta* Niessl e do seu anamorfo e van Niekerk *et al.* (2005) refinou o conceito desta espécie com recurso a sequências de DNA.

De facto, para atingir este fim, é necessário desenvolver e aplicar conceitos de espécie de índole não só morfológica mas também biológica e filogenética. Os caracteres morfológicos e culturais, com a sua plasticidade e variabilidade intraespecíficas, para além da sua sobreposição interespecífica, mostram-se inadequados e insuficientes na delimitação de espécies de *Phomopsis* (van der Aa *et al.*, 1990). Além disso, a variação de tais caracteres dentro de um mesmo isolado pode ser tão grande como a observada entre isolados distintos (Nitimargi, 1935; Parmeter, 1958; Wehmeyer, 1933). Por exemplo, Wehmeyer (1930) e Brayford (1990) reconheceram que a estrutura dos *conidiomata* não é uma característica fiável para separar as espécies de *Phomopsis*, variando muito com as condições de cultura e incubação. Brayford (1990) concluiu ainda que a humidade e luz atmosféricas influenciam o comprimento do pescoço peritecial, tanto maior quanto maior a humidade envolvente.

É reconhecido hoje em dia que as técnicas moleculares são de extrema utilidade na resolução de problemas taxonómicos em fungos. A construção de filogenias a partir de sequências da região ITS – *internal transcribed spacer* – tem sido usada para delimitar espécies num grande número de *taxa* fúngicos (e.g. Rehner e Uecker, 1994; Uddin e Stevenson, 1998). Esta é uma sequência de rDNA que compreende o gene 5.8S e as regiões flanqueantes, ITS1 a montante e ITS2 a jusante. As regiões ITS1 e 2 são transcritas mas não desempenham qualquer função na célula. Por esta razão evoluem mais rapidamente que os genes ribossomais, sendo adequadas na discriminação de microrganismos a nível de espécie (White *et al.*, 1990). Outras sequências nucleotídicas existem que apresentam potencial adicional na resolução de complexos de espécies, como é o caso do gene da subunidade menor do ribossoma mitocondrial (mtSSU) e do factor de tradução EF1- α . Mostert *et al.* (2001) utilizou a porção 5' da mtSSU juntamente com a sequência ITS para resolver o complexo de espécies de *Phomopsis* na videira, enquanto van Niekerk *et al.* (2005) usou o EF1- α para uma resolução adicional do mesmo complexo de espécies.

Apesar da utilidade da biologia molecular no estudo taxonómico de fungos, fornecendo dados preciosos para a definição de espécies, a abordagem morfológica tradicional à taxonomia fúngica não pode ser abandonada, uma vez que os nomes atribuídos aos clados terminais são ainda baseados nos caracteres morfológicos de espécimes de herbário. Para além disto, a falta de culturas ex-tipo obriga os taxonomistas actuais a comparar os caracteres morfológicos dos isolados no hospedeiro com os espécimes tipo das espécies descritas nesse mesmo hospedeiro, numa tentativa de propor espécimes epitipo e culturas ex-epitipo para estabilizar o nome de uma espécie. Este procedimento foi realizado por van Niekerk *et al.* (2005), ao propor um epitipo para *D. perjuncta*, e por van Rensburg *et al.* (2006), que propôs um epitipo para *Diaporthe ambigua* Nitschke.

Rever as cerca de 1000 espécies de *Phomopsis* descritas pode parecer uma tarefa hercúlea, mas pode ser concretizada com a escolha de uma abordagem adequada. Uma vez que a definição de espécies neste género se baseia, até hoje, na associação ao hospedeiro, uma abordagem plausível é estudar um hospedeiro de cada vez e caracterizar todas as espécies que nele ocorrem. Exemplos da forma como esta abordagem pode funcionar são os trabalhos de Mostert *et al.* (2001), van Niekerk *et al.* (2005) e van Rensburg *et al.* (2006).

Tendo em conta que todo o género necessita ser reexaminado, a escolha do hospedeiro e as espécies de *Phomopsis* a ele associadas não é uma questão problemática. No presente trabalho, o hospedeiro *Foeniculum vulgare* Mill. foi escolhido como modelo. *Foeniculum vulgare* (nome comum: funcho ou erva-doce) é uma planta herbácea anual ou perianual da família Apiaceae (Birdane *et al.*, 2007; Özcan *et al.*, 2006), dispersa em Portugal e em todos os climas mediterrânicos. O seu aroma e sabor característicos, muito semelhantes ao anis (*Pimpinella anisum* L.), torna-a relevante nas indústrias alimentar (quer na utilização culinária, quer na fabricação de licores) e cosmética (com a utilização dos seus óleos essenciais na fabricação de pastas dentífricas, champôs, sabonetes e aromatizantes) (Zeller e Rychlik, 2006). Algumas espécies de *Phomopsis* e *Diaporthe* estão descritas neste hospedeiro. São o caso de *Diaporthe foeniculacea* Niessl (von Thümen, 1880), *Phomopsis foeniculina* (Sacc.) Câmara (Câmara, 1947), *Phomopsis foeniculi* Du Manoir & Vegh (Du Manoir e Vegh, 1981) e *Phomopsis brunaudiana* (Sacc.) B. Sutton (Sutton, 1996). A ligação teleomorfo-anamorfo foi estabelecida entre *D. foeniculacea* e *P. foeniculina* por Phillips (2003), embora com base em evidências meramente morfológicas. Durante o Verão, o funcho cresce vigorosamente e aparenta estar livre de doenças. Entre o final do Outono e o início do Inverno, é comum observar a descoloração dos caules desta planta e o aparecimento de picnídios de *Phomopsis* sp.. Por vezes é possível encontrar também, na

base da planta, pescoços periteciais de *Diaporthe* sp. a emergir da superfície de caules velhos.

No presente trabalho, plantas de funcho apresentando sintomatologia de infecção por *Phomopsis* ou *Diaporthe* foram amostradas do Centro ao Sul de Portugal, e uma colecção de isolados de *Phomopsis* e *Diaporthe* foi estabelecida no laboratório. Os isolados foram então caracterizados pelos seus perfis de MSP-PCR.

MSP-PCR (*microsatellite-primed* PCR) é uma técnica de *fingerprinting* genómico baseada em PCR que faz uso de pequenos *primers* complementares a microsatélites, i.e., repetições em *tandem* de pequenos motivos de sequências de DNA presentes no genoma do organismo em estudo. Nesta técnica, o mesmo *primer* actua como *forward* e *reverse*, em elevadas condições de restringência (hibridação a 50–60 °C). Se os locais de ligação, cuja localização no genoma é desconhecida, ocorrerem numa posição e orientação que permita a amplificação de fragmentos de DNA, serão gerados padrões de bandas específicos de cada estirpe. Esta técnica permite a distinção entre diferentes *taxa* fúngicos a um nível interespecífico e intraespecífico (Meyer *et al.*, 1991; Weising *et al.*, 1995). Desta forma, isolados com igual perfil de MSP-PCR não só pertencem à mesma espécie, como também consistem na mesma estirpe.

Após a realização do *fingerprinting* da colecção de isolados, os mesmos foram agrupados de acordo com o seu perfil de MSP-PCR. Isolados representativos de cada grupo foram posteriormente utilizados na construção de uma filogenia molecular com recurso à região ITS. As diferentes espécies assim delimitadas foram seguidamente caracterizadas morfológicamente e quanto às suas características culturais e taxas específicas de crescimento.

Numa abordagem racional para a indução de teleomorfos em cultura, os tipos conjugantes dos isolados foram pesquisados. A reprodução sexuada da maioria dos fungos ascomicetes é governada por genes localizados num único *locus*, o *locus MAT* (Debuchy e Turgeon, 2006; Yun *et al.*, 1999). Nestes fungos existem dois alelos *MAT*, *MAT1-1* e *MAT1-2*, mais correctamente designados idiomorfos, pois a sua estrutura é altamente dissimilar, aparte das regiões flanqueantes 5' e 3' conterem sequências homólogas (Metzenberg e Glass, 1990). As espécies heterotáticas (ou auto-estéreis) apresentam núcleos alternativos *MAT1-1* e *MAT1-2*, definindo dois tipos conjugantes. No que diz respeito às espécies homotáticas (ou auto-férteis), a maior parte apresenta ambos os idiomorfos no mesmo núcleo. Uma excepção é o género *Neurospora* Shear & B.O. Dodge, onde certas espécies homotáticas apresentam apenas o idiomorfo *MAT1-1* (Glass *et al.*, 1990; Heitman *et al.*, 2007). Apesar de poderem realizar auto-conjugação, as espécies homotáticas podem

também realizar conjugação cruzada, se dois indivíduos da mesma espécie contactarem, aumentando a variabilidade genética da sua espécie (Heitman *et al.*, 2007). Kanematsu *et al.* (2007) sequenciou os *loci* MAT de duas espécies heterotálicas de *Diaporthe* e descobriu que neste género, invulgarmente, *MAT1-1* e *MAT1-2* apresentam a mesma estrutura e dois genes homólogos, *MAT1-1-2* e *MAT1-1-3*, diferindo apenas num gene, *MAT1-1-1* com domínio $\alpha 1$ no tipo conjugante *MAT1-1* e *MAT1-2-1* com domínio HMG no tipo conjugante *MAT1-2*. A partir das sequências publicadas por Kanematsu *et al.* (2007), foram desenhados *primers* “universais” para os genes *MAT1-1-1* e *MAT1-2-1* de *Diaporthe*. Os tipos conjugantes dos isolados em estudo foram determinados por PCR *gene direct* e isolados da mesma espécie com tipos conjugantes opostos foram emparelhados para induzir a sua reprodução sexuada.

São então objectivos deste estudo caracterizar e elaborar uma filogenia molecular das espécies de *Phomopsis* e *Diaporthe* que ocorrem em *Foeniculum vulgare* em Portugal, aplicar nomes adequados a eventuais novas espécies de *Phomopsis* e *Diaporthe* encontradas neste hospedeiro, propor espécimes tipo para as espécies encontradas que ainda não apresentem qualquer espécime holótipo ou epitipo associado e estabelecer conexões entre os anamorfos *Phomopsis* e os seus respectivos teleomorfos *Diaporthe*. Este último objectivo debruça-se sobre a questão de um mesmo fungo poder apresentar dois nomes específicos, consoante nos referimos ao estado anamórfico (assexuado) ou teleomórfico (sexuado) do seu ciclo de vida. Esta realidade advém da dificuldade secular em observar, em cultura, a fase sexuada do ciclo de vida destes microrganismos. Este facto tem levado à proliferação de espécies anamórficas, de entre as quais umas são estritamente assexuadas, enquanto outras simplesmente não foram relacionadas com o seu teleomorfo. No que diz respeito aos fungos considerados nesta dissertação, um estado *Diaporthe* só foi descrito para apenas cerca de 20% das espécies de *Phomopsis* (Uecker, 1988).

MÉTODOS

O fluxo de trabalho realizado está esquematizado no **Anexo I**.

Isolados

Caules de *Foeniculum vulgare* apresentando sintomatologia de infecção por *Phomopsis* ou *Diaporthe* foram recolhidos de 10 localidades diferentes, do Centro ao Sul de Portugal continental. O conteúdo de picnídios ou peritécios foi inoculado em ½ PDA: 20 g/L *Potato Dextrose Agar* BD Difco™ (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA), 10 g/L agar. Após 24 h de incubação à temperatura ambiente (TA), culturas puras foram estabelecidas a partir de conídios ou ascósporos em germinação. Um total de 128 estirpes foi isolado. Os principais isolados utilizados no presente trabalho estão sumariados no **Anexo II**, juntamente com as

suas origens e demais características. Os isolados referência foram depositados na coleção pública de culturas do Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, Holanda.

Extracção de DNA

Um protocolo para a extracção de DNA de estirpes de *Phomopsis* e *Diaporthe* foi aferido e otimizado. Os isolados foram crescidos em PDA, a 25 °C, na ausência de luz, até ao preenchimento de toda a superfície do meio, e o micélio recolhido para um tubo *Eppendorf* de 2 mL com 50 µL de esferas de vidro ($\varnothing = 230\text{--}320\ \mu\text{m}$) autoclavadas. Os tubos foram então colocados em azoto líquido durante 5 min e transferidos para gelo. Para a extracção proteica e separação de fases, 250 µL de fenol e 250 µL de clorofórmio foram adicionados, para além de 500 µL de tampão de lise¹. Os tubos foram seguidamente agitados em *vortex* durante 20 minutos e centrifugados ($19274 \times g$, 4 °C, 25 min). As fases aquosas foram transferidas para novos tubos de 1,5 mL e os ácidos nucleicos precipitados com igual volume de isopropanol absoluto frio. Os tubos foram sujeitos a nova centrifugação ($19274 \times g$, 4 °C, 10 min), a fase aquosa resultante descartada e o *pellet* lavado com 1 mL de etanol 70% frio. Uma centrifugação final ($19274 \times g$, 4 °C, 5 min) foi realizada, a fase aquosa descartada e o *pellet* seco em tubo invertido e aberto, à TA. Como forma de eliminar todo o RNA extraído, 50 µL de TE (Tris-EDTA)² + RNase A (Sigma®) ($50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram adicionados a cada *pellet* e estes incubados a 55 °C, durante 15 minutos. Diluições do DNA total extraído foram realizadas em TE de acordo com as quantidades pretendidas. Todas as suspensões de DNA foram armazenadas a – 20 °C.

¹ Tampão de lise: 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 2% Triton X-100, 1% SDS.

² TE: 10 mM Tris, 1 mM EDTA.

MSP-PCR

Os perfis de MSP-PCR foram produzidos de acordo com o protocolo descrito por Uddin e Stevenson (1997), recorrendo à enzima *Taq* DNA polimerase (recombinante) (Fermentas Life Sciences, Ontario, Canadá) e aos *primers* M13 (5' – GAG GGT GGC GGT TCT – 3') (Meyer *et al.*, 1993) e (GTG)₅, numa quantidade final de 20 pmol por reacção de 25 µL. As reacções de PCR foram executadas no termociclador Biometra® UNO II Thermoblock, prolongando o passo de extensão (72 °C) para 2 minutos. 10 µL da mistura de reacção foram sujeitos a electroforese em gel de agarose 1,5% (p/v), em TBE (Tris Borato EDTA) 0,5X (80 V, 3 h 30 minutos), de forma a separar os produtos de amplificação. Os géis foram corados com brometo de etídio e o DNA observado sob luz ultravioleta no transiluminador Bio-Rad® UNIVERSAL HOOD II e posteriormente fotografado com a aplicação Gel Doc™ EQ

do *software* Quantity One[®] versão 4.5.0 (Bio-Rad[®]). De acordo com os perfis obtidos, os isolados foram agrupados num dendrograma *consensus* construído com o *software* Bionumerics versão 4.61 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica, 1998), usando o coeficiente de correlação de Pearson e o método de aglomeração UPGMA. O nível de reprodutibilidade calculado para este dendrograma representa o valor médio da reprodutibilidade obtida para os dois *primers* independentemente. Para este efeito, e para cada *primer*, 10% dos isolados foram escolhidos aleatoriamente e o seu perfil repetido. A reprodutibilidade foi então calculada como a média das percentagens de semelhança a que um isolado e a sua réplica aparecem associados.

Análise filogenética

A região ITS-D1/D2 foi amplificada por PCR segundo o seguinte protocolo: 50–100 ng DNA genómico, 15 pmol de cada *primer* ITS1 (5' – TCC GTA GGT GAA CCT GCG G – 3') (White *et al.*, 1990) e NL-4 (5' – GGT CCG TGT TTC AAG ACG G – 3') (O'Donnell, 1993), 200 µM de cada dNTP, 3 mM MgCl₂, 1% DMSO e 1 U *Taq* DNA polimerase (recombinante) (Fermentas Life Sciences, Ontario, Canadá). As reacções de PCR foram aferidas para um total de 50 µL e executadas no termociclador Biometra[®] UNO II Thermoblock. Os parâmetros de PCR foram: 5 min a 95 °C seguido de 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 30 s a 50 °C e 1 min a 72 °C, e um passo final de extensão de 10 min a 72 °C. Os produtos de PCR foram purificados com o *illustra*[™] *GFX*[™] PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences), de acordo com as instruções do fabricante. A região ITS foi sequenciada em ambos os sentidos com os *primers* ITS1 e ITS4 (5' – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3') (White *et al.*, 1990), pelo serviço de sequenciação de produtos de PCR da STAB VIDA, Investigação e Serviços em Ciências Biológicas, Lda. (Oeiras, Portugal). As sequências nucleotídicas foram analisadas e editadas com o *software* BioEdit versão 7.0.9.0 (Hall, 1999) e alinhadas com o *software* ClustalX (1.83) (Thompson *et al.*, 1997). Sequências adicionais foram obtidas a partir da base de dados do GenBank através da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1990) e adicionadas ao alinhamento. *Valsa ceratosperma* (Tode) Maire (DQ241769) e *Leucostoma persoonii* (Nitschke) Höhn. (DQ996042) foram incluídas como *outgroups*. Regiões terminais das sequências que não puderam ser alinhadas foram excluídas da análise. Todos os caracteres foram desordenados e igual peso foi atribuído a cada um deles. A análise filogenética foi realizada com o *software* PAUP (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*) versão 4.0b10 (Swofford, 2002), utilizando os métodos *Neighbour Joining* (NJ), com cálculo de distâncias Kimura 2-parâmetros (K2P), e Máxima Parcimónia (MP), usando procura heurística com adição aleatória de sequências (1000 réplicas) e as opções de troca de ramos (*tree bisection-reconnection*, TBR) e MULTREES activas. Todos os *gaps* foram ignorados na

análise com o método NJ e tratados como quinto carácter na análise com o método MP. Em ambos os métodos, foi realizado o cálculo de *bootstrap* com 1000 réplicas para os ramos da árvore filogenética (Felsenstein, 1985). Adicionalmente, no cálculo de *bootstrap* para MP, foi utilizada a adição aleatória com 10 réplicas e desactivada a opção MULTREES. Na árvore filogenética (**Fig. 2**), as sequências obtidas do GenBank surgem com o respectivo número de acesso e nome de espécie, enquanto as novas sequências estão indicadas com o número do isolado (ver **Anexo II**). As novas sequências foram depositadas no GenBank e o alinhamento e árvore filogenética na base de dados TreeBASE (P.I.N. 23241).

Diagnóstico de tipos conjugantes

As sequências do *locus MAT1-1* de *Diaporthe* tipo-W (AB199324) e de *Diaporthe* tipo-G (AB199326) foram alinhadas com o *software* BioEdit versão 7.0.9.0 (Hall, 1999). O mesmo foi feito para as sequências *MAT1-2* das mesmas espécies (AB199325, *Diaporthe* tipo-W; AB199327, *Diaporthe* tipo-G) (Kanematsu *et al.*, 2007). Para cada alinhamento, uma sequência *consensus* foi criada e a partir destas desenhados, recorrendo ao *software* Primer Premier versão 5.00 (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, CA, EUA), os seguintes *primers* degenerados “universais” para diagnóstico de tipos conjugantes em *Diaporthe*: MAT1-1-1FW (5' – GCA AMI GTK TIK ACT CAC A – 3') e MAT1-1-1RV (5' – GTC TMT GAC CAR GAC CAT G – 3'), para amplificação de porção do domínio $\alpha 1$ do gene *MAT1-1-1*, e MAT1-2-1FW (5' – GCC CKC CYA AYC CAT TCA TC – 3') e MAT1-2-1RV (5' – TTG ACY TCA GAA GAC TTG CGT G – 3'), para amplificação de porção do domínio HMG do gene *MAT1-2-1*. Os fragmentos génicos foram amplificados segundo o seguinte protocolo: 50–100 ng DNA genómico, 40 pmol de cada *primer* MAT1-1-1FW e MAT1-1-1RV ou 10 pmol de cada *primer* MAT1-2-1FW e MAT1-2-1RV, 200 μ M de cada dNTP, 3 mM MgCl₂, 1% DMSO e 1 U *Taq* DNA polimerase (recombinante) (Fermentas Life Sciences, Ontario, Canadá). As reacções de PCR foram aferidas para um total de 50 μ L e executadas no termociclador Biometra® UNO II Thermoblock. Os parâmetros de PCR foram: 5 min a 95 °C seguido de 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 50 °C (para o par de *primers* MAT1-1-1FW e MAT1-1-1RV) ou 56 °C (para o par de *primers* MAT1-2-1FW e MAT1-2-1RV) e 1 min a 72 °C, e um passo final de extensão de 10 min a 72 °C. Os produtos de PCR (10 μ L) foram visualizados em gel de agarose 1,5% (p/v), em TAE (Tris Acetato EDTA) 1X (100 V, 60 minutos), corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta no transiluminador Bio-Rad® UNIVERSAL HOOD II e fotografados com a aplicação Gel Doc™ EQ do *software* Quantity One® versão 4.5.0 (Bio-Rad®). Os produtos foram posteriormente purificados com o illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences), de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos foram sequenciados em ambos os sentidos com os respectivos *primers* usados na amplificação pelo serviço de sequenciação de produtos de PCR da STAB

VIDA, Investigação e Serviços em Ciências Biológicas, Lda. (Oeiras, Portugal). As sequências nucleotídicas foram analisadas, editadas e alinhadas com o *software* BioEdit versão 7.0.9.0 (Hall, 1999), para confirmar a sua identidade. Para o alinhamento, a aplicação acessória de alinhamento múltiplo ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) foi utilizada.

Esporulação anamórfica e teleomórfica

Para fins de análise morfológica das estruturas de esporulação anamórfica, os isolados seleccionados foram inoculados sobre caules saudáveis e autoclavados (20 min, 121 °C, 1 bar) de *Foeniculum vulgare* colocados sobre WA (*Water Agar*) 2%, e incubados à TA, sob luz natural difusa. Para a indução da esporulação teleomórfica foi utilizado o método descrito por Brayford (1990), consistindo na aplicação do inóculo entre dois caules paralelos de *F. vulgare* no caso de inoculações simples, ou na aplicação de um inóculo em cada extremidade dos caules no caso de inoculações de pares de isolados. As condições de incubação foram em tudo idênticas às utilizadas para a esporulação anamórfica. Para caracterização micromorfológica, as estruturas anamórficas foram montadas em ácido láctico 100% e as teleomórficas em meio de Shear incolor³. Todas as estruturas foram fotografadas recorrendo às câmaras digitais Leica DC300 e Leica DFC320, acopladas aos microscópios Leica MZ95 e Leica DMR, respectivamente. Todas as medições foram realizadas com recurso ao *software* de gestão de imagens Leica IM500 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha). Os intervalos de 95% de confiança para o comprimento e largura de ascos, ascósporos e conídios alfa e beta foram calculados, e os valores extremos são dados entre parêntesis. No caso das dimensões de ascos, estes valores foram arredondados ao meio micrómetro mais próximo. D.P. = desvio padrão; *n* = total de estruturas medidas.

³ 0,1 M acetato de potássio, 20% glicerol, 30% etanol (95%), 50% água destilada.

Características culturais e taxas de crescimento

Para o registo das características macroscópicas das culturas e cálculo das taxas de crescimento, dois isolados de cada espécie foram pré-inoculados em PDA para que se encontrassem em estado activo de crescimento. Seguidamente, cada isolado foi inoculado em triplicado, em PDA, e incubado a 25 °C, na ausência de luz, até um máximo de 120 h. Para normalizar as medições, inóculos circulares de 5 mm de diâmetro foram colocados no centro de placas de Petri de 86 mm de diâmetro. Para cada réplica, dois diâmetros perpendiculares foram medidos em intervalos de 24 h. As taxas específicas de crescimento foram determinadas a partir do declive de rectas de regressão linear aplicadas aos gráficos de valores médios de diâmetro vs. tempo (*n* = 12), usando o *software* Microsoft® Office Excel 2007 (Anexo III).

RESULTADOS

1. Isolamentos

Os espécimes recolhidos do campo foram inspeccionados para a presença de picnídios ou peritécios com morfologia e arranjo típicos de *Phomopsis* ou *Diaporthe*. Após esta pré-selecção, e previamente a qualquer isolamento, o conteúdo de uma ou mais estruturas de esporulação foi observado microscopicamente de forma a avaliar a presença de conídios ou ascósporos apresentando as características esperadas nestes géneros. Em todos os casos positivos foram realizados isolamentos de acordo com o protocolo descrito (ver **Métodos**). Desta forma, uma colecção de 128 isolados provenientes de 10 localidades diferentes de Portugal continental foi estabelecida (ver **Anexo II**).

2. Caracterização molecular

2.1 MSP-PCR

Um total de 127 estirpes foram agrupadas num dendrograma *consensus*, de acordo com os seus perfis de MSP-PCR obtidos com os *primers* M13 e (GTG)₅ (**Fig. 1**). Nove grupos foram formados a partir do nível de reprodutibilidade da técnica (82,7%).

Isolados representativos de cada um dos nove grupos e, dentro de um mesmo grupo, isolados representativos de cada região geográfica (se aplicável) foram seleccionados para a prossecução do trabalho experimental, nomeadamente para a construção de uma árvore filogenética e consequente delimitação e identificação de espécies. Um último isolado (Ph-C170/1) proveniente de Aveiro foi também incluído na análise filogenética.

2.2 Análise filogenética

A região ITS do rDNA dos isolados seleccionados foi sequenciada e um alinhamento com uma extensão de 561 caracteres, incluindo as sequências completas ITS1, 5.8S e ITS2 e sequências parciais de 18S e 28S, foi realizado. A partir deste alinhamento dois métodos de análise filogenética foram usados para a construção de filogenias: *Neighbour Joining* (NJ) e Máxima Parcimónia (MP). Dos 561 caracteres, 116 revelaram-se parcimoniosamente informativos. Ambos os métodos originaram árvores filogenéticas com a mesma topologia, à excepção de um único ramo (**Fig. 2**). Para além disto, a análise por MP produziu apenas 11 árvores igualmente parcimoniosas. É possível observar que os isolados amostrados de *Foeniculum vulgare* se distribuem por 4 espécies diferentes: *Diaporthe angelicae* (Berk.) Farr & Castlebury, presente em 9 das 10 localidades de Portugal continental amostradas; *Diaporthe lusitanicae* A.J.L. Phillips & J.M. Santos, uma nova espécie amostrada em Oeiras e Aveiro; *Diaporthe ambigua*, amostrada em duas plantas distintas da localidade de Azeitão; e *Diaporthe neotheicola* A.J.L. Phillips & J.M. Santos (teleomorfo de *Phomopsis theicola* Curzi), aqui descrita pela primeira vez, numa planta de Évora.

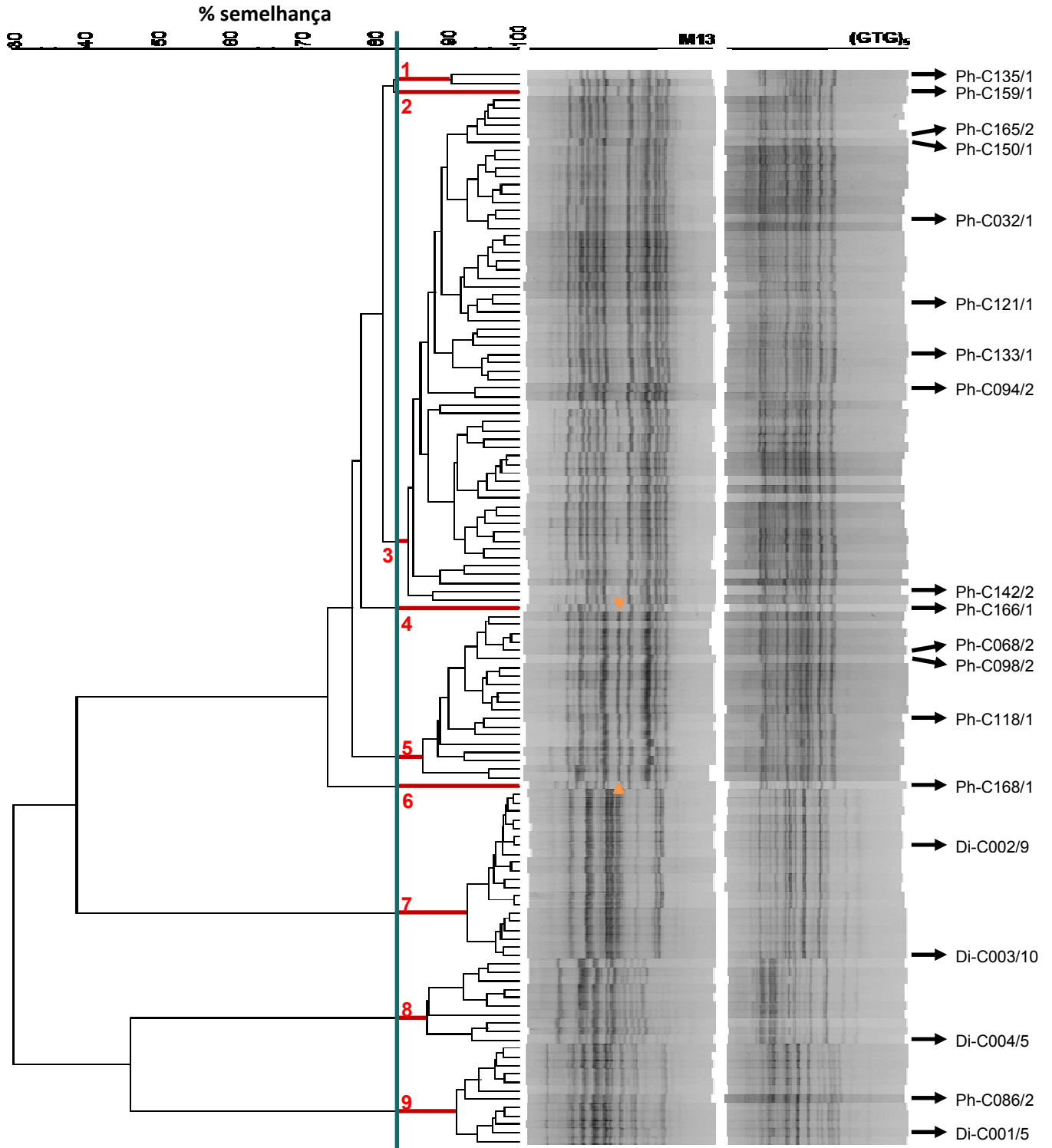


Fig. 1. Dendrograma *consensus* dos perfis M13 e (GTG)₅ de 127 estirpes isoladas no presente trabalho. Dendrograma construído com o *software* Bionumerics, usando o coeficiente de correlação de Pearson e o método de aglomeração UPGMA. O nível de corte (a verde) corresponde ao valor de reprodutibilidade da técnica (82,7%), a partir do qual nove grupos de isolados (ramos a vermelho) são formados. Os números a vermelho referem-se aos grupos formados. Os isolados assinalados com o seu respectivo número foram os seleccionados para a construção de uma filogenia. → ← representa uma banda discrepante (ver **Discussão**).

3. Estudos de conjugação

3.1 Estudo dos genes *MAT*

O trabalho experimental prosseguiu com o diagnóstico dos tipos conjugantes dos isolados pertencentes às diferentes espécies, como forma de encontrar pares de isolados que, em cruzamento *in vitro*, possibilitassem a observação do teleomorfo em cultura. Para este efeito, as sequências *MAT1-1* e *MAT1-2* de *Diaporthe* tipo-W e tipo-G (duas espécies heterotáticas distintas não identificadas) (Kanematsu *et al.*, 2007) foram alinhadas e regiões conservadas foram seleccionadas para o desenho de dois pares de *primers* degenerados: *MAT1-1-1FW* e *MAT1-1-1RV*, que amplificam apenas porção do domínio $\alpha 1$ do gene *MAT1-1-1* do tipo conjugante *MAT1-1*, dando origem a um produto de amplificação de cerca de 141 pb, e *MAT1-2-1FW* e *MAT1-2-1RV*, que amplificam somente porção do domínio HMG do gene *MAT1-2-1* do *locus MAT1-2*, originando um produto de amplificação com cerca de 229 pb. Na **Figura 3** é possível observar que *D. ambigua* é uma espécie homotática, apresentando os seus isolados resultado positivo para ambos os tipos conjugantes. Por outro lado, *D. angelicae*, *D. lusitanicae* e *D. neotheicola* são espécies heterotáticas, pois os dois tipos conjugantes apresentam-se em isolados distintos. Para confirmar a identidade dos produtos de amplificação, os mesmos foram sequenciados e alinhados, verificando-se serem resultado da amplificação das regiões genómicas em estudo (dados não apresentados). Os produtos de *MAT1-1-1* apresentaram 71 a 76% de identidade com a sequência AB199326 (*Diaporthe* tipo-G) e 84% com AB199324 (*Diaporthe* tipo-W). Por sua vez, os produtos de *MAT1-2-1* apresentaram 84 a 86% de identidade com a sequência AB199327 (*Diaporthe* tipo-G) e 89 a 92% de identidade com AB199325 (*Diaporthe* tipo-W).

3.2 Conjugação em cultura

Para corroborar os resultados moleculares acima descritos, as culturas puras de todos os isolados foram inspeccionadas para a presença de peritécios. Após mais de 4 meses de incubação, apenas as culturas puras de *D. ambigua* formaram peritécios. Estes eram em abundância e dispersos por toda a extensão dos caules de funcho, mas nunca sobre o meio de cultura. Frequentemente, estes peritécios eram formados no interior de zonas estromáticas negras bem visíveis. Para testar o diagnóstico de heterotalismo, 10 isolados de *D. neotheicola* e 4 de *D. angelicae* previamente caracterizados por PCR foram cruzados em todas as combinações possíveis. Ao fim de 2,5 meses, apenas os cruzamentos entre isolados com produtos de amplificação distintos resultaram na produção de peritécios. Nestes casos, os peritécios apenas se formaram na zona mediana dos caules de funcho, local onde os micélios dos dois isolados em co-cultura entravam em contacto. Por vezes foi possível observar sobre os caules a formação de uma linha estromática negra delimitando a referida zona de contacto.

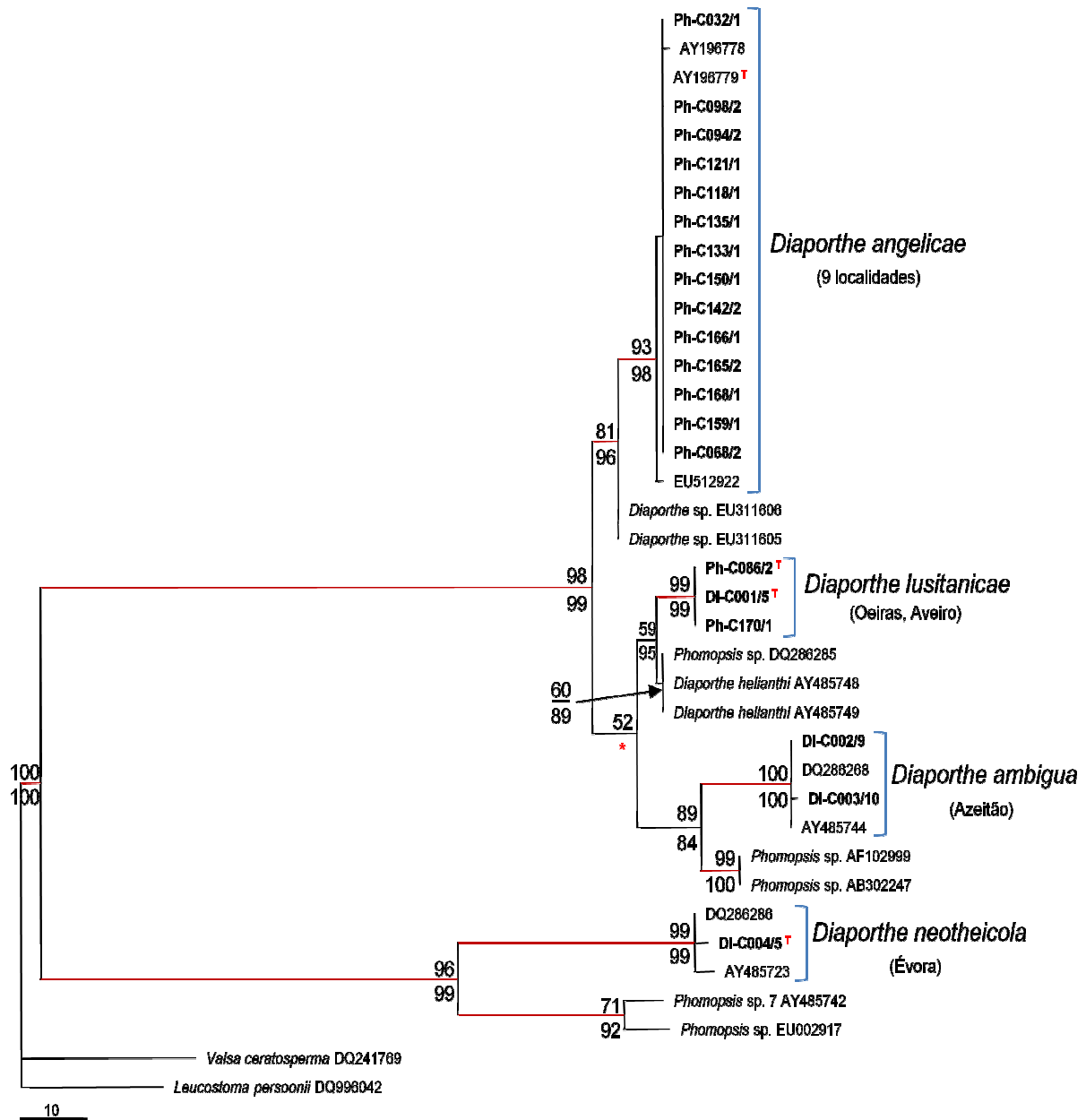


Fig. 2. Uma das 11 árvores igualmente parcimoniosas obtidas a partir do alinhamento de sequências ITS do rDNA. Comprimento = 255 passos; índice de consistência (CI) = 0,816; índice de retenção (RI) = 0,922; índice de consistência redimensionado (RC) = 0,752; índice de homoplasia (HI) = 0,184. A negrito encontram-se as estirpes isoladas no presente estudo. Os valores de *bootstrap* com 1000 réplicas por Máxima Parcimónia estão indicados acima dos ramos e por *Neighbour Joining* (NJ) abaixo dos mesmos. O ramo assinalado com * não consta da árvore filogenética por NJ. As linhas a vermelho indicam os ramos presentes na árvore *consensus*. A barra representa 10 mudanças. *Valsa ceratosperma* (DQ241769) e *Leucostoma persoonii* (DQ996042) foram utilizadas como *outgroups*. As localidades indicam a proveniência, por clado, das estirpes isoladas no presente trabalho. ^T Cultura ex-tipo ou ex-epitipo. Filogenia depositada no TreeBASE (P.I.N. 23241).

Seguidamente, procedeu-se à caracterização macro e micromorfológica das espécies presentes em *F. vulgare*.

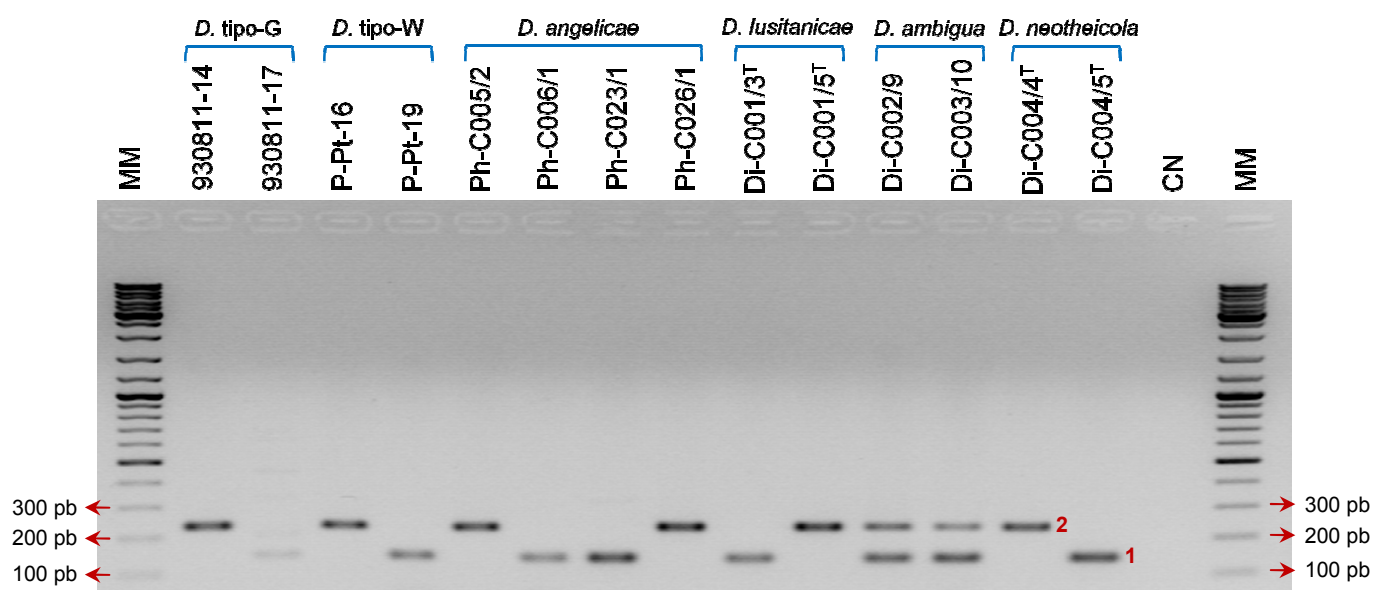


Fig. 3. Separação electroforética simultânea dos produtos de amplificação dos tipos conjugantes *MAT1-1* e *MAT1-2* em gel de agarose 1,5% (p/v) (100 V, 60 minutos). 930811-14, 930811-17, P-Pt-16 e P-Pt-19 (Kanemetsu *et al.*, 2007) funcionam como controlos positivos para a amplificação dos fragmentos com os *primers* desenhados. Os produtos **1**, de aproximadamente 141 pb, resultam da amplificação de porção do domínio $\alpha 1$ de *MAT1-1-1*, enquanto os produtos **2**, de aproximadamente 229 pb, resultam da amplificação de porção do domínio HMG de *MAT1-2-1*. CN = controlo negativo (água); MM = marcador de peso molecular (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas Life Sciences)^T Cultura ex-tipo.

4. Caracterização morfológica

Diaporthe angelicae (Berk.) Farr & Castlebury, *Mycoscience* 44, 204. 2003.

Fig. 4.

Basiônimo: *Sphaeria angelicae* Berk., *Mag. Zool. Bot.* 28. 1837.

Castlebury *et al.* (2003) elaborou uma descrição detalhada e propôs um espécime epitipo para esta espécie.

Os cruzamentos entre isolados de tipos conjugantes opostos resultaram na formação de peritécios subepidérmicos com pescoços negros, pilosos, curvos, $0.48\text{--}1.39 \times 0.11\text{--}0.18$ mm. No entanto, mesmo após 3 meses de incubação, nenhuma estrutura ascogénica foi observada no seu interior. Espécie heterotálica.

Picnídios subglobosos a discóides, $0.22\text{--}0.32$ mm no eixo de maior largura, superficiais, surgindo como pontuações negras dispersas pela epiderme do hospedeiro, ostiolados e muito pouco protuberantes. Pescoço não evidente. *Conidiomata* em caules de *Foeniculum vulgare* em cultura consistindo em picnídios cónicos, de dimensões invulgarmente variáveis, $0.18\text{--}0.58$ mm de largura por $0.19\text{--}0.40$ mm de altura, formados imediatamente abaixo da epiderme vegetal. Ostíolo através do qual é exsudada uma gota de conídios amarela-translúcida. Conídios alfa unicelulares, fusiformes, afilando nas extremidades, $(6.50\text{--})8.64\text{--}8.78\text{--}(11.01) \times (2.15\text{--})2.83\text{--}2.88\text{--}(3.93)$ μm , média \pm D.P. = $8.71 \pm 0.88 \times 2.86 \pm 0.28$ μm (n

= 600), hialinos, bigutulados, frequentemente com várias gotículas adicionais de menores dimensões. Cicatriz conidiogénica evidente na extremidade basal. Conídios beta hialinos, asseptados, agutulados, filiformes, curvos ou em forma de gancho, com extremidades obtusas, presentes em grande número e previamente aos conídios alfa, (15.28–)24.22–25.90(–30.63) × (0.82–)1.01–1.06(–1.29) µm, média ± D.P. = 25.06 ± 3.03 × 1.03 ± 0.09 µm ($n = 50$). Conidióforos cilíndricos, septados, sinuosos e ramificados, 7.81–17.95 × 1.56–2.89 µm. Células conidiogénicas fialídicas, cilíndricas, estreitando em direcção ao ápice. Espessamento periclinal da parede visível a nível do *locus* conidiogénico. Células conidiogénicas terminais, inseridas na extremidade do conidióforo, 10.01–14.90 × 1.72–2.47 µm, e laterais, pertencendo ao eixo principal do conidióforo mas com prolongamento lateral de 4.71–13.99 por 1.37–2.39 µm, conferindo aspecto ramificado ao próprio conidióforo.

Cultura em PDA, a 25 °C, na ausência de luz, com comportamento traduzível por crescimento linear de ≈ 16 mm de diâmetro por dia; taxa específica de crescimento (μ) = 0.6658 h⁻¹. Colónia inteiramente branca na superfície e reverso, textura penugenta e contorno ligeiramente franjado. Ao quinto dia de incubação, aparecimento de pigmentação castanha a negra no centro da colónia, sendo mais evidente no reverso do que na superfície da mesma. Coloração castanha-esverdeada como reacção à exposição à luz.

Espécimes examinados: Portugal: Quinta da Torre e Torre (Caparica), Monte de Caparica, Estação Agronómica Nacional (Oeiras), Malveira da Serra, Vale Andeiro (Azeitão), Quinta do Sol (Alenquer), Faro, Évora, em *F. vulgare*, Set–Dez 2007, colhidos por J.M. Santos e A.J.L. Phillips (para culturas ver **Anexo II**).

Diaporthe ambigua Nitschke, Pyrenomycetes Germanici, 311. 1867.

Fig. 5.

Anamorfo: *Phomopsis ambigua* (Sacc.) Traverso, Flora Italica Cryptogama, Pars 1. Fungi. *Pyrenomycetae, Xylariaceae, Valsaceae, Ceratostomataceae* 2(1), 266. 1906

Basiónimo: *Phoma ambigua* Sacc. Sylloge Fungorum 2, 91. 1880.

van Rensburg *et al.* (2006) elaborou uma descrição detalhada e propôs um espécime epítipo para esta espécie.

Ectostroma dorsal negro acastanhado, desenvolvido, efuso, não penetrando nos tecidos hospedeiros. Ectostroma ventral ausente. Peritécios globosos, 0.23–0.39 mm de diâmetro, com parede preta evidente, solitários a agregados, podendo mesmo formar grupos com mais de dez peritécios. Pescoço negro, subcilíndrico, afilando no ápice, 0.25–0.98 × 0.07–0.12 mm, ostíolo obtuso. Peritécios em cultura, sobre caules de *Foeniculum vulgare*, com crescimento fototrópico, forma e dimensões idênticas às encontradas na Natureza, agrupados em grupos de dois ou mais peritécios, por vezes na proximidade de um picnídio.

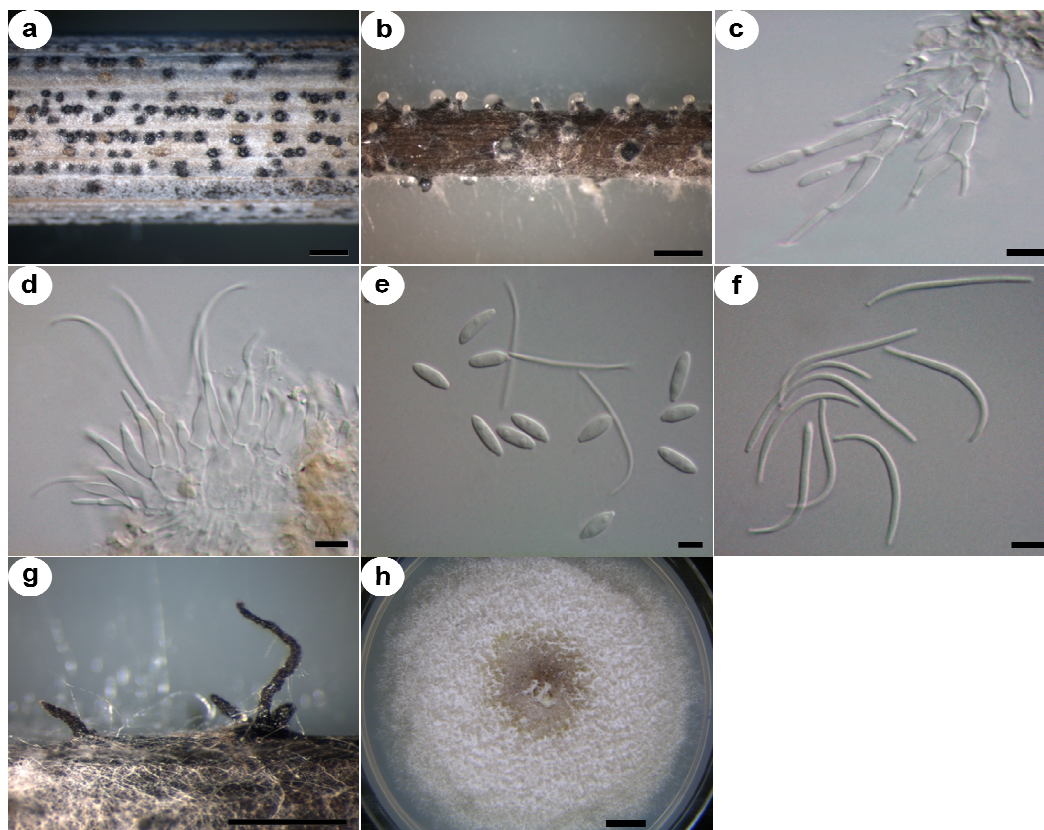


Fig. 4. *Diaporthe angelicae*. Picnídios em caule de *F. vulgare* *in vivo* (a, Ph-H105) e em cultura (b, Ph-C159/1). c e d, conidióforos (Ph-C005/2). e, conídios α (Ph-C098/2). f, conídios β (Ph-C003/2). g, peritécios em caule de *F. vulgare* em cultura (Ph-C005/2 \times Ph-C006/1). h, cultura ao fim de 5 dias de incubação (Ph-C159/1). Barras: a, b, g = 1 mm; c, d, e, f = 5 μ m; h = 1 cm. Ph-H: colecção de espécimes de herbário sediada no Centro de Recursos Microbiológicos (CREM), Caparica, Portugal.

Pescoços em cultura com largura idêntica, embora muito mais longos, podendo mesmo atingir os 3.54 mm de comprimento. Ascós unitunicados, (40.5–)44.0–46.0(–51.0) \times (7.5–)8.5–9.0(–9.5) μ m, média \pm D.P. = 45.13 \pm 2.79 \times 8.66 \pm 0.59 μ m (n = 30), clavados, com anel apical refringente e octosporicos. Ascósporos bisseriados, hialinos, lisos, (9.59–)11.15–11.55(–12.76) \times (3.31–)3.72–3.85(–4.24) μ m, média \pm D.P. = 11.35 \pm 0.72 \times 3.78 \pm 0.22 μ m (n = 50), fusóide-elipsoidais, afinando em direcção a ambas as extremidades, medianamente septados e constringidos. Célula apical visivelmente mais larga, definindo o eixo de maior largura do ascósporo ligeiramente acima do septo. Duas grandes gotas centrais e outras duas terminais, mais pequenas. Espécie homotática.

Conidiomata em caules de *Foeniculum vulgare* em cultura consistindo em picnídios globosos, 0.43–0.75 mm de diâmetro por 0.32–0.64 mm de altura, subepidérmicos, não agregados, ostiolados, com ou sem pescoço. Quando presente, pescoço cónico não ramificado ou bi a tetraramificado, medindo 0.25–0.55 mm de comprimento e 0.12–0.20 mm de largura a nível de cada ostíolo. Conídios exsudados em gota amarela-translúcida. Conídios alfa unicelulares, ovais, arredondados no ápice e ligeiramente afilados na base,

onde se pode observar a cicatriz conidiogénica, $(5.68\text{--})6.51\text{--}6.66\text{(--}7.53) \times (2.15\text{--})2.41\text{--}2.48\text{(--}3.07) \mu\text{m}$, média \pm D.P. = $6.59 \pm 0.38 \times 2.45 \pm 0.17 \mu\text{m}$ ($n = 100$), hialinos, uni a bigutulados em água, tenuemente gutulados em ácido láctico. Conídios beta não observados. Conidióforos raramente presentes, com as células conidiogénicas inseridas directamente na parede do picnídio, sendo pequenos, subcilíndricos, $4.01\text{--}6.71 \times 2.10\text{--}3.21 \mu\text{m}$, unicelulares e hialinos quando presentes. Células conidiogénicas fialídicas, hialinas, cilíndricas, estreitando em direcção ao ápice, rectilíneas ou ligeiramente curvas, $12.10\text{--}21.18 \times 1.51\text{--}2.14 \mu\text{m}$ e com espessamento periclinal presente embora pouco visível. Raras vezes o conidióforo é prolongado por uma célula conidiogénica com prolongamento lateral, na extremidade do qual se encontra o *locus* conidiogénico. Nestes casos, sobre esta célula assenta uma célula conidiogénica terminal.

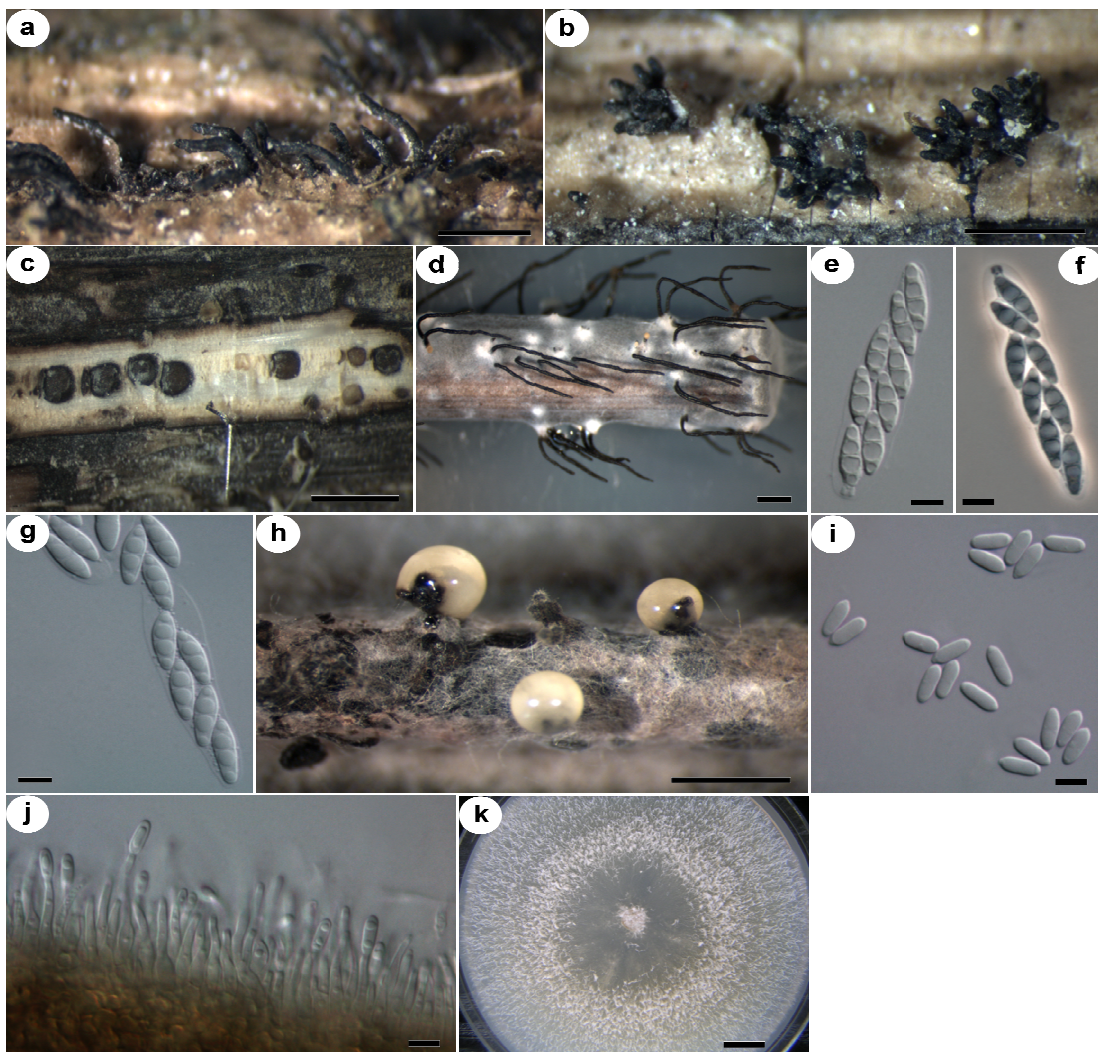


Fig. 5. *Diaporthe ambigua*. Peritécios na base de caule de *F. vulgare* *in vivo* (Ph-H113): **a** e **b**, pescoços periteciais a emergir da superfície do hospedeiro; **c**, corte transversal e estroma. **d**, peritécios em caule de *F. vulgare* em cultura (Di-C003/6). **e** e **f** (microscopia de contraste de fase), asco com ascósporos (Di-C003/10). **g**, ascósporos (Di-C002/1). **h**, picnídios em caule de *F. vulgare* em cultura (Di-C003/10). **i**, conídios α (Di-C003/10). **j**, conidióforos (Di-C002/8). **k**, cultura ao fim de 3 dias de incubação (Di-C003/2). Barras: a, b, c, d, h = 1 mm; e, f, g, i, j = 5 μm ; k = 1 cm. Ph-H: colecção de espécimes de herbário sediada no Centro de Recursos Microbiológicos (CREM), Caparica, Portugal.

Nesta descrição são dados comprimentos de conidióforos consideravelmente menores que os registados por van Rensburg *et al.* (2006), muito provavelmente porque este terá incluído o comprimento das células conidiogénicas nestas medições.

Cultura em PDA, a 25 °C, na ausência de luz, com crescimento linear de ≈ 26 mm de diâmetro por dia; taxa específica de crescimento (μ) = 1.1003 h⁻¹. Colónia inteiramente branca na superfície e reverso, textura penugenta-algodoada e contorno ligeiramente franjado, embora menos que em *Diaporthe angelicae*.

Espécimes examinados: Portugal: Vale Andeiro (Azeitão), em *F. vulgare*, Out 2007, colhidos por J.M. Santos (para culturas ver **Anexo II**).

Diaporthe lusitanicae A.J.L. Phillips & J.M. Santos, sp. nov.

Fig. 6.

MycoBank: MB 512256

Esta espécie será formalmente descrita num artigo científico actualmente em submissão. A seguinte descrição não deve ser citada.

Peritécios globosos, 0.22–0.41 mm de diâmetro, formados profundamente no substrato, organizados em grupos mais ou menos coesos com número variável de peritécios. Ectostroma negro, muito desenvolvido e marginando todo o entostroma; faces dorsal, ventral e laterais muito evidentes. Ectostroma dorsal efuso, não penetrando ou penetrando apenas ligeiramente nos tecidos hospedeiros entre os grupos de peritécios, sendo pontuado por grupos de ostíolos protuberantes, 0.31–0.43 mm acima da superfície do hospedeiro. Ascospores unitunicados, (42.0–)44.5–46.5(–52.5) \times (6.5–)7.5–8.0(–8.0) μ m, média \pm D.P. = 45.49 \pm 2.54 \times 7.63 \pm 0.41 μ m ($n = 20$), cilíndricos, mais largos no centro e arredondando nas extremidades. Anel apical conspícuo e refringente. Ascóspores hialinos imbricados, normalmente bisseriados, raramente unisseriados, (9.10–)9.99–10.35(–12.05) \times (2.36–)2.71–2.83(–3.24) μ m, média \pm D.P. = 10.17 \pm 0.67 \times 2.77 \pm 0.21 μ m ($n = 50$), lisos, estreitamente elipsóides, arredondados nas extremidades, bicelulares, constringidos a nível do septo, célula basal ligeiramente mais comprida e célula apical ligeiramente mais larga. Quatro gotas, duas em cada célula, sendo as centrais maiores. Espécie heterotálica.

Conidiomata em caules de *Foeniculum vulgare* em cultura consistindo em picnídios globosos, 0.41–0.87 mm de diâmetro, dispersos à superfície do substrato. Pescoços pilosos, 0.31–0.75 mm de comprimento, revestidos por pequenas hifas. Um a sete pescoços formados a partir de um mesmo picnídio. Conídios expelidos sob a forma de *cirri* amarelado e filiforme. Conídios alfa unicelulares, ovais a fusóides, arredondados nas extremidades, (6.77–)7.60–7.78(–8.98) \times (2.01–)2.39–2.46(–2.87) μ m, média \pm D.P. = 7.69 \pm 0.45 \times 2.43 \pm 0.18 μ m ($n = 100$), hialinos, bigutulados, por vezes apresentando cicatriz conidiogénica.

Conídios beta não observados. Conidióforos unicelulares, cilíndricos, $4.03\text{--}9.22 \times 1.96\text{--}2.33 \mu\text{m}$, suportando uma célula conidiogénica fialídica, cilíndrica, filiforme, rectilínea ou ligeiramente curva, estreitando na extremidade apical, $11.10\text{--}14.79 \times 1.57\text{--}2.69 \mu\text{m}$.

Cultura em PDA, a 25°C , na ausência de luz, com crescimento linear de $\approx 24 \text{ mm}$ de diâmetro por dia; taxa específica de crescimento (μ) = 1.0017 h^{-1} . Colónia inteiramente branca na superfície e reverso, textura algodoada e contorno ligeiramente lobado. Ao terceiro dia de incubação, zona central da colónia com tonalidade castanho-pálido; respectivo reverso creme escuro.

Espécime examinado: Portugal: Estação Agronómica Nacional (Oeiras), em *F. vulgare*, 14 Ago 2007, colhido por J.M. Santos (CBS-H 20130, designado holótipo; culturas ex-tipo Ph-C086/2, Di-C001/1, Di-C001/3, Di-C001/4, Di-C001/5 e Di-C001/10).

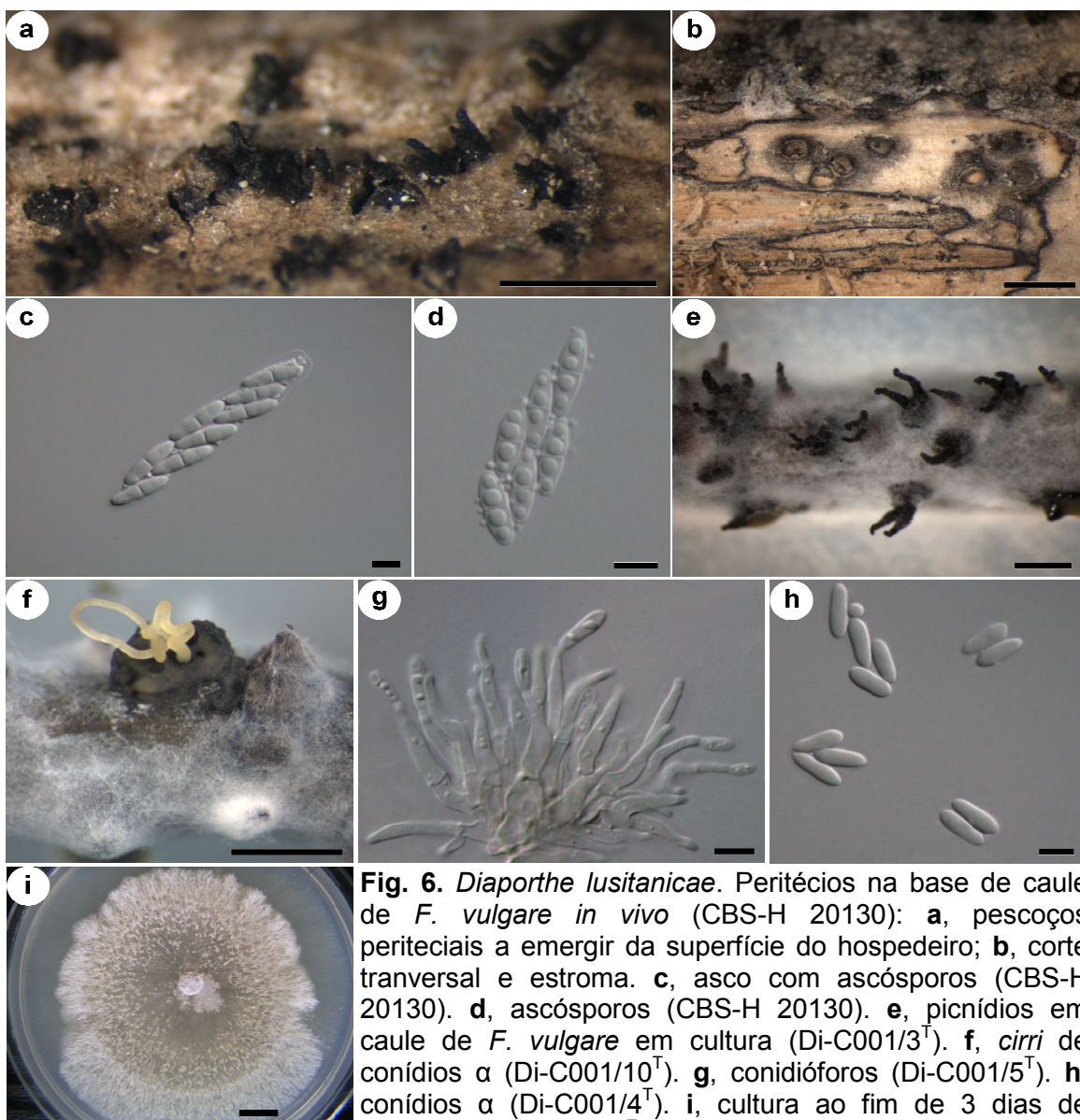


Fig. 6. *Diaporthe lusitanicae*. Peritécios na base de caule de *F. vulgare* *in vivo* (CBS-H 20130): **a**, pescoços periteciais a emergir da superfície do hospedeiro; **b**, corte transversal e estroma. **c**, asco com ascósporos (CBS-H 20130). **d**, ascósporos (CBS-H 20130). **e**, picnídios em caule de *F. vulgare* em cultura (Di-C001/3^T). **f**, cirri de conídios α (Di-C001/10^T). **g**, conidióforos (Di-C001/5^T). **h**, conídios α (Di-C001/4^T). **i**, cultura ao fim de 3 dias de incubação (Di-C001/3^T). Barras: a, b, e, f = 1 mm; c, d, g, h = 5 μm ; i = 1 cm. ^T Cultura ex-tipo.

Diaporthe neotheicola A.J.L. Phillips & J.M. Santos, sp. nov.

Fig. 7.

MycoBank: MB 512257

Esta espécie será formalmente descrita num artigo científico actualmente em submissão. A seguinte descrição não deve ser citada.

Anamorfo: *Phomopsis theicola* Curzi, Atti dell'Istituto Botanico della Università e Laboratorio Crittogamico di Pavia 3(3), 64. 1927.

Áreas entostromáticas diminutas, completamente delimitadas por uma linha ectostromática negra muito evidente, contendo normalmente apenas um ou dois peritécios no seu interior. Peritécios ligeiramente profundos no tecido vegetal, globosos, 0.37–0.45 mm no eixo de maior diâmetro. Pescoços não observados no espécime recolhido do campo, muito provavelmente devido ao seu estado de deterioração. Em cultura, sobre caules de *Foeniculum vulgare*, peritécios de idênticas dimensões com pescoços negros, pilosos, proeminentes, muito longos, 0.98–3.40 × 0.12–0.17 mm, filiformes, enrolados sobre si próprios, não raras vezes ramificados. Ascós com reminiscências de epiplasma no seu interior, unitunicados, consideravelmente longos, (50.0–)54.0–57.5(–64.5) × (7.0–)7.5–8.0(–9.0) µm, média ± D.P. = 55.96 ± 3.99 × 7.86 ± 0.57 µm ($n = 20$), clavados, com anel apical refringente bem visível, octospóricos ou heptaspóricos, por vezes apresentando, neste último caso, um ascósporo abortado. Frequentemente, todo o asco é abortivo, não dando origem a nenhum ou a muito poucos ascósporos, pelo menos em cultura. Ascósporos lassamente bisseriados, hialinos, lisos, (8.88–)10.26–10.60(–11.62) × (2.91–)3.40–3.57(–4.32) µm, média ± D.P. = 10.43 ± 0.61 × 3.48 ± 0.31 µm ($n = 50$), elipsoidais a ovais, com espessa parede celular, medianamente septados, nalguns casos constringidos a nível do septo, agutulados, bi ou tetragutulados, sendo neste último caso maiores as duas gotas centrais, mais próximas do septo. Célula apical um pouco mais larga, definindo o eixo de maior largura do ascósporo ligeiramente acima do septo. Espécie heterotática.

Mostert *et al.* (2001) elaborou uma descrição do anamorfo desta espécie, sob o nome de *Phomopsis* sp. 1. No entanto, são aqui apresentados alguns caracteres adicionais:

Conidiomata em caules de *Foeniculum vulgare* em cultura consistindo em picnídios de morfologia e dimensões bastante variáveis, podendo ser globosos, subglobosos ou cónicos, 0.42–0.73 mm de diâmetro por 0.28–1.13 mm de altura, mais ou menos protuberantes. Picnídios sem pescoço evidente, nus ou revestidos por densa camada de hifas, instalados pouco abaixo da epiderme do hospedeiro, por vezes inclusos em áreas estromáticas, delimitadas por linha ectostromática dorsal negra. Conídios exsudados em gota amarela-translúcida. Conídios alfa unicelulares, fusóides, com extremidades obtusas e cicatriz

conidiogénica basal, $(6.59\text{--}7.60\text{--}7.95\text{--}9.48) \times (1.87\text{--}2.18\text{--}2.28\text{--}2.57) \mu\text{m}$, média \pm D.P. = $7.78 \pm 0.63 \times 2.23 \pm 0.17 \mu\text{m}$ ($n = 50$), hialinos, maioritariamente bigutulados em água, embora seja difícil de observar esta característica em ácido láctico. Conídios beta hialinos, asseptados, filiformes, curvos, sem gotas e com extremidades arredondadas, $(21.51\text{--}25.67\text{--}26.72\text{--}30.26) \times (0.82\text{--}0.96\text{--}1.00\text{--}1.14) \mu\text{m}$, média \pm D.P. = $26.19 \pm 1.90 \times 0.98 \pm 0.08 \mu\text{m}$ ($n = 50$). Ambos os tipos de conídios são produzidos num mesmo picnídio, embora alguns picnídios pareçam produzir maioritariamente um tipo em detrimento do outro. Conidióforos alfa e beta idênticos e intercalados com paráfises longas, septadas e muito ramificadas. Conidióforos cilíndricos, septados, $6.69\text{--}23.51 \times 1.62\text{--}3.08 \mu\text{m}$. Células conidiogénicas alfa e beta fialídicas, cilíndricas a filiformes, estreitando em direcção ao ápice e com espessamento periclinal da parede visível a nível do *locus* conidiogénico. Células conidiogénicas terminais, inseridas na extremidade do conidióforo, $10.63\text{--}19.10 \times 1.44\text{--}2.38 \mu\text{m}$, e laterais, pertencendo ao eixo principal do conidióforo mas com prolongamento lateral de $2.64\text{--}9.85$ por $0.95\text{--}1.57 \mu\text{m}$, conferindo aspecto ramificado ao conidióforo.

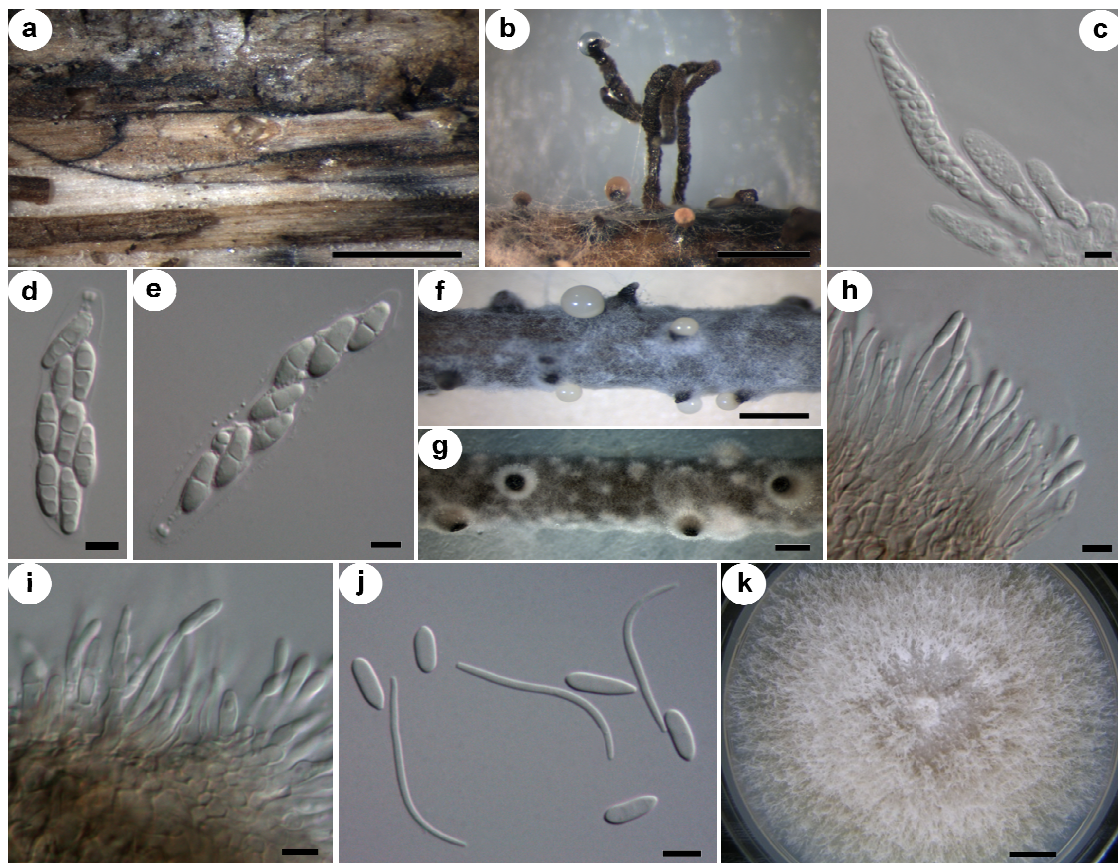


Fig. 7. *Diaporthe neotheicola*. **a**, peritécio e estroma na base de caule de *F. vulgare* *in vivo* (CBS-H 20131). **b**, peritécios em caule de *F. vulgare* em cultura (Di-C004/1^T \times Di-C004/4^T). **c**, ascogénese (Di-C004/4^T \times Di-C004/5^T). **d**, asco com oito ascósporos (Di-C004/1^T \times Di-C004/4^T). **e**, asco com sete ascósporos (Di-C004/4^T \times Di-C004/5^T). **f** (Di-C004/5^T) e **g** (Di-C004/9^T), picnídios em caules de *F. vulgare* em cultura. **h** e **i**, conidióforos (Di-C004/5^T). **j**, conídios α e β (Di-C004/5^T). **k**, cultura ao fim de 5 dias de incubação (Di-C004/4^T). Barras: **a**, **b**, **f**, **g** = 1 mm; **c**, **d**, **e**, **h**, **i**, **j** = 5 μm ; **k** = 1 cm. ^T Cultura ex-tipo.

Cultura em PDA, a 25 °C, na ausência de luz, com crescimento linear de ≈ 16 mm de diâmetro por dia; taxa específica de crescimento (μ) = 0.6508 h⁻¹. Colónia inteiramente branca na superfície e reverso, textura algodoadada e contorno ligeiramente franjado, embora menos que em *Diaporthe angelicae*. Após cinco dias de incubação a cultura apresenta uma ténue pigmentação verde-olivácea no centro do seu reverso.

Espécime examinado: Portugal: Évora, em *F. vulgare*, Nov 2007, colhido por A.J.L. Phillips (CBS-H 20131, designado holótipo; culturas ex-tipo Di-C004/1, Di-C004/4, Di-C004/5 e Di-C004/9).

NOTA: O comprimento invulgarmente longo dos pescoços periteciais de *D. ambigua* e *D. neotheicola* deve-se, muito provavelmente, às excepcionais condições de humidade em que as culturas se desenvolveram.

DISCUSSÃO

Na **Figura 1**, os isolados da espécie *Diaporthe angelicae* encontram-se dispersos pelos grupos 1 a 6. Todos estes isolados se encontram, no entanto, reunidos num *cluster* independente sensivelmente acima dos 70% de semelhança. A dispersão destes isolados por diversos grupos pode ser explicada recorrendo ao princípio da própria técnica de *fingerprinting* utilizada. Ao usar apenas um *primer* com locais de emparelhamento dispersos por todo o genoma de um organismo, a técnica de MSP-PCR apresenta uma elevada sensibilidade, podendo o mesmo perfil variar ligeiramente entre reacções de PCR. Para além disto, a análise densitométrica (usando o coeficiente de correlação de Pearson) a que os perfis foram sujeitos é muito sensível a variações de intensidade das bandas. Um exemplo muito pertinente é o do grupo 5 do dendrograma, com perfis muito semelhantes aos dos restantes grupos em questão, mas no entanto agrupados separadamente. É possível verificar que os isolados deste grupo se encontram agrupados devido a apresentarem, nos perfis M13, intensidades relativas das bandas muito semelhantes entre si e distintas das dos grupos 1 a 4. O simples facto de todos estes perfis terem sido processados em conjunto até ao registo fotográfico pode ter potenciado a sua similitude. Para além disto, é bem visível a presença de uma banda extra (setas laranja) nestes perfis. Esta banda apresentou uma frequência de erro associada de aproximadamente 56%, significando que de entre todos os perfis M13 duplicados, 56% era inconsistente na presença desta banda, pelo que nenhuma relevância lhe deve ser atribuída. Não obstante, a probabilidade média de erro, como definida por Sneath e Johnson (1972), associada à técnica MSP-PCR com o *primer* M13, foi de aproximadamente 2,5% quando aplicada a isolados dos grupos 3 e 5, de aproximadamente 10,1% quando aplicada a isolados do grupo 7, e de 0% quando aplicada a isolados dos grupos 8 e 9. Sendo esta probabilidade de erro

sempre inferior ou contida no intervalo 10–15% definido por Sneath e Johnson (1972), valida a aceitabilidade destes resultados. Os resultados obtidos para os perfis (GTG)₅ foram igualmente satisfatórios (dados não apresentados).

As espécies de *Diaporthe* e *Phomopsis* presentes em *Foeniculum vulgare* foram identificadas por associação das sequências ITS dos isolados em estudo com outras já disponíveis no GenBank, à exceção de *Diaporthe lusitanicae*, que se revelou filogeneticamente distinta dos isolados com as sequências disponíveis mais semelhantes. No entanto, esta nova espécie apresenta-se como um robusto clado, suportado por valores de *bootstrap* de 99% quando ambos os métodos de análise filogenética, Máxima Parcimónia (MP) e *Neighbour Joining* (NJ), são aplicados (**Fig. 2**). *Diaporthe angelicae*, por sua vez, foi identificada por associação à estirpe ex-epítipo desta espécie, CBS 111592 (AY196779), suportada por um *bootstrap* de 93% (MP) e 98% (NJ) (**Fig. 2**). *Diaporthe ambigua* foi também identificada por associação a sequências desta espécie disponíveis no GenBank, nomeadamente do isolado CBS 117374 (DQ286268) que, no estudo de van Rensburg *et al.* (2006), foi identificado a nível de espécie por se apresentar filogeneticamente relacionado com a cultura ex-epítipo CBS 114015 (AF230767). Esta última sequência não foi utilizada na presente filogenia pois apresenta apenas 86% de cobertura da região analisada, apesar dos 99% de identidade relativamente às sequências produzidas no actual estudo. O valor de *bootstrap* obtido para este clado foi de 100% tanto para MP como para NJ (**Fig. 2**). Finalmente, os isolados teleomórficos provenientes de Évora revelaram-se filogeneticamente próximos de isolados de *Phomopsis theicola*, nomeadamente do isolado STE-U 5567 (AY485723), ainda sob o nome de *Phomopsis* sp. 1 (van Niekerk *et al.*, 2005), e do isolado CBS 117166 (DQ286286) que foi identificado como pertencendo a esta espécie por ser filogeneticamente relacionado com a estirpe ex-tipo CBS 187.27 (van Rensburg *et al.*, 2006). Como tal, foi determinado que se estava na presença do teleomorfo de *P. theicola*. Neste caso, a sequência ITS do isolado CBS 187.27 não foi incluída na filogenia porque não foi possível encontrá-la na base de dados do GenBank. Também esta espécie se apresenta como um clado robusto, tendo em conta o valor de *bootstrap* de 99% obtido para este em ambos os métodos filogenéticos utilizados (**Fig. 2**).

Curzi (1927) descreveu *Diaporthe theicola* Curzi como sendo o teleomorfo de *P. theicola*. No entanto, fê-lo de forma dúbia e bastante grosseira, comparando apenas a morfologia de espécimes distintos. O próprio autor ressalva no artigo da sua descrição que as morfologias não correspondem totalmente e que a relação *P. theicola* – *D. theicola* deve ser alvo de reavaliação, algo que permaneceu por realizar até aos dias de hoje. Numa tentativa de confirmar a veracidade desta relação, espécimes e culturas de *D. theicola* foram neste trabalho pesquisados em diversos herbários e colecções de culturas internacionais,

sendo ambos aparentemente inexistentes. No entanto, a comparação da morfologia descrita para *D. theicola* com a morfologia do teleomorfo encontrado no presente estudo determinou que estas são dissimilares o suficiente para as considerar espécies distintas. Sendo assim, a relação *P. theicola* – *D. theicola* é refutada e uma nova espécie, *Diaporthe neotheicola*, é descrita e relacionada inequivocamente com o seu anamorfo *P. theicola*, tendo como base resultados moleculares.

Após efectuar BLAST com as sequências produzidas no presente trabalho, a escolha das sequências adicionais a incluir na análise filogenética não foi linear. De facto, esta não é uma escolha simples no que diz respeito a sequências de fungos filamentosos. Muitas das sequências disponíveis nas bases de dados não estão identificadas ao nível de espécie, sendo portanto inúteis para o processo de identificação de novos isolados. Outras há que se encontram incorrectamente identificadas. De facto, a 17 de Julho de 2006, 27% das sequências disponíveis no *International Nucleotide Sequence Database* (INSD: GenBank, EMBL e DDBJ) encontravam-se insuficientemente identificadas, 10 a 21% apresentavam anotações taxonómicas comprometidas e 40% permaneciam marcadas como não publicadas quando efectivamente já o tinham sido (Nilsson *et al.*, 2006). Na **Figura 2** é possível observar várias estirpes de *Diaporthe* e *Phomopsis* não identificadas, apenas incluídas nesta filogenia por serem as que apresentavam as sequências ITS mais semelhantes às novas sequências aqui produzidas. Pela mesma razão, também as sequências AY485748 e AY485749 (*Diaporthe helianthi*) foram incluídas, muito embora estejam erradamente anotadas a nível específico, uma vez que são filogeneticamente muito distantes da cultura ex-tipo CBS 592.81 (AY705842) (Alves A., dados não publicados).

Pela análise conjunta das **Figuras 1 e 2**, verifica-se que o grupo 7 do dendrograma consiste nos isolados de *D. ambigua*, provenientes de Azeitão, o grupo 8 nos isolados de *D. neotheicola*, provenientes de Évora, e o grupo 9 nos isolados de *Diaporthe lusitanicae*, provenientes de Oeiras. *Diaporthe lusitanicae* foi ainda amostrada em Aveiro (isolado Ph-C170/1). Os isolados dos grupos 1 a 6, por sua vez, pertencem todos à espécie *D. angelicae*, num total de 86 isolados provenientes de 9 das 10 localidades geográficas amostradas. Perante estes resultados, e tendo em conta a frequência de infecção por *D. angelicae*, parece plausível afirmar que esta é a principal espécie patogénica de *F. vulgare*, pelo menos em Portugal. De facto, esta espécie está reportada em vários hospedeiros da família Apiaceae por toda a América do Norte e Europa, incluindo Portugal (Wehmeyer, 1933), nomeadamente em espécies do género *Angelica* L. e em *Anthriscus* sp., *Daucus carota* L., *Eryngium campestre* L., *Heracleum sphondylium* L. (Castlebury *et al.*, 2003), *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm. (Eriksson, 1992), *Carum carvi* L. (Stoykow e Denchev, 2006), *Oenanthe crocata* L. (Kirk e Spooner, 1984), *Pastinaca sativa* L. (Munk, 1957) e

Peucedanum oreoselinum (L.) Moench (Wehmeyer, 1933). *Diaporthe lusitanicae*, por sua vez, apresenta-se como patogéneo minoritário do funcho, surgindo em 2 das 10 localidades amostradas, numa delas na base de um caule em decomposição.

As restantes espécies encontradas no funcho demonstraram especificidade geográfica. Um exemplo concreto é o de duas plantas em Azeitão, afastadas cerca de 500 metros uma da outra, se encontrarem colonizadas por *D. ambigua*. Estas observações aliadas ao facto destas espécies se encontrarem na base dos caules, junto ao solo, permite especular acerca do seu comportamento saprofítico no funcho. Não se encontrando adaptadas para colonizar este hospedeiro em primeira instância, poderão aproveitar a senescência da planta para crescer sobre caules mortos.

Na realidade, *D. ambigua* foi originalmente descrita em pereiras (*Pyrus communis* L.), na Alemanha (Nitschke, 1867), e posteriormente em macieiras, pereiras e ameixeiras na África do Sul (Smit *et al.*, 1996). van Rensburg *et al.* (2006) descreveu esta espécie mais recentemente em roibos (*Aspalathus linearis* (Burm. F.) R. Dahlgren). Apesar da larga gama de hospedeiros desta espécie, nenhum deles está relacionado com o funcho, corroborando a hipótese de que neste hospedeiro possa apresentar apenas um comportamento saprofítico.

Phomopsis theicola apresenta uma gama de hospedeiros ainda maior. Originalmente descrita em *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (planta do chá), em Itália (Curzi, 1927), foi posteriormente isolada de videiras, *Protea* L. e *Pyrus* L. em países como a Austrália, Portugal e África do Sul (Mostert *et al.*, 2001), novamente de videiras (van Niekerk *et al.*, 2005) e mais recentemente de roibos, igualmente na África do Sul (van Rensburg *et al.*, 2006). Embora Mostert *et al.* (2001) tenha descrito esta espécie sob o nome de *Phomopsis* sp. 1, van Rensburg *et al.* (2006) demonstrou mais tarde tratar-se de *P. theicola*, por comparação de sequências ITS com a estirpe ex-tipo CBS 187.27. Apesar da sua larga distribuição, também esta espécie, descrita inequivocamente no seu estado teleomórfico (*D. neotheicola*) neste trabalho, nunca foi registada em hospedeiros da família Apiaceae.

Um comportamento meramente saprofítico em *F. vulgare* pode não representar grande risco para a viabilidade desta planta, mas esta pode funcionar como habitat reservatório para estas espécies fúngicas, capazes de crescer e esporular nestes hospedeiros herbáceos até colonizar outras plantas de maior interesse económico, onde já provaram ser patogéneos efectivos.

Para confirmar a identidade de *Diaporthe lusitanicae*, a sua morfologia foi pormenorizadamente comparada com a de todas as espécies de *Phomopsis* e *Diaporthe*

descritas até à data em hospedeiros da família Apiaceae, recorrendo para isso à base de dados USDA SMML (Farr *et al.*, 2008), e com a de outras espécies listadas por Wehmeyer (1933). Nenhuma destas espécies correspondeu à morfologia de *D. lusitanicae*. Para além disto, *D. lusitanicae* é filogeneticamente distinta de qualquer outra espécie com sequências ITS disponíveis na base de dados do GenBank, encorajando por isso à descrição de uma nova espécie. As sequências mais próximas disponíveis (DQ286285, AY485748 e AY485749) constituem nitidamente um *taxon* distinto de *D. lusitanicae*, como se pode observar pelos valores de *bootstrap* que suportam ambos os cladogramas (**Fig. 2**). Entre as três referidas sequências e as de *D. lusitanicae* existem 7 diferenças nucleotídicas, das quais 6 são substituições e uma é uma inserção/deleção (*indel*), num total de 516 caracteres analisados. Uma alternativa seria descrever esta espécie apenas como *Diaporthe* sp., mas desta forma, ao invés de contribuir para uma boa classificação das espécies deste género, o objectivo maior do presente trabalho, estar-se-ia apenas a acrescentar ambiguidades taxonómicas a um género já pobremente resolvido. Também a morfologia de *D. neotheicola* foi comparada com a das referidas espécies como forma de excluir a hipótese de ter sido anteriormente descrita sob outro nome.

Apesar da ubiquidade de *D. angelicae* no funcho, não foi possível encontrar esta espécie na Natureza senão no seu estado anamórfico. No entanto, através da pesquisa dos tipos conjugantes, verificou-se a proveniência de isolados com tipos conjugantes opostos a partir da mesma planta hospedeira (Ph-C005/2 e Ph-C006/1, Ph-C023/1 e Ph-C026/1, **Fig. 3**). Em cultura, estes mesmos isolados, quando cruzados entre si, produziram peritécios *in vitro*, muito embora nenhum asco ou ascósporo tenha sido observado no seu interior (**Fig. 4**). Estes resultados parecem indicar que, apesar de pelo menos parte dos genes *MAT1-1-1* e *MAT1-2-1* estar presente no genoma destes isolados, estes não conseguem completar a fase sexuada do seu ciclo de vida. O espécime epítipo desta espécie é teleomórfico e provém da Áustria, logo, a incapacidade de realizar cruzamentos frutíferos não é uma particularidade de toda a espécie. A razão pela qual os isolados portugueses estudados neste trabalho não cruzam com sucesso permanece por determinar. Talvez seja esta incapacidade a responsável pelo facto do teleomorfo desta espécie não ter sido encontrado na Natureza, aquando da amostragem realizada no presente estudo.

Um resultado surpreendente foi a ausência de *Diaporthe foeniculacea* entre as espécies encontradas no funcho. De facto, Phillips (2003) havia descrito esta espécie e o seu anamorfo (*Phomopsis foeniculina*) em plantas deste hospedeiro, em Portugal. Uma plausível conclusão para este resultado é que também esta espécie não é frequente em *F. vulgare*. No entanto, Phillips (2003) descreveu estas espécies no funcho baseando-se exclusivamente em dados morfológicos. Dadas as dificuldades em discriminar

morfologicamente espécies de *Diaporthe* e *Phomopsis*, estas identificações não podem ser observadas como plenamente fiáveis.

O comportamento sexual das espécies de *Diaporthe* era, até à data, determinado por estudos de cruzamentos recíprocos em cultura. O objectivo da pesquisa dos tipos conjugantes por PCR *gene direct* consistiu na simplificação do processo de caracterização deste comportamento, obviando o trabalho e tempo necessários para cruzar vários isolados em todas as combinações possíveis e esperar vários meses para obter resultados. Até ao presente trabalho, o mesmo procedimento era efectuado para induzir a esporulação teleomórfica das espécies em cultura, pois não era sabido *a priori* qual ou quais os pares de isolados compatíveis. Com a aplicação desta metodologia inovadora neste género de fungos filamentosos ascomicetes, torna-se possível estudar os sistemas de conjugação destes microrganismos e observar as fases sexuadas dos seus ciclos de vida de forma muito mais eficiente e expedita. Os *primers* para este efeito desenhados, podendo não ser universais para este género, uma vez que poucas espécies foram testadas com eles, apresentam um promissor potencial neste sentido, uma vez que amplificam nas presentes quatro espécies, que pertencem aos dois principais e distintos clados da filogenia global dos géneros *Diaporthe/Phomopsis* (Alves A., dados não publicados).

Tendo em conta a ausência de qualquer carácter morfológico que evidentemente pudesse distinguir as espécies em estudo, o teste estatístico *t* de Student foi aplicado aos valores de comprimento e largura de esporos, nomeadamente de conídios α . Foi possível concluir preliminarmente que esta não constitui uma solução para a delimitação das espécies de *Phomopsis* ou *Diaporthe*, pois é frequente que entre duas amostras de esporos de um mesmo isolado ocorram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$; dados não apresentados). Esta observação corrobora a variabilidade morfológica intraespecífica anteriormente reportada por diversos autores, para além da sobreposição destes caracteres entre espécies diferentes, algo patente nos intervalos de dimensões apresentados para estas estruturas. Também as taxas de crescimento das espécies estudadas, embora distinguíveis, são demasiado próximas para serem um robusto carácter taxonómico.

Na presente dissertação foram enumeradas e caracterizadas as espécies de *Phomopsis* e *Diaporthe* presentes no hospedeiro *F. vulgare* em Portugal continental, descritas duas novas espécies (*D. lusitanicae* e *D. neotheicola*) e estabelecida uma relação anamorfo – teleomorfo (*P. theicola* – *D. neotheicola*), corrigindo a anterior relação *P. theicola* – *D. theicola*. Foi demonstrado também que a pesquisa por PCR dos tipos conjugantes destes microrganismos é deveras útil, quer para estudos dos sistemas de conjugação, quer para estudos morfológicos posteriores. Finalmente, é possível concluir que o conceito de

espécie mais fidedigno para estes organismos é o filogenético, pois só através deste foi possível identificar inequivocamente as espécies analisadas. Tendo em conta este facto, reitera-se a necessidade de prosseguir os estudos taxonómicos de fungos fitopatogénicos, corrigindo as suas classificações e estabelecendo a ponte entre as abordagens clássicas e as abordagens moleculares de identificação de espécies.

REFERÊNCIAS

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ, 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403–410.

Birdane F, Cemek M, Birdane Y, Gülçin I, Büyükokuroğlu M, 2007. Beneficial effects of *Foeniculum vulgare* on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. *World J Gastroenterol* 13(4), 607–611.

Black BD, Padgett GB, Russin JS, Griffin JL, Snow JP, Gerggren Jr. GT, 1996. Potential weed hosts for *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, causal agent for soybean stem canker. *Pl Dis* 80, 763–765.

Brayford D, 1990. Variation in *Phomopsis* isolates from *Ulmus* species in the British Isles and Italy. *Mycol Res* 94, 691–697.

Câmara M de S, 1947. Mycetes aliquot Lusitaniae XI. *Agronomia Lusitânica* 9, 85–128.

Castlebury LA, Farr DF, Rossman AY, Jaklitsch W, 2003. *Diaporthe angelicae* comb. nov., a modern description and placement of *Diaporthopsis* in *Diaporthe*. *Mycoscience* 44, 203–208.

Curzi M, 1927. De novis Theae micromycetibus pathogenis. *Atti dell'Istituto Botanico della Università e Laboratorio Crittogamico di Pavia* 3(3), 59–72, 2 tabs.

Debuchy R, Turgeon BG, 2006. Mating-type structure, evolution and function in Euscomycetes. In: *The Mycota, growth, differentiation and sexuality*, 2nd Ed. Kües U, Fischer R (eds.). *Springer, Berlin*, pp 293–323.

Du Manoir J, Vegh I, 1981. *Phomopsis foeniculi* spec. nov. sur Fenouil (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Phytopath Z* 100, 319–330.

Eriksson OE, 1992. The non-lichenized pyrenomycetes of Sweden. *Bjtryck, Lund, Sweden*.

Fabre MJH, 1883. Spheriacees du Departement de Vaucluse. *Ann Sci Nat Bot Ser* 6 15, 31–69.

Farr DF, Castlebury LA, Pardo-Schultheiss RA, 1999. *Phomopsis amygdale* causes peach shoot blight of cultivated peach trees in the southeastern United States. *Mycologia* 91, 1008–1015.

Farr DF, Rossman AY, Palm ME, McCray EB, 2008. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved June 14, 2008, from <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>.

Felsenstein J, 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 6, 227–242.

Glass NL, Metzenberg RL, Raju NB, 1990. Homothallic Sordariaceae from nature: the absence of strains containing only the a mating-type sequence. *Exp Mycol* 14, 274–289.

Hall TA, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41, 95–98.

Heitman J, Kronstad J, Taylor J, Casselton L, 2007. Sex in Fungi: Molecular Determination and Evolutionary Implications 1st Ed. *ASM Press*, pp 43–45.

Kanematsu S, Adachi Y, Ito T, 2007. Mating-type *loci* of heterothallic *Diaporthe* spp.: homologous genes are present in opposite mating-types. *Curr Genet* 52, 11–22.

Kirk PM, Spooner BM, 1984. An account of the fungi of Arran, Gigha and Kintyre. *Kew Bull* 38, 503–597.

Linders EGA, van der Aa HA, 1995. Taxonomy, sexuality and mating types of *Diaporthe adunca*. *Mycol Res* 99, 1409–1416.

Metzenberg RL, Glass NL, 1990. Mating type and mating type strategies in *Neurospora*. *Bioessays* 12, 53–59.

Meyer W, Koch A, Niemann C, Beyermann B, Epplen JT, Börner T, 1991. Differentiation of species and strains among filamentous fungi by DNA fingerprinting. *Curr Genet* 19, 239–242.

Meyer W, Mitchell TG, Freedman EZ, Vilgalys R, 1993. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 31(9), 2274–2280.

Mostert L, Crous PW, Kang JC, Phillips AJL, 2001. Species of *Phomopsis* and a *Libertella* sp. occurring on grapevines with specific reference to South Africa: morphological, cultural, molecular and pathological characterization. *Mycologia* 93, 146–167.

Munk A, 1957. Danish pyrenomycetes. A preliminary flora. *Dansk Bot Ark* 17, 1–491.

Muntanola-Cvetkovic M, Vukojevic J, Mihaljčević M, 1991. The systemic nature of the sunflower disease caused by *Diaporthe helianthi*. *Can J Bot* 69, 1552–1556.

Nilsson RH, Ryberg M, Kristiansson E, Abarenkov K, Larsson K-H, Kõljalg U, 2006. Taxonomic Reliability of DNA Sequences in Public Sequence Databases: A Fungal Perspective. *PLoS ONE* 1(1), e59. doi:10.1371/journal.pone.0000059.

Nitimargi NM, 1935. Studies in the genera *Cytosporina*, *Phomopsis* and *Diaporthe*. VII. Chemical factors influencing spore characters. *Ann Bot* 49, 19–40.

Nitschke T, 1867. Pyrenomycetes Germanici. *Die Kernpilze Deutschlands, Breslau* 1.

O'Donnell K, 1993. *Fusarium* and its near relatives. In: The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics. Reynolds DR, Taylor JW (eds.). *CAB International, Wallingford, UK*, pp 225–233.

Özcan M, Chalchat J, Arslan D, Ates A, Ünver A, 2006. Comparative Essential Oil Composition and Antifungal Effect of Bitter Fennel (*Foeniculum vulgare* ssp. *piperitum*) Fruit Oils Obtained During Different Vegetation. *J Med Food* 9(4), 552–561.

- Parmeter JR, 1958. An effect of substrate on spore form in *Phomopsis*. *Phytopathology* 48, 396–397 (Abstr.).
- Phillips AJL, 1999. The relationship between *Diaporthe perijuncta* and *Phomopsis viticola* on grapevines. *Mycologia* 91, 1001–1007.
- Phillips AJL, 2003. Morphological characterization of *Diaporthe foeniculacea* and its *Phomopsis* anamorph on *Foeniculum vulgare*. *Sydowia* 55, 274–285.
- Rehner SA, Uecker FA, 1994. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer phylogeny and host diversity in the coelomycete *Phomopsis*. *Can J Bot* 72, 1666–1674.
- Smit WA, Viljoen CD, Wingfield BD, Wingfield MJ, Calitz FJ, 1996. A new canker disease of apple, pear, and plum rootstocks caused by *Diaporthe ambigua* in South Africa. *PI Dis* 80, 1331–1335.
- Sneath PHA, Johnson R, 1972. The influence on numerical taxonomic similarities of errors in microbiological tests. *J Gen Microbiol* 72, 377–392.
- Stoykow DY, Denchev CM, 2006. Current knowledge of Diaporthales (Ascomycota) in Bulgaria. *Mycol Balcan* 3, 179–185.
- Sutton BC, 1980. The Coelomycetes - Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata. *CABI Publishing, New York*, pp 569–574.
- Sutton BC, 1996. Records of microfungi from Crete. *Bocconeia* 5(1), 335–350.
- Swofford DL, 2002. PAUP 4.0b10: Phylogenetic analysis using parsimony. *Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA*.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl Acids Res* 25, 4876–4882.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* 22, 4673–4680.
- Uddin W, Stevenson KL, 1997. Pathogenicity of a species of *Phomopsis* causing a shoot blight on peach in Georgia and evaluation of possible infection courts. *PI Dis* 81, 983–989.
- Uddin W, Stevenson KL, 1998. Pathogenic and molecular characterization of three *Phomopsis* isolates from peach, plum and Asian pear. *PI Dis* 82, 732–737.
- Uecker FA, 1988. A world list of *Phomopsis* names with notes on nomenclature, morphology and biology. *Mycol Mem* 13, 1–231.
- van der Aa HA, Noordeloos ME, Gruyter J, 1990. Species concepts in some larger genera of the Coelomycetes. *Stud Mycol* 32, 3–19.
- van Niekerk JM, Groenewald JZ, Farr DF, Fourie PH, Halleen F, Crous PW, 2005. Reassessment of *Phomopsis* species on grapevine. *Australas Plant Pathol* 34, 27–39.

van Rensburg JCJ, Lamprecht SC, Groenewald JZ, Castlebury LA, Crous PW, 2006. Characterisation of *Phomopsis* spp. associated with die-back of rooibos (*Aspalathus linearis*) in South Africa. *Stud Mycol* 55, 65–74.

von Thümen F, 1880. Contributiones ad floram mycologicam lusitanicam. In: O Instituto. *Imprensa da Universidade, Coimbra* 27, 168.

Wehmeyer LE, 1930. Studies on the role of the host in the genus *Diaporthe*. *Papers of the Michigan Academy of Science* 11, 309–328.

Wehmeyer LE, 1933. The genus *Diaporthe* Nitschke and its segregates. *Univ Mich Stud Sci Ser* 9, 1–349.

Weising K, Atkinson RG, Gardner RC, 1995. Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation. *PCR Meth Applications* 4, 249–255.

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. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White JW (eds.). *Academic Press, New York*, pp 315–322.

Yun S, Berbee ML, Yoder OC, Turgeon BG, 1999. Evolution of the fungal self-fertile reproductive life style from self-sterile ancestors. *Proc Natl Acad Sci* 96, 5592–5597.

Zeller A, Rychlik M, 2006. Character Impact Odorants of Fennel Fruits and Fennel Tea. *J Agric Food Chem* 54, 3686–3692.

Agradecimentos

Este trabalho foi desenvolvido no Grupo de Evolução Molecular e Ecologia do Centro de Recursos Microbiológicos (CREM), Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa (FCT – UNL), inserido no projecto FCT PTDC/AGR-AAM/67064/2006 “O género fitopatogénico *Phomopsis* e o seu estado teleomórfico (*Diaporthe*): desenvolvimento e aplicação de conceitos de espécie morfológicos, biológicos e filogenéticos”. Um agradecimento especial ao Professor Rogério Tenreiro pela sua supervisão e pela disponibilização do *software* Bionumerics, no Centro para a Biodiversidade, Genómica Integrativa e Funcional (BioFIG), Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL), e ao Doutor Alan Phillips (Centro de Recursos Microbiológicos, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa), pela coordenação diária do trabalho desenvolvido. Um muito obrigado ao Doutor Satoko Kanematsu (Apple Research Station, National Institute of Fruit Tree Science, NARO, Shimokuriyagawa, Morioka, Japão) pelo envio dos seus isolados de *Diaporthe* tipo-W e tipo-G e ao Doutor Artur Alves (Centro de Estudos do Ambiente e do Mar, Universidade de Aveiro) por fornecer o isolado Ph-C170/1. Os resultados apresentados encontram-se em fase de submissão, sob a forma de artigo científico, na revista Fungal Diversity.

ANEXO I – Fluxo de trabalho

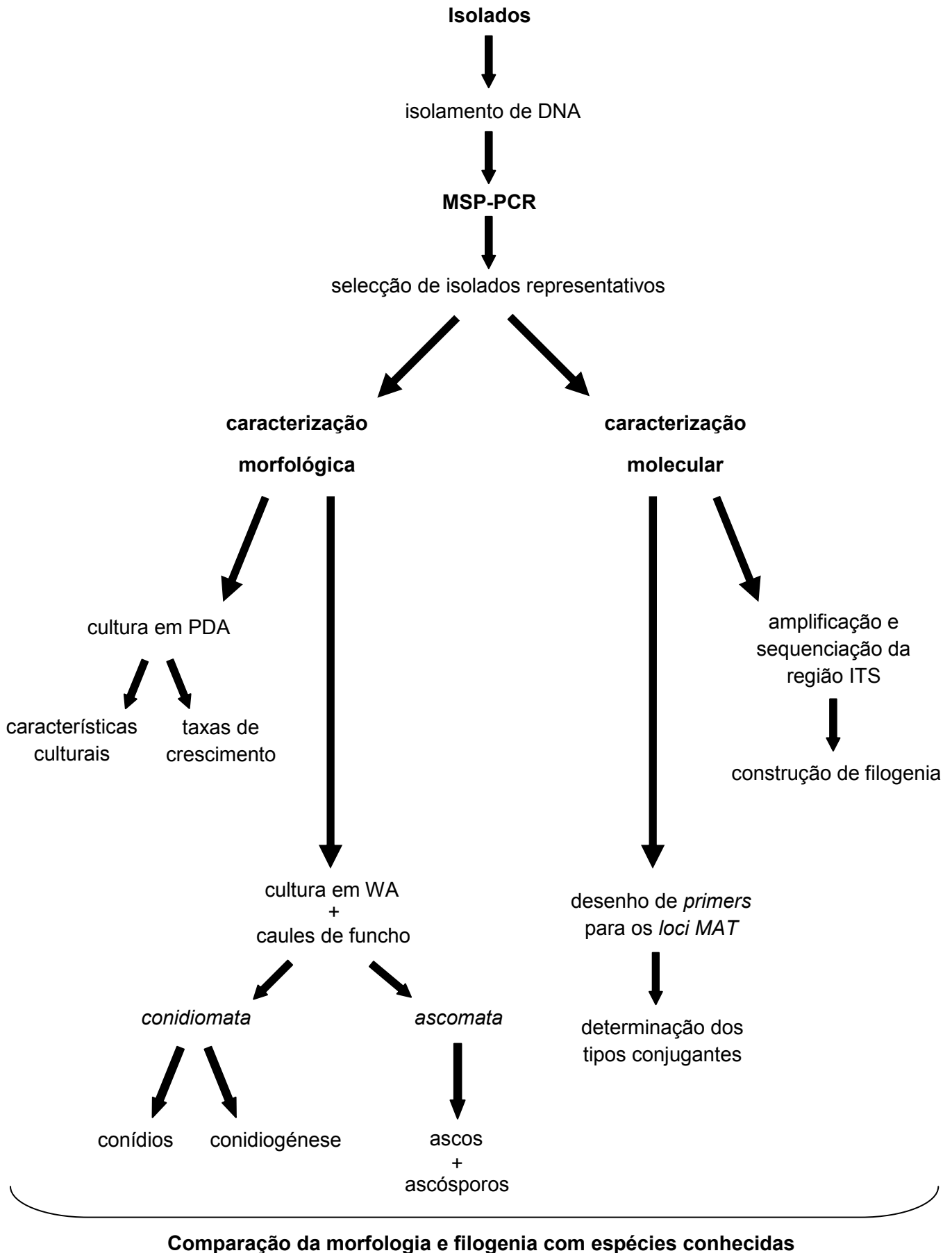


Fig. A1. Fluxo de trabalho realizado. PDA = *potato dextrose agar*, WA = *water agar*.

ANEXO II – Isolados

Tabela AII. Isolados utilizados no presente trabalho.

Espécie	Nº isolado¹	Origem	Colector	Nº acesso GenBank (ITS)²
<i>D. angelicae</i>	Ph-C003/2	Qta. Torre, Caparica	Jorge M. Santos	
	Ph-C005/2	Qta. Torre, Caparica	Jorge M. Santos	
	Ph-C006/1	Qta. Torre, Caparica	Jorge M. Santos	
	Ph-C023/1	Monte de Caparica	Jorge M. Santos	
	Ph-C026/1	Monte de Caparica	Jorge M. Santos	
	Ph-C032/1	EAN, Oeiras	Jorge M. Santos	EU814462
	Ph-C068/2	EAN, Oeiras	Jorge M. Santos	EU814463
	Ph-C094/2	Qta. Torre, Caparica	Jorge M. Santos	EU814464
	Ph-C098/2	Qta. Torre, Caparica	Jorge M. Santos	EU814465
	Ph-C118/1	Monte de Caparica	Jorge M. Santos	EU814466
	Ph-C121/1	Monte de Caparica	Jorge M. Santos	EU814467
	CBS 123215; Ph-C133/1	Malveira da Serra	Alan J. L. Phillips	EU814468
	Ph-C135/1	Malveira da Serra	Alan J. L. Phillips	EU814469
	Ph-C142/2	Torre, Caparica	Jorge M. Santos	EU814470
	Ph-C150/1	Vale Andeiro, Azeitão	Jorge M. Santos	EU814471
	CBS 123214; Ph-C159/1	Qta. Sol, Alenquer	Jorge M. Santos	EU814472
	Ph-C165/2	Qta. Sol, Alenquer	Jorge M. Santos	EU814473
	Ph-C166/1	Faro	Alan J. L. Phillips	EU814474
	Ph-C168/1	Évora	Alan J. L. Phillips	EU814475
	<i>D. lusitanicae</i>	Ph-C086/2 ^T	EAN, Oeiras	Jorge M. Santos
Ph-C170/1		Aveiro	Artur Alves	EU873551
Di-C001/1 ^T		EAN, Oeiras	Jorge M. Santos	
CBS 123213 ¹ ; Di-C001/3 ^T		EAN, Oeiras	Jorge M. Santos	
Di-C001/4 ^T		EAN, Oeiras	Jorge M. Santos	

Espécie	Nº isolado¹	Origem	Colector	Nº acesso GenBank (ITS)²
<i>D. ambigua</i>	CBS 123212 ^T ; Di-C001/5 ^T	EAN, Oeiras	Jorge M. Santos	EU814477
	Di-C001/10 ^T	EAN, Oeiras	Jorge M. Santos	
	Di-C002/1	Vale Andeiro, Azeitão	Jorge M. Santos	
	Di-C002/2	Vale Andeiro, Azeitão	Jorge M. Santos	
	Di-C002/8	Vale Andeiro, Azeitão	Jorge M. Santos	
<i>D. neotheicola</i>	CBS 123211; Di-C002/9	Vale Andeiro, Azeitão	Jorge M. Santos	EU814478
	Di-C003/2	Vale Andeiro, Azeitão	Jorge M. Santos	
	Di-C003/6	Vale Andeiro, Azeitão	Jorge M. Santos	
	CBS 123210; Di-C003/10	Vale Andeiro, Azeitão	Jorge M. Santos	EU814479
	Di-C004/1 ^T	Évora	Alan J. L. Phillips	
<i>D. tipo-G</i>	CBS 123209 ^T ; Di-C004/4 ^T	Évora	Alan J. L. Phillips	
	CBS 123208 ¹ ; Di-C004/5 ^T	Évora	Alan J. L. Phillips	EU814480
	Di-C004/9 ^T	Évora	Alan J. L. Phillips	
	930811-14	Ibaraki, Japão	Satoko Kanematsu	AB302255
<i>D. tipo-W</i>	930811-17	Ibaraki, Japão	Satoko Kanematsu	
	P-Pt-16	Ibaraki, Japão	Satoko Kanematsu	AB302245
	P-Pt-19	Ibaraki, Japão	Satoko Kanematsu	

¹CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda; Ph-C & Di-C: Coleção de culturas sediada no Centro de Recursos Microbiológicos (CREM), Caparica, Portugal.

²ITS: *internal transcribed spacer*.

^T Cultura ex-tipo.

EAN: Estação Agronómica Nacional.

ANEXO III – Curvas de crescimento

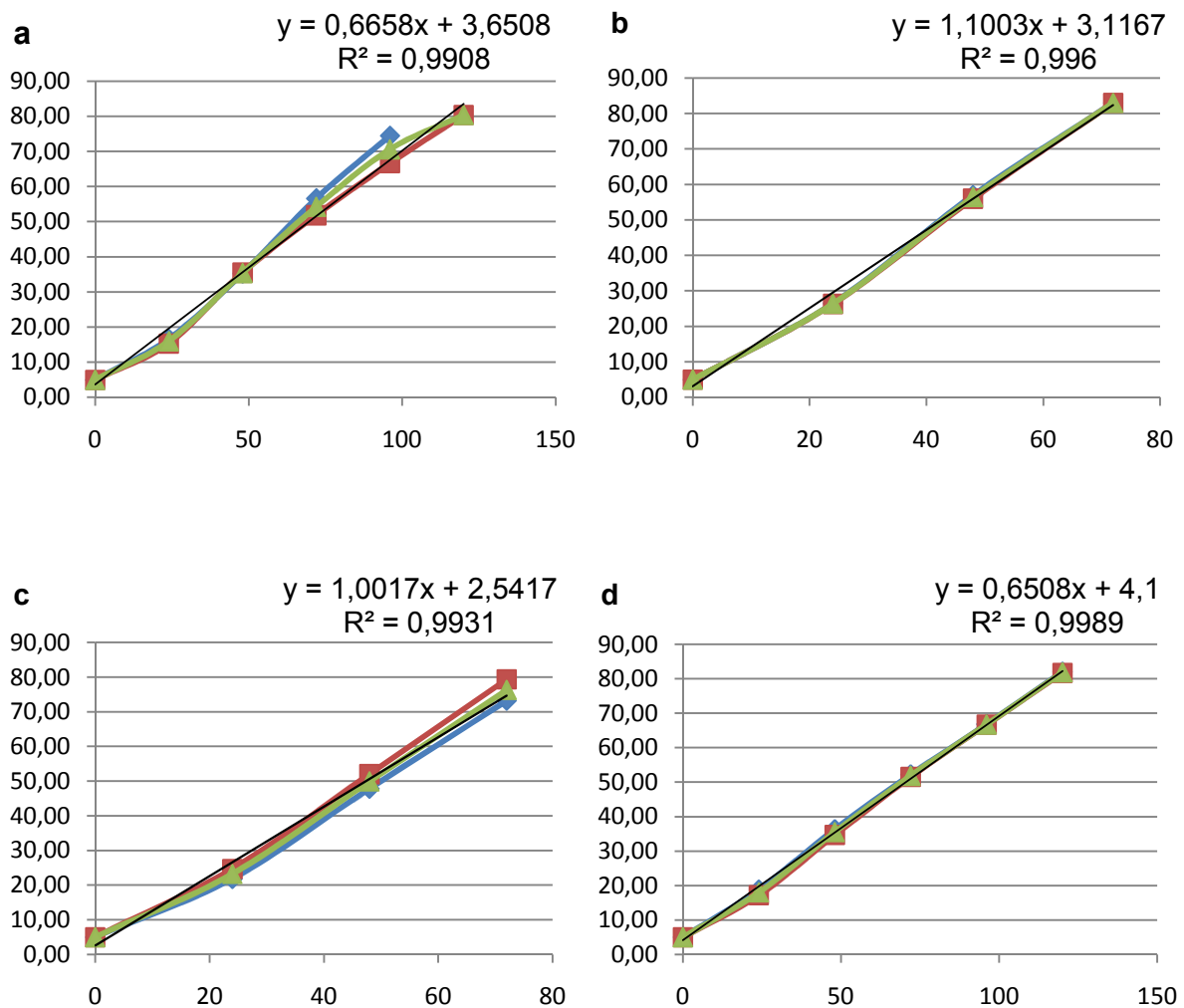


Fig. AIII. Curvas de crescimento de a) *Diaporthe angelicae*, b) *Diaporthe ambigua*, c) *Diaporthe lusitanicae* e d) *Diaporthe neotheicola*, obtidas por medição de diâmetros de culturas em PDA, a 25 °C. O eixo xx representa tempo (h) e o eixo yy representa diâmetro (mm). a, curva de crescimento de Ph-C032/1 a azul e de Ph-C159/1 a vermelho. b, curva de crescimento de Di-C002/2 a azul e de Di-C003/2 a vermelho. c, curva de crescimento de Di-C001/1^T a azul e de Di-C001/3^T a vermelho. d, curva de crescimento de Di-C004/1^T a azul e de Di-C004/4^T a vermelho. Cada ponto destas rectas corresponde à média de 6 medições. As rectas verdes correspondem às rectas médias das medições feitas para os dois isolados de cada espécie (cada ponto corresponde portanto à média de 12 medições). A partir das rectas médias foram traçadas rectas de regressão linear para traduzir o crescimento das espécies. As suas equações e coeficiente de correlação (R^2) estão indicados em cada gráfico. Para $t = 0$ h, diâmetro = 5 mm, pois este foi o diâmetro dos inóculos utilizados.
^T Cultura ex-tipo.