



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA/FITOTECNIA

JAMILLE RABÊLO DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO E DIVERSIDADE DE *Lasiodiplodia* spp. ASSOCIADAS À
QUEIMA DAS FOLHAS E PODRIDÃO PEDUNCULAR DE FRUTOS EM
COQUEIROS NO NORDESTE BRASILEIRO**

FORTALEZA

2024

JAMILLE RABÊLO DE OLIVEIRA

CARACTERIZAÇÃO E DIVERSIDADE DE *Lasiodiplodia* spp. ASSOCIADAS À
QUEIMA DAS FOLHAS E PODRIDÃO PEDUNCULAR DE FRUTOS EM COQUEIROS
NO NORDESTE BRASILEIRO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Agronomia. Área de concentração: Fitotecnia.

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Souza Lima
Coorientadora: Dra. Patricia do Nascimento Bordallo

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- O47 Oliveira, Jamille Rabêlo de.
Caracterização e diversidade de *Lasiodiplodia* spp. associadas à queima das folhas e podridão peduncular de frutos em coqueiros no Nordeste brasileiro / Jamille Rabêlo de Oliveira. – 2024.
93 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia), Fortaleza, 2024.
Orientação: Prof. Dr. Cristiano Souza Lima.
Coorientação: Prof. Dr. Patricia do Nascimento Bordallo.
1. Análise filogenética. 2. Botryosphaeriaceae. 3. *Cocos nucifera*. I. Título.

CDD 630

JAMILLE RABÊLO DE OLIVEIRA

CARACTERIZAÇÃO E DIVERSIDADE DE *Lasiodiplodia* spp. ASSOCIADAS À
QUEIMA DAS FOLHAS E PODRIDÃO PEDUNCULAR DE FRUTOS EM COQUEIROS
NO NORDESTE BRASILEIRO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Agronomia. Área de concentração: Fitotecnia.

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Souza Lima
Coorientadora: Dra. Patricia do Nascimento Bordallo

Aprovada em 16/08/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cristiano Souza Lima (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Patricia do Nascimento Bordallo (Coorientadora)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

Prof. Dr. André Angelo Medeiros Gomes
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Dra. Christiana de Fátima Bruce da Silva
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

Prof. Dr. Danilo Batista Pinho
Universidade de Brasília (UnB)

Dra. Eliane Mayumi Inokuti
Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

A Deus.

Aos meus pais, Maria das Graças e José
Aumérito pelo apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde, força e coragem durante toda a minha caminhada, consolo nos momentos difíceis e por me conduzir com amor nessa jornada.

À Universidade Federal do Ceará e ao Programa da Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia pela oportunidade de realização do curso.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cristiano Souza Lima, pela atenção, orientações, paciência, incentivo e amizade durante a realização do curso.

À minha coorientadora Dra. Patricia do Nascimento Bordallo pelos ensinamentos transmitidos.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), pela oportunidade da realização de parte do meu trabalho e a pesquisadora Dra. Christiana de Fátima Bruce da Silva por todo apoio técnico e científico prestado.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Agronomia por todo apoio.

Ao técnico do Laboratório de Micologia da UFC e amigo, Israel Andrade, pelo auxílio na execução do trabalho, companheirismo e amizade. Ao técnico do Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular Aplicada à Agricultura (BIOAGRI) da UFC, Dr. Francisco de Assis Câmara Rabelo Filho e à técnica do Laboratório Biologia Molecular da EMBRAPA, Myrella Tabosa, por todo o auxílio prestado.

Aos membros da banca avaliadora, que dedicaram tempo e esforço para a análise do trabalho.

Agradeço à toda equipe do Laboratório de Micologia - UFC e amigos que fiz durante o curso, em especial à Mayumi Inokuti que se tornou uma grande amiga. Diene Miranda, Wallysson Lima, Mirla Almeida, Regimara Bernado, Maria Vitória, Gustavo Freire, Gabriela Marques, pelo apoio, conhecimento compartilhado e momentos de alegria.

Aos meus pais, José Aumérito de Oliveira e Maria das Graças Rabelo, ao meu irmão José Aumérito de Oliveira Júnior e toda a minha família pelo amor e incentivo.

Às minhas amigas que são irmãs do coração, Germana Almeida, Islândia Saraiva, Marta Lima, Juliana Lima e Lara Lima, que mesmo distantes, sempre acreditaram em mim e me deram força para continuar seguindo minha trajetória.

A todos que contribuíram e participaram direta ou indiretamente para a concretização deste sonho, minha eterna gratidão.

RESUMO GERAL

O cultivo do coqueiro (*Cocos nucifera*) encontra-se distribuído por quase todo o Brasil. No entanto, o Nordeste se destaca como a principal região produtora de coco no país, sendo os estados do Ceará, Bahia e Pernambuco os maiores produtores. Dentre as doenças que acometem a cultura, a queima das folhas e a podridão peduncular causadas por *Lasiodiplodia* spp. são reponsáveis por perdas na cultura em campo e na pós-colheita, respectivamente. O objetivo deste trabalho foi identificar os agentes etiológicos da queima das folhas em coqueiro e a podridão peduncular do coco, e caracterizar a diversidade genética de *Lasiodiplodia theobromae sensu stricto* do coqueiro no Nordeste brasileiro. Para isto, foram obtidos e preservados 188 isolados de *Lasiodiplodia* spp. associados a coqueiros no Nordeste brasileiro. Em seguida, selecionou-se 50 isolados representativos das regiões amostradas para identificação das espécies de *Lasiodiplodia* associadas ao coqueiro por meio de análises filogenéticas baseadas na região do espaçador interno transcrito (ITS) do rDNA, e nos genes fator de alongação 1- α (*TEF1*), β - tubulina (*TUB2*) e a segunda maior subunidade da RNA polimerase II (*RPB2*), bem como, a análise de haplótipos existentes. Para os representantes das espécies encontradas, foi realizada a caracterização morfológica, cultural e a avaliação da patogenicidade. Para o estudo da diversidade genética de *L. theobromae sensu stricto*, espécie predominante dentre os isolados obtidos do coqueiro, foram utilizados marcadores moleculares do tipo *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR). Entre os 50 isolados selecionados provenientes de diferentes órgãos do coqueiro dos estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco e Rio Grande do Norte, foram identificadas quatro espécies e 20 haplótipos de *Lasiodiplodia*, sendo *L. brasiliensis*, *L. hormozganensis*, *L. pseudotheobromae* e *L. theobromae sensu stricto*. *Lasiodiplodia theobromae sensu stricto* foi a espécie mais frequente (84%), seguida por *L. brasiliensis* (12%), *L. pseudotheobromae* (2%) e *L. hormozganensis* (2%). Os isolados foram todos patogênicos e estes variaram quanto à agressividade, sendo *L. pseudotheobromae* a mais agressiva dentre as espécies. Este estudo representa o primeiro relato de *L. hormozganensis* como agente causal da podridão peduncular em frutos de coco. Três *primers* de ISSR utilizados nesta pesquisa (UBC 884, UBC 811 e UBC 825) mostraram um nível moderado de polimorfismo e os *primers* UBC 810, UBC 818, UBC 840, UBC 880, UBC 885, UBC 888, UBC 890, (GA)⁹T foram pouco informativos. As populações de *L. theobromae sensu stricto* em coqueiros no Nordeste brasileiro avaliadas neste estudo, apresentaram baixa diversidade genética e não mostraram estrutura populacional.

Palavras-chave: análise filogenética; Botryosphaeriaceae; *Cocos nucifera*; ISSR.

GENERAL ABSTRACT

Coconut (*Cocos nucifera*) cultivation is distributed throughout most of Brazil. However, the Northeast region stands out as the main coconut-producing region in the country, with the States of Ceará, Bahia and Pernambuco being the largest producers. Among the diseases that affect the crop, leaf blight and stem-end rot caused by *Lasiodiplodia* spp. are responsible for crop losses in the field and in post-harvest, respectively. The objective of this study was to identify the etiological agents of leaf blight and stem-end rot in coconut, and to characterize the genetic diversity of *Lasiodiplodia theobromae sensu stricto* in coconut in the Brazilian Northeast. For this purpose, 188 isolates of *Lasiodiplodia* spp. associated with coconut trees in the Brazilian Northeast were obtained and preserved. Then, 50 representative isolates from the sampled regions were selected to identify the *Lasiodiplodia* species associated with coconut palms through phylogenetic analyses based on the internal transcribed spacer (ITS) region of rDNA, and the genes elongation factor 1- α (*TEF1*), β -tubulin (*TUB2*) and the second largest subunit of RNA polymerase II (*RPB2*), as well as the analysis of existing haplotypes. Morphological and cultural characterizations and pathogenicity trials were performed for the representatives of the species found. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) molecular markers were used to study the genetic diversity of *L. theobromae sensu stricto*, the predominant species among the isolates obtained from coconut palms. Among the 50 isolates selected from different organs of coconut trees in the States of Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco and Rio Grande do Norte, four species and 20 haplotypes of *Lasiodiplodia* were identified, namely *L. brasiliensis*, *L. hormozganensis*, *L. pseudotheobromae* and *L. theobromae sensu stricto*. *Lasiodiplodia theobromae sensu stricto* was the most frequent species (84%), followed by *L. brasiliensis* (12%), *L. pseudotheobromae* (2%) and *L. hormozganensis* (2%). The isolates were all pathogenic and varied in aggressiveness, with *L. pseudotheobromae* being the most aggressive among the species. This study represents the first report of *L. hormozganensis* as a causal agent of stem-end rot in coconut fruits. Three ISSR primers used in this research (UBC 884, UBC 811 and UBC 825) showed a moderate level of polymorphism and the primers UBC 810, UBC 818, UBC 840, UBC 880, UBC 885, UBC 888, UBC 890, (GA)⁹T were uninformative. The populations of *L. theobromae sensu stricto* in coconut trees in Northeastern Brazil evaluated in this study, presented low genetic diversity and did not show population structure.

Keywords: phylogenetic analysis; Botryosphaeriaceae; *Cocos nucifera*; ISSR.

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO GERAL | 10 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 12 |
| 2.1 | Importância da cultura do coco | 12 |
| 2.2 | Doenças no coqueiro | 13 |
| 2.3 | <i>Lasiodiplodia theobromae sensu lato</i> | 16 |
| 2.4 | Caracterização molecular de <i>Lasiodiplodia theobromae sensu lato</i> | 18 |
| 2.5 | Diversidade genética com marcadores moleculares ISSR | 19 |
| 3 | CAPÍTULO I: FILOGENIA, MORFOLOGIA E PATOGENICIDADE DE <i>LASIODIPLODIA</i> spp. CAUSANDO QUEIMA DAS FOLHAS E PODRIDÃO PEDUNCULAR DO COCO NO NORDESTE BRASILEIRO | 27 |
| 3.1 | Introdução | 28 |
| 3.2 | Material e métodos | 30 |
| 3.2.1 | <i>Coleta, isolamento e preservação dos isolados de Lasiodiplodia</i> | 30 |
| 3.2.2 | <i>Extração, amplificação e sequenciamento de DNA</i> | 31 |
| 3.2.3 | <i>Análises filogenéticas dos isolados de Lasiodiplodia</i> | 34 |
| 3.2.4 | <i>Caracterização morfológica e cultural de isolados de Lasiodiplodia spp.</i> .. | 40 |
| 3.2.5 | <i>Avaliação da patogenicidade de isolados de Lasiodiplodia spp.</i> | 40 |
| 3.3 | Resultados | 41 |
| 3.3.1 | <i>Obtenção dos isolados</i> | 41 |
| 3.3.2 | <i>Análise filogenética</i> | 43 |
| 3.3.3 | <i>Distribuição de espécies de Lasiodiplodia</i> | 48 |
| 3.3.4 | <i>Caracterização morfológica e cultural das espécies de Lasiodiplodia</i> | 51 |
| 3.3.5 | <i>Caracterização patogênica dos isolados</i> | 54 |
| 3.4 | Discussão | 56 |
| 4 | CAPÍTULO II: ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE <i>Lasiodiplodia theobromae sensu stricto</i> ASSOCIADOS À QUEIMA DAS FOLHAS E PODRIDÃO PEDUNCULAR DO COCO NO NORDESTE DO BRASIL | 66 |
| 4.1 | Introdução | 67 |
| 4.2 | Material e métodos | 70 |
| 4.2.1 | <i>Análise da diversidade genética e estrutura populacional de L. theobromae sensu stricto por meio de marcadores ISSR</i> | 71 |
| 4.2.2 | <i>Análise dos dados de ISSR</i> | 72 |

| | | |
|--------------|-------------------------------------|----|
| 4.3 | Resultados | 73 |
| 4.3.1 | <i>Diversidade genética</i> | 73 |
| 4.3.2 | <i>Estrutura populacional</i> | 75 |
| 4.4 | Discussão | 76 |
| 5 | CONCLUSÃO | 84 |
| | REFERÊNCIAS | 85 |

1 INTRODUÇÃO GERAL

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) pertence à família Arecaceae (Palmae) (Liyanage, 1958) e possui algumas variedades: *Cocos nucifera* var. *typica* conhecida como coqueiro gigante no Brasil e a *Cocos nucifera* var. *nana*, denominada coqueiro anão. É uma das espécies perenes de grande relevância global devido à sua capacidade de gerar emprego e renda através do cultivo comercial (Benassi; Fanton; Santana, 2013).

Conforme dados da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* – FAO, em 2023, os maiores produtores do coqueiro no cenário mundial, são Indonésia, Filipinas, Índia e Brasil respectivamente (FAOSTAT, 2025). No Brasil, em 2023, a produção abrange uma área atual de 186.712 mil hectares e uma produção de 1.932.282 t. (IBGE, 2025). O Nordeste é a principal região produtora de coco no Brasil, tendo produzido, em 2023, 1.545.435 t., o que corresponde a 82,7% da área colhida e a 80% da produção nacional total. (IBGE, 2025). Os principais estados produtores de coco no país, em 2023, são Ceará, com 519.037 t.; a Bahia, com 387.404 t.; e Pernambuco, com 245.832 t. de frutos (IBGE, 2025).

A produção de coco enfrenta várias limitações devido a diversos fatores, sendo que a ocorrência de doenças tem um impacto significativo, causando uma redução considerável na produção e na qualidade dos produtos (Brito *et al.*, 2002; Rosado *et al.*, 2016).

A queima das folhas, causada por *Lasiodiplodia* spp., é uma das doenças de grande relevância na cocoicultura resultando em sérios prejuízos econômicos (Santos *et al.*, 2020; Coelho *et al.*, 2022). Em alguns casos, a doença pode causar perdas superiores a 50% na produção (Benassi; Fanton; Santana, 2013). A doença começa com o sintoma de escurecimento das folhas mais velhas, progredindo para ressecamento e morte prematura (Talamini; Ferreira; Ramos, 2013).

A podridão peduncular do coco é considerada uma das principais doenças pós-colheita do coco no Brasil, representando uma séria ameaça e causando perdas significativas (Viana *et al.*, 2007). Durante a colheita, o fungo permanece quiescente abaixo das brácteas, quando este é armazenado em condições ambientais, o patógeno começa a colonizar os tecidos do mesocarpo, iniciando a podridão (Viana *et al.*, 2002; Viana *et al.*, 2007; Rosado *et al.*, 2016).

As doenças da queima das folhas e podridão peduncular do coco estão associadas ao fungo *Lasiodiplodia theobromae sensu lato* (Pat.) Griff. & Maubl., pertencente à família Botryosphaeriaceae (Abdollahzadeh *et al.*, 2010; Phillips *et al.*, 2019). Durante muito tempo, acreditou-se que *L. theobromae sensu lato* fosse a única espécie dentro do gênero, responsável por diversas doenças, incluindo as doenças no coqueiro. Este fato ocorreu devido a identificação

ser baseada principalmente pelas características morfológicas e culturais do patógeno (Coutinho *et al.*, 2017). No entanto, observou-se que a dependência exclusiva de características morfológicas pode subestimar a verdadeira diversidade de espécies (Taylor *et al.*, 2000).

Técnicas moleculares que utilizam o sequenciamento de DNA têm proporcionado novas abordagens na pesquisa científica, especialmente na identificação filogenética de espécies de fungos (Crous *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2013; Slippers *et al.*, 2013). Diante disso, a identificação e diferenciação das espécies passaram a ser realizadas por meio do sequenciamento de genes específicos e pela construção de filogenias multigênicas (Slippers *et al.*, 2017). A região do espaçador interno transcrito (ITS) do rDNA, juntamente com genes codificadores de proteínas como fator de elongação 1- α (*TEF1*), β -tubulina (*TUB2*) e a região da segunda maior subunidade da RNA polimerase II (*RPB2*), têm sido amplamente utilizados para a resolução das espécies de *Lasiodiplodia* com alto suporte filogenético (Abdollahzadeh *et al.*, 2010; Cruywagen *et al.*, 2017; Phillips *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021).

Para os estudos da diversidade genética e estrutura populacional também tem sido utilizado marcadores moleculares, pois possuem a capacidade em detectar variações no DNA sem serem influenciados pelos efeitos do ambiente. O marcador molecular do tipo *Inter simple sequence repeats* (ISSR), apresenta vantagens, tais como: requer pouca infraestrutura em termos de equipamentos de laboratório para execução dos experimentos; possui alta reprodutibilidade; é altamente polimórfico; e é um marcador molecular universal, podendo ser utilizado em diversas espécies (Zietkiewicz, Rafalski, Labuda, 1994; Reddy *et al.*, 2002; Borba *et al.*, 2005).

Apesar da elevada importância econômica do coqueiro no Brasil e a perda produtiva devido às espécies de *Lasiodiplodia* causadoras da queima das folhas do coqueiro e da podridão peduncular do coco ser conhecida, até o momento não foi realizado um estudo com um maior número de isolados das principais regiões produtoras no Nordeste, utilizando técnicas moleculares, morfológicas e patogênicas para a correta identificação destes patógenos. Além de também não haver pesquisas para investigar a diversidade genética e a estrutura populacional de isolados de *Lasiodiplodia* associados ao coqueiro utilizando marcadores do tipo ISSR. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi identificar os agentes etiológicos da queima das folhas em coqueiro e a podridão peduncular do coco, e caracterizar a diversidade genética de *L. theobromae sensu stricto* do coqueiro no Nordeste brasileiro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância da cultura do coco

O coqueiro é uma monocotiledônea, pertencente à família Arecaceae (Palmae), gênero *Cocos*, espécie *Cocos nucifera* L. (Liyanage, 1958). Esta espécie é composta por algumas variedades, *Cocos nucifera* var. *typica*, conhecida no Brasil como coqueiro gigante e *Cocos nucifera* var. *nana* denominada como coqueiro anão (Benassi; Fanton; Santana, 2013). A variedade anã é composta pelas cultivares Verde, Amarela e Vermelha (Silva *et al.*, 2017). Um terceiro tipo, o híbrido, pode ser proveniente do cruzamento inter e/ou intravarietal (Sobral, 2018).

A planta é de clima tropical, cultivada em torno de 90 países e para a maioria dos autores, o Sudeste Asiático é considerado o principal local de origem (Costa *et al.*, 2005). O coqueiro foi introduzido no Brasil pelos portugueses, por volta de 1553, no estado da Bahia, recebendo a denominação de coco-da-baía, através de mudas e sementes trazidas das ilhas de Cabo Verde (Silva, 2014).

É considerada uma das espécies perenes de grande relevância no mundo, pois o cultivo comercial detém a capacidade de gerar emprego e renda (Benassi; Fanton; Santana, 2013). É uma planta de uso versátil, e os frutos são considerados a parte nobre da planta com maior interesse comercial, podendo ser comercializados ainda verdes (imaturos) para o consumo de água de coco ou secos para a agroindústria e para utilização na culinária de forma geral (Martins; Jesus Junior, 2014). A fibra e o pó da fibra podem ser utilizados para diferentes utilidades, bem como a madeira (Aragão *et al.*, 2002; Oleke *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2019). Além disso, o coqueiro é considerado uma planta ornamental, compondo a paisagem de diversos espaços públicos e privados (Costa *et al.*, 2005).

Conforme dados da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* – FAO, em 2023, os maiores produtores do coqueiro no cenário mundial são os países da Ásia, à exemplo da Indonésia, Filipinas e Índia, correspondendo a aproximadamente 73% da produção mundial, enquanto o restante se distribui nos países da América Latina, África e Oceania. De acordo com a FAO (2025), a cocoicultura no Brasil vem se destacando nos últimos anos. O país ocupava a 10º posição no ranking mundial de produção em 1990 e atualmente o país encontra-se na 4º posição (FAOSTAT, 2025).

A produção de coco encontra-se distribuída por quase todo o Brasil e, em 2023, a área colhida foi de 186.712 ha, com uma produção total de 1.932.282 t. (IBGE, 2025). No Brasil, o cultivo de coco é predominantemente realizado com a variedade coqueiro-anão-verde, que se destaca pela alta produtividade e menor porte, sendo muito usado na produção de água de coco devido à sua precocidade. Em segundo lugar, encontra-se o coqueiro-gigante, tradicionalmente cultivado para a produção de coco seco e seus derivados. Por fim, o coqueiro-híbrido, resultado do cruzamento entre o anão e o gigante, é amplamente utilizado na produção comercial intensiva, visando alta produtividade e qualidade tanto para água de coco quanto para copra (Benassi; Fanton; Santana, 2013).

O Nordeste é a principal região produtora nacional, cuja posição foi conquistada desde a introdução do coqueiro no país e que ainda vem se mantendo, devido às condições edafoclimáticas favoráveis nas zonas litorâneas. Nessa região, a produção foi de 1.545.435 t. de coco, em 2023, correspondendo a 82,7% da área colhida de coco do Brasil e 80% de sua produção nacional total (IBGE, 2024). Os maiores estados produtores de coco no Brasil, em 2023, foram o Ceará, com 519.037 t.; a Bahia, com 387.404 t.; e Pernambuco, com 245.832 t. de frutos (IBGE, 2025).

Desde 1990 as áreas de cultivo da cultura estão em expansão para outras regiões do Brasil (Silva *et al.*, 2017). Em 2023, a região Sudeste foi a segunda região com maior produção de coco, produzindo 190.094 t. de frutos, sendo a produção concentrada no estado do Espírito Santo. A região Norte é a terceira no ranking de produção nacional, produzindo 184.276 t. de frutos, sendo o estado do Pará o maior produtor da região (IBGE, 2025).

2.2 Doenças no coqueiro

A produção de coco é limitada por alguns fatores, a exemplo da não adoção de práticas de manejo, a baixa fertilidade natural dos solos, déficit hídrico e a incidência de pragas e doenças (Marinho; Gheyi; Fernandes, 2006; Fontes, 2010). Este último é um fator que causa redução considerável na produção e qualidade de seus produtos (Brito *et al.*, 2002; Rosado *et al.*, 2016).

No Brasil, em quase todas as regiões produtoras de coco, são encontradas diversas doenças que atacam a planta nas diferentes fases de seu desenvolvimento, incidindo sobre o sistema radicular, estipe, folhas, inflorescência e frutos (Benassi; Fanton; Santana, 2013). Essas doenças podem ser causadas por diversos patógenos afetando negativamente a produção (Warwick *et al.*, 1997). As principais são as lixas, grande e pequena, que tem como agentes

causais os ascomicetos *Camarotella acrocomiae* (Mont.) Hyde e Cannon e *Camarotella torrendiella* (Batista) Bezerra & Vitória, respectivamente (Vitória *et al.*, 2008; Monteiro *et al.*, 2013); mancha foliar ou helmintosporiose causada pelo fungo *Bipolaris* spp. (Niu *et al.*, 2014); a resinose e o anel vermelho, cujos agentes causais respectivamente são *Thielaviopsis paradoxa* (De Seynes) Höhn e *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb) Baujard (Duarte *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2016); bem como, a murcha-de-fitomonas causado pelo patógeno *Phytomonas* spp. (Fontes; Ferreira, 2006).

Além dessas, outra doença que possui grande relevância na cocoicultura é a queima das folhas causada por *Lasiodiplodia* spp. (Santos *et al.*, 2020; Coelho *et al.*, 2022). No Brasil, a queima das folhas do coqueiro foi relatada pela primeira vez no estado de Sergipe por Souza Filho, Santos e Robbs (1979) e atualmente tem sido relatada em outros estados do Nordeste, Norte e Sudeste do país causando sérios prejuízos e, em certos casos, ocasionando perda superior a 50% da produção (Benassi; Fanton; Santana, 2013). Na região Nordeste a doença foi relatada nos estados de Sergipe, Pernambuco, Bahia, Alagoas, Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará (Correia; Costa, 2005; Benassi; Fanton; Santana, 2013; Talamini; Ferreira; Ramos, 2013; Santos *et al.*, 2020; Coelho *et al.*, 2022). Enquanto que na região Norte, a queima das folhas foi relatada no Pará e no Sudeste, nos estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro (Benassi; Fanton; Santana, 2013; Santos *et al.*, 2020).

A queima das folhas inicia-se com o sintoma de empardecimento da folha, evoluindo posteriormente para um ressecamento, levando-as à morte prematura. O sintoma ocorre principalmente nas folhas mais velhas, onde é possível observar a lesão em forma de “V”, de coloração marrom-avermelhada observada nas extremidades das folhas que progride em direção a raque (Talamini; Ferreira; Ramos, 2013) (Figura 1.a). Quando a raque é atingida ocorre a seca e a queda prematura das folhas mais velhas, as quais servem de sustentação aos cachos, ocasionando a queda dos frutos antes de completarem a maturação (Warwick; Talamini, 2009; Moura *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2020).

Os sintomas podem ocorrer em qualquer idade da planta (Souza Filho; Santos; Robbs, 1979; Correia; Costa, 2005) e durante o ano todo, sendo as maiores intensidades observadas em períodos com temperaturas mais elevadas e baixa umidade relativa do ar e baixa precipitação (Ram, 1989). Outros fatores, como déficit hídrico e estado nutricional da planta favorecem o aumento da severidade da doença evidenciado pelo aumento das lesões (Benassi; Fanton; Santana, 2013).

Doenças também ocorrem no fruto (coco), sendo a podridão peduncular a principal doença pós-colheita do coco no Brasil, representando uma séria ameaça e perdas significativas

(Viana *et al.*, 2007). O primeiro relato de podridão peduncular no Brasil ocorreu em meados de 2001, no estado do Ceará, quando a associação Grupo do Coco do Ceará iniciou suas exportações para a Europa e foi detectado no país de destino um grande número de frutos com sintomas da doença, ocasionando considerável prejuízo (Viana *et al.*, 2002). Posteriormente, a podridão peduncular do coco também foi relatada em Minas Gerais, Bahia, Pernambuco e Paraíba (Rosado *et al.*, 2016; Coelho *et al.*, 2022).

Durante a colheita, os sintomas de infecção não são visíveis, pois o fungo encontra-se quiescente abaixo das brácteas (Viana *et al.*, 2002; Rosado *et al.*, 2016). No entanto, quando o fruto é armazenado em condições ambientais favoráveis a sair da quiescência, o patógeno inicia a colonização dos tecidos do mesocarpo causando a podridão (Viana *et al.*, 2007). No início da colonização pode-se observar a anasarca e a formação de uma nítida linha divisória entre o tecido doente e sadio. Aproximadamente 48 h após a infecção a área escurece, tornando-se marrom clara, depois negra e necrótica, enquanto a anasarca avança para os tecidos sadios (Viana *et al.*, 2002) (Figura 1. c). Dos frutos sintomáticos, podem-se observar sinais do patógeno na forma de um micélio branco-acinzentado e em lesões velhas, é possível encontrar numerosos cirros conidiais formados sobre os picnídios (Viana *et al.*, 2002; Rosado *et al.*, 2016).

A doença deteriora os tecidos e ocasiona fissuras nas partes basais do fruto favorecendo a exsudação de albume líquido (água de coco) inviabilizando a sua comercialização (Mussi-Dias; Freire, 2016).

A resinose do coqueiro é uma doença que afeta principalmente o sistema vascular da planta, provocando obstruções nos vasos condutores e dificultando o transporte da seiva elaborada para as demais partes do coqueiro, comprometendo assim seu funcionamento fisiológico como um todo (Benassi; Fanton; Santana, 2013). Foi registrada pela primeira vez no Sri Lanka, em 1906 (Fontes; Ferreira, 2006). No Brasil, os primeiros relatos da ocorrência da resinose surgiram em 2004 e, desde então, a doença tem se disseminado gradualmente, aumentando o número de propriedades, de focos, e de coqueiros infectados a cada ano (Warwick; Passos, 2009).

A Resinose é uma doença cujo o fungo *Thielaviopsis paradoxa* (De Seynes) Höh é o principal agente causal (Fontes; Ferreira, 2006). A sintomatologia mais característica dessa doença é o aparecimento de lesões escuras no estipe e produção de substância marrom-avermelhada que escorre pelo estipe da planta (Figura 1. d) (Benassi; Fanton; Santana, 2013).

Figura 1 - Sintomas de doenças no coqueiro. A: Queima das folhas no coqueiro. B: Podridão na base da folha. C: Podridão peduncular do coco. D: Resinose



Fonte: Elaborada pela autora.

2.3 *Lasiodiplodia theobromae sensu lato*

As doenças da queima das folhas e podridão peduncular do coco estão associadas ao fungo *Lasiodiplodia theobromae sensu lato* (Pat.) Griff. & Maubl., membro da família Botryosphaeriaceae (Ordem Botryosphaeriales, Classe Dothideomycetes, Filo Ascomycota e Reino Fungi) (Abdollahzadeh *et al.*, 2010; Phillips *et al.*, 2019). *Lasiodiplodia theobromae sensu lato* refere-se ao conceito amplo da espécie com base em caracteres morfológicos (morfoespécie) e representa dezenas de espécies filogenéticas, enquanto *L. theobromae sensu stricto* corresponde à espécie filogenética, delimitada por análise filogenética de sequências de DNA (filoespécie). Esta morfoespécie possui distribuição cosmopolita, embora seja mais comum em regiões tropicais e subtropicais e possui ampla gama de espécies hospedeiras (Alves *et al.*, 2008). Este patógeno já foi relatado ocasionando doenças em várias culturas de importância econômica, a exemplo da banana (*Musa spp.*), cajueiro (*Anacardium occidentale L.*), coqueiro (*Cocos nucifera L.*), gravioleira (*Annona muricata L.*), mangueira (*Mangifera indica L.*), mamoeiro (*Carica papaya L.*), videira (*Vitis vinifera L.*), pinhão manso (*Jatropha curcas L.*), entre outras (Lima *et al.*, 2013; Marques *et al.*, 2013; Machado; Pinho; Pereira, 2014; Netto *et al.*, 2014; Correia *et al.*, 2016; Coutinho *et al.*, 2017; Netto *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2020).

Além de patogênico, esse fungo pode viver endofiticamente em material vegetal assintomático, tornando-se capaz de causar doenças rapidamente quando seus hospedeiros estão

sob estresse, representando dessa forma uma ameaça significativa para os agrossistemas (Slippers; Wingfield, 2007; Phillips *et al.*, 2013).

O fungo *L. theobromae sensu lato* forma picnídio estromático, simples ou agregado, imerso no hospedeiro tornando-se erumpente quando maduro, marrom escuro a preto, unilocular (Alves *et al.*, 2008). Possui paráfises hialinas, cilíndricas, septadas, ocasionalmente ramificadas, conidióforos hialinos, simples, às vezes septados e células conidiogênicas hialinas com paredes finas e lisas (Phillips *et al.*, 2013). De acordo com este mesmo autor, os conídios têm formato subovóides a elipsoides ovais, ápice amplamente arredondado, afinando para a base, mais largo no terço médio para superior, com paredes espessas, contendo conteúdo granular, inicialmente hialino, asseptado quando imaturo, tornando-se marrom escuro com um septo quando maduro e com estrias longitudinais (Figura 2).

Figura 2 - Conídios imaturo e maduro de *L. theobromae sensu stricto*



Fonte: Elaborada pela autora.

Por muito tempo, *L. theobromae sensu lato* foi considerada a única espécie do gênero e causadora de várias doenças, inclusive da queima das folhas e podridão peduncular do coco. Este fato ocorreu devido a identificação dos agentes causais ser baseada exclusivamente nas características morfológicas e culturais do patógeno, tais como tamanho, coloração e formato dos conídios e picnídios, taxa de crescimento e coloração das colônias em meio de cultura (Coutinho *et al.*, 2017). No entanto, percebeu-se que ao utilizar apenas caracteres morfológicos pode subestimar a verdadeira diversidade das espécies (Taylor *et al.*, 2000).

Tendo em vista a sua ampla gama de hospedeiros, presumiu-se que a espécie *L. theobromae sensu lato* seria um complexo de espécies crípticas, ou seja, indivíduos

morfologicamente semelhantes que são geneticamente diferentes e somente com a utilização de caracteres morfológicos não seria possível a correta identificação das espécies (Taylor *et al.*, 2000; Phillips *et al.*, 2013).

2.4 Caracterização molecular de *Lasiodiplodia theobromae sensu lato*

Técnicas moleculares baseadas no sequenciamento de DNA abriram novas perspectivas e têm sido amplamente utilizadas para identificação de espécies filogenéticas de fungos, pois são capazes de detectar a variabilidade genética entre indivíduos (Ferreira; Grattapaglia, 1998; Crous *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2013; Slippers *et al.*, 2013). Para isso, pesquisas vêm utilizando diferentes regiões gênicas em suas análises e constataram que para o gênero *Lasiodiplodia* a utilização de um único gene pode subestimar a real diversidade entre espécies estreitamente relacionadas ou crípticas (Slippers; Wingfield, 2007; Phillips *et al.*, 2013). Diante disto, a identificação e diferenciação das espécies passaram a serem resolvidas através do sequenciamento de genes específicos e na construção de filogenias multigênicas (Slippers *et al.*, 2017).

A região do espaçador interno transcrito (ITS) do rDNA, juntamente com genes codificadores de proteínas, como fator de alongação 1- α (*TEF1*), β - tubulina (*TUB2*) e a região da segunda maior subunidade da RNA polimerase II (*RPB2*) têm sido utilizadas para resolução de espécies de *Lasiodiplodia* com alto suporte filogenético (Abdollahzadeh *et al.*, 2010; Cruywagen *et al.*, 2017; Phillips *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021). De acordo com os dados filogenéticos, até o momento, o gênero *Lasiodiplodia* possui cerca de 40 espécies filogenéticas descritas no mundo, evidenciando a existência de um complexo de espécies (Silva *et al.*, 2019; Pornsuriya *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2023). Destas, algumas foram relatadas e descritas no Brasil, como por exemplo as espécies *Lasiodiplodia caatinguensis* I. B. L. Coutinho, F. C. O. Freire, C. S. Lima & J. E. Cardoso, *Lasiodiplodia pontae* I. B. L. Coutinho, F. C. O. Freire, C. S. Lima & J. E. Cardoso (Coutinho *et al.*, 2017), *Lasiodiplodia jatrophiicola* A.R. Machado & O. L. Pereira, *Lasiodiplodia euphorbicola* A. R. Machado & O. L. Pereira, *Lasiodiplodia macrospora* A. R. Machado & O. L. Pereira, *Lasiodiplodia subglobosa* A. R. Machado & O. L. Pereira (Machado; Pinho; Pereira, 2014), *Lasiodiplodia brasiliensis* M.S.B. Netto, M.W. Marques & A. J. L. Phillips (Netto *et al.*, 2014) e *Lasiodiplodia gravistriata* M.S.B. Netto & M.P.S. Camara (Netto *et al.*, 2017) em associação com diversas doenças de plantas economicamente importantes.

Alves *et al.* (2008), utilizaram análises filogenéticas juntamente com dados morfológicos para revelarem espécies crípticas em *L. theobromae sensu lato* e identificaram duas novas espécies, *Lasiodiplodia pseudotheobromae* A.J.L. Phillips, A. Alves & Crous e *Lasiodiplodia parva* A.J.L. Phillips, A. Alves & Crous. Marques *et al.* (2013), também identificaram seis espécies de *Lasiodiplodia* associadas à manga, que anteriormente eram consideradas apenas como *L. theobromae sensu lato* com base na morfologia. No mamão, foram identificadas *L. brasiliensis*, *L. hormozganensis* Abdollahz., Zare & A. J. L Phillips, *L. marypalme* M.S.B. Netto, M.W. Marques, A.J.L. Phillips & M.P.S. Câmara, *L. pseudotheobromae* e *L. theobromae sensu stricto*, confirmando que existem diferentes espécies associadas à podridão peduncular em mamão (Netto *et al.*, 2014). Ainda com base em dados moleculares descobriu-se que a podridão do colo e da raiz de *Jatropha curcas* L. está associada às espécies *L. egyptiaca* A.M. Ismail, L. Lombard & Crous, *L. euphorbicola*, *L. jatrophiicola*, *L. macrospora*, *L. subglobosa*, *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae sensu stricto*, *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. e *Neoscytalidium hyalinum* (C.K. Campb. & J.L. Mulder) A.J.L. Phillips, Groenewald & Crous (Machado; Pinho; Pereira, 2014). Coutinho *et al.* (2017), identificaram seis espécies de *Lasiodiplodia* associadas a várias espécies de frutas tropicais: *L. brasiliensis* (*Manilkara zapota*, *Mangifera indica* e *Spondias purpurea*), *L. caatinguensis* (*Anacardium occidentale*, *Citrus sinensis*, *S. purpurea* e *S. lutea*), *L. euphorbicola* (*Annona muricata* e *Cocos nucifera*), *L. pontae* (*A. occidentale* e *S. purpurea*), *L. pseudotheobromae* (*A. occidentale*, *S. purpurea* e *Tamarindus indica*) e *L. theobromae sensu stricto* (*A. occidentale*, *S. purpurea* e *Talisia esculenta*).

Pesquisas desenvolvidas na investigação da etiologia da queima das folhas no coqueiro baseadas em caracteres morfológicos, filogenéticos e patogênicos identificaram as espécies *L. theobromae sensu stricto*, *L. brasiliensis*, *L. pseudotheobromae* e *Lasiodiplodia laeliocattleyae* (Sibilia) A. Alves (Santos *et al.*, 2020; Coelho *et al.*, 2022). Já os estudos da podridão peduncular do coco envolvendo estudos filogenéticos, morfológicos e patogênicos revelaram como agentes causais da doença *L. theobromae sensu stricto*, *L. brasiliense*, *L. pseudotheobromae*, *L. laeliocattleyae* (Rosado *et al.*, 2016) e *L. subglobosa* (Coelho *et al.*, 2022).

2.5 Diversidade genética com marcadores moleculares ISSR

Além dos estudos filogenéticos, a detecção e a análise de polimorfismos genéticos são de interesse em diversas áreas, pois podem auxiliar a compreender a base molecular de

vários aspectos biológicos (Zolet *et al.*, 2017). O estudo da diversidade genética de patógenos permite identificar populações com maior diversidade e, por consequência, as chances de sobrevivência e/ou extinção e proporcionar o entendimento dos mecanismos evolutivos que atuam na diversificação das espécies (Cruz; Ferreira; Pessoni, 2020). Já os estudos de estrutura populacional podem estimar o fluxo gênico e dispersão de uma espécie, além de fornecer dados sobre a diferenciação genética de populações ao longo da distribuição geográfica do organismo (Zolet *et al.*, 2017). E, para estes estudos, diferentes marcadores moleculares estão sendo utilizados.

Os marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados em estudos de diversidade genética, pois detectam diferenças em nível de DNA sem considerar os efeitos advindos do ambiente. Trata-se de sequências presentes no material genético de um indivíduo, herdadas geneticamente e que, não estão necessariamente relacionadas com características fenotípicas expressas (Abesha; Caetano-Anollés, 2006; Zolet *et al.*, 2017; Miranda *et al.*, 2018). Estes tem-se mostrado importante para quantificar a variabilidade genética das populações, permitindo avaliar as forças que afetam a evolução: mutação, fluxo gênico, recombinação, seleção e deriva genética. A mutação, recombinação e fluxo gênico aumentam a variação genética das populações de patógenos gerando novas sequências de DNA, enquanto a deriva genética diminui o nível de variação genética, e a seleção pode aumentar ou diminuir a variação genética das populações de patógenos. A diversidade genética também é influenciada pela contribuição relativa da reprodução sexual e assexuada de uma espécie, no qual indivíduos que se reproduzem sexuadamente normalmente tem a sua população geneticamente mais diversificada do que aqueles que se reproduzem assexuadamente.

Atualmente, os marcadores moleculares *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR), *Simple Sequence Repeats* (SSR), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) estão sendo empregados para estudos de genética de patógenos em diversas culturas (Phillips; Vasil, 2001).

Os marcadores moleculares denominados ISSR (Gupta *et al.*, 1994; Zietkiewicz; Rafalski; Labuda, 1994) são segmentos de DNA de 100 a 3.000 pares de bases amplificados via PCR usando somente um *primer* com 16 a 20 pares de bases, consistem em sequências repetidas que são abundantes e dispersas em todo genoma (Domingues *et al.*, 2017). O *primer* se anela a regiões específicas, amplificando sequências entre dois loci microssatélites (Zietkiewicz; Rafalski; Labuda, 1994).

O ISSR é um marcador molecular de herança dominante, ou seja, possibilita a identificação da presença ou ausência de um determinado alelo, os quais serão revelados pela presença ou ausência de bandas em géis de agarose (Domingues *et al.*, 2017; Zolet *et al.*, 2017). Este marcador apresenta uma série de vantagens, tais como, exigir pouca infraestrutura em termos de equipamentos de laboratório para execução dos experimentos, não necessita de um sistema de resolução sofisticado e laborioso, podendo ser utilizado o gel de agarose; apresenta alta reprodutibilidade; é altamente polimórfico; a amplificação não necessita do conhecimento prévio da sequência de DNA da espécie alvo do estudo; as sequências alvo dos ISSRs são abundantes ao longo do genoma; e, marcador molecular universal podendo ser utilizado em diversas espécies (Zietkiewicz; Rafalski; Labuda, 1994; Reddy *et al.*, 2002; Borba *et al.*, 2005). O marcador ISSR é uma das ferramentas utilizadas para investigar a diversidade genética e estrutura populacional de patógenos de plantas, inclusive *Lasiodiplodia* (Liu *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2016; Xie *et al.*, 2019; Leala; El-Shahawy; Tolba, 2021; Xu *et al.*, 2024).

Referências

- ABDOLLAHZADEH, J. *et al.* Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. **Persoonia**, v. 25, p. 1-10, 2010.
- ABESHA, E.; CAETANO-ANOLLÉS, G. Studying the ecology, systematics, and evolution of plant pathogens at the molecular level. In: Trigiano, R. N.; Windham, M. T.; Windham, A. S. **Plant Pathology - Concepts and Laboratory Exercises**. 2006, p. 722.
- ALVES, A. *et al.* Morphological and molecular data reveal cryptic species in *Lasiodiplodia theobromae*. **Fungal Diversity**, v. 28, p. 1-13, 2008.
- ARAGÃO, W. M. *et al.* Fruto do coqueiro para consumo natural. In: ARAGÃO, W. M. (Ed.). **Coco pós-colheita**. Brasília: Embrapa – CTATC, 2002, p. 19-25.
- BENASSI, A. C.; FANTON, C. J.; SANTANA, E. N. **O cultivo do coqueiro-anão-verde: tecnologias de produção**. Vitória, ES: Incaper, 2013.
- BRITO, N. M. *et al.* Determination of pesticide residues in coconut water by liquid– liquid extraction and gas chromatography with electron-capture plus thermionic specific detection and solid-phase extraction and high- performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A**, v. 957, p. 201-209, 2002.
- BORBA, R. S. *et al.* Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma westwood* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**, v.34, p. 565-569, 2005.

COELHO, I. L. *et al.* *Lasiodiplodia* species diversity associated with coconut leaf blight and stem-end rot in Northeastern Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 162, p. 45-61, 2022.

COUTINHO, I. B. L. *et al.* Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. **Plant Pathology**, v. 66, p. 90-104, 2017.

CORREIA, K. C. *et al.* Phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of table grape in the main Brazilian exporting region. **Plant Pathology**, v. 65, p. 92-103, 2016.

CORREIA, M. S.; COSTA, J. L. S. Dispersão anemófila do fungo *Lasiodiplodia theobromae* em plantações de coqueiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 150-154. 2005.

COSTA, R. S. C *et al.* **Cultivo do coqueiro em Rondônia**. Ed. Téc. NASCENTE, A.S. EMBRAPA Rondônia. Versão Eletrônica: ISSN 1807-1805. Porto Velho, Rondônia, 2005.

CROUS, P. W. *et al.* Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Studies in Mycology**, v. 55, p. 235-253, 2006.

CRUZ; C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. 2ª ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2011.

CRUYWAGEN, E. M. *et al.*, Phylogenetic species recognition and hybridisation in *Lasiodiplodia*: A case study on species from Baobabs. **Fungal Biology**, v. 121, p. 420-436, 2017.

DOMINGUES, S. D. *et al.* Selection of primers for Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) in *Cereus* sp. (Cactaceae). **Revista Biotecnologia & Ciência**, v. 6, n. 2, p. 46-54, 2017.

DUARTE, A. G. *et al.* Disposição do nematóide *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb) Baujard, em coqueiros portadores da doença anel-vermelho. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 3, p. 622-627, 2008.

FAOSTAT. (2023). Estatísticas da Food and Agriculture Organization of the United Nations. **World Production**. Disponível em: Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 01 mai. 2025.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed., Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998.

FONTES, H. R. **Caracterização do quadro atual e principais ameaças à produção de coco seco no nordeste do Brasil**. 2010. Disponível em: <<http://www.portaldoagronegocio.com.br>>; 8 dez. 2010, <<http://www.agrosoft.org.br>>; <<http://www.diadecampo.com.br>>. Acesso em: 01 mai. 2024.

FONTES, H. R.; FERREIRA, J. M. S. **A cultura do coqueiro**. 1.ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, Coleção Plantar, 48, 2006.

GUPTA, M. *et al.* Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 89, p. 998-1006, 1994.

IBGE. (2022). **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/>>. Acesso em: 01 mai. 2024.

LEALA, M. I.; EL-SHAHAWY, I. E.; TOLBA, I. H. Characterization of *Lasiodiplodia* isolates obtained from acid lime and Valencia orange in Egypt. **Al-Azhar Journal of Agricultural Research**, v. 46, n. 2, p. 51-67, 2021.

LIU, F. *et al.* Genetic diversity of *Fusarium mangiferae* isolated from mango malformation disease in China. **Scientia Horticulturae**, v. 165, p. 352-356, 2014.

LIMA, J. S. *et al.* Caracterização cultural, morfológica e patogênica de *Lasiodiplodia theobromae* associado a frutíferas tropicais. **Summa Phytopathologica**, v. 39, p. 81-88, 2013.

LIYANAGE, D. V. Varieties and forms of the coconut palm grown in Ceylon. **Ceylon Coconut Quarterly**, v. 9, p. 1-10, 1958.

MACHADO, A. R.; PINHO, D. B.; PEREIRA, O. L. Phylogeny, identification and pathogenicity of the Botryosphaeriaceae associated with collar and root rot of the biofuel plant *Jatropha curcas* in Brazil, with a description of new species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Diversity**, v. 67, p. 231-247, 2014.

MARINHO, J. L. M.; GHEYI, H. R.; FERNANDES, P. D. Cultivo do coco “Anão Verde” irrigado com águas salinas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 1277-1284, 2006.

MARQUES, M. W. *et al.* Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, v. 61, p.181-193, 2013.

MARTINS, C. R.; JESUS JUNIOR, L. A. de. **Produção e comercialização de coco no Brasil frente ao comércio internacional: panorama 2014** / Carlos Roberto Martins – Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2014.

MIRANDA, F. D. *et al.* **Tópicos Especiais em Genética e Melhoramento II**. Dados eletrônicos. - Alegre, ES: CCA-UFES, 2018.

MONTEIRO, C. M. P. *et al.* Control of foliar diseases by the axillary application of systemic fungicides in Brazilian coconut Palms. **Crop Protection**, v.52, p.78-83, 2013.

MOURA, J. I. L. *et al.* Efeito de injeção com ciproconazole no controle das doenças foliares e na produtividade do coqueiro. **Summa Phytopathologica**, v. 45, n. 2, p. 186-190, 2019.

MUSSI-DIAS, V.; FREIRE, M. G. M. Evaluation of postharvest stem-end rot on coconut fruits. **Journal of Agriculture and Environmental Sciences**, v.5, n. 2, p. 25-35, 2016.

NETTO, M. S. B. *et al.* Analysis of phylogeny, distribution, and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with gummosis of *Anacardium* in Brazil, with a new species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Biology**, v. 121, n. 4, p. 437-451, 2017.

- NETTO, M. S. B. et al. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. **Fungal Diversity**, v. 67, p. 127-141, 2014.
- NIU, X-Q. et al. First report of leaf spot disease in coconut seedling caused by *Bipolaris setariae* in China. **Plant Disease**, v. 98, n. 12, 2014.
- OLEKE, J. M. et al. Ex-ante economic analysis of biological control of coconut Mite in Benin. **AgBioForum**, v. 16, p. 161-169, 2013.
- OLIVEIRA, M. C. et al. Mudanças de tomateiro produzidas à base de pó de coco e esterco bovino curtido. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 9, n. 3, p. 87-95, 2019.
- PHILLIPS, A. J. et al. Families in Botryosphaeriales: a phylogenetic, morphological and evolutionary perspective. **Fungal Diversity**, v. 94, p. 1-22, 2019.
- PHILLIPS, A. J. L. et al. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. **Studies in Mycology**, v. 76, p. 51-167, 2013.
- PHILLIPS, R. L.; VASIL, I. K. **Dna-Based markers in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2 ed. 2001.
- PORNSURIYA C, et al., Morphological and phylogenetic evidences reveal *Lasiodiplodia chonburiensis* and *L. theobromae* associated with leaf blight in *Hevea brasiliensis* in Southern Thailand. **Diversity**, v. 15, 2023.
- RAM, C. Epidemiologia e controle químico da queima-das-folhas (*Botryodiplodia theobromae*) do coqueiro (*Cocos nucifera* L.). **Fitopatologia Brasileira**, v. 14, n. 3/4, p. 215-220, 1989.
- REDDY, M. P. et al. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, p. 9-17, 2002.
- ROSADO, A. W. C. et al. Phylogeny, Identification, and Pathogenicity of *Lasiodiplodia* Associated with Postharvest Stem-End Rot of Coconut in Brazil. **Plant Disease**, v. 100, n. 3, p. 561-568, 2016.
- SANTOS, P. H. D. et al. Is *Lasiodiplodia theobromae* the only species that causes leaf blight disease in Brazilian coconut palms? **Tropical Plant Pathology**, v. 45, p. 434-442, 2020.
- SILVA, A. C. Reaproveitamento da casca de coco verde. **Revista Monografias Ambientais**, v. 13, n. 5, p. 4077-4086, 2014.
- SILVA, N. I. et al. Phylogeny and morphology of *Lasiodiplodia* species associated with *Magnolia* forest plants. **Scientific Reports**, v. 9, 2019.
- SILVA, C. M. et al. Distribuição espacial do anel vermelho (*Bursaphelenchus cocophilus*) e da resinose (*Thielaviopsis paradoxa*) em coqueiro. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.11, n.3, p.192-197, 2016.

- SILVA, J. M. *et al.* Evaluation of dwarf coconut (*Cocos nucifera* L.) germplasm to the damage intensity caused by foliar diseases. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 10, p. 1374-1380, 2017.
- SLIPPERS, B. *et al.* Diversity in the Botryosphaeriales: Looking back, looking forward. **Fungal Biology**, v. 121, n. 4, 2017.
- SLIPPERS, B. *et al.* Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriales: a systematic and evolutionary framework. **Studies Mycology**, v. 76, p. 31-49, 2013.
- SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: Diversity, ecology and impact. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p. 90-106. 2007.
- SOBRAL, L. F. **O produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2018.
- SOUZA FILHO, B. F.; SANTOS, H. P.; ROBBS, C. F. Etiologia da queima das folhas do coqueiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 4, p. 5-10, 1979.
- TALAMINI, V.; FERREIRA, J. M. S.; RAMOS, S. R. R. **Incidência e severidade da queima-das-folhas em cultivares de coqueiro, em Pernambuco**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2013.
- TAYLOR, J. W. *et al.* Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 31, p. 21-32, 2000.
- VIANA, F. M. P. *et al.* **Tratamento do coco verde para exportação com ênfase no controle da podridão-basal-pós-colheita**. In: Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 29, Embrapa Agroindústria Tropical, 2007.
- VIANA, F. M. P. *et al.* Podridão-basal-pós-colheita de coco verde no Estado do Ceará. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 5, p. 545, 2002.
- VITÓRIA, N. S. *et al.* *Camarotella torrendiella* comb. nov. e *C. acrocomiae*: agentes etiológicos das lixas do coqueiro. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n.4, p. 295-301, 2008.
- WANG, Y. *et al.* *Lasiodiploda regia* sp. nov.: A new species causing canker and dieback of fruit trees in China. **Phytopathology**, v. 113, p. 1210-1221, 2023.
- WARWICK, D. R. N. *et al.* **Coco (*Cocos nucifera*) controle de doenças**. In: Vale, F.X.R. do, Zambolin, L.; (Eds.) Controle de doenças de plantas: grandes culturas. Viçosa, MG: UFV; Brasília: Ministério da Agricultura e Abastecimento, 1997. p.765-787.
- WARWICK, D. R. N.; PASSOS, E. E. M. Outbreak of stem bleeding in coconuts caused by *Thielaviopsis paradoxa* in Sergipe, Brazil. **Tropical Plant Pathology**, Brazilian, v. 34, n. 3, p. 175-177, 2009.
- WARWICK, D. R.; TALAMINI, V. Doenças e métodos de controle ajustados à baixa capacidade de investimento dos pequenos produtores rurais. In: Fernando L.D. Cintra; Humberto R. Fontes; Edson E.M. Passos; Joana M.S. Ferreira. (Org.). **Fundamentos**

tecnológicos para a revitalização das áreas cultivadas com coqueiro gigante no Nordeste do Brasil. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2009. p. 157-190.

XIE, H-H, *et al.* ISSR analysis of genetic diversity for mulberry *Lasiodiplodia* root rot pathogen. **Journal of Southern Agriculture**, v. 50, n. 7, pag. 1505-1511, 2019.

XIE, H. H. *et al.* Genetic diversity analyses of *Lasiodiplodia theobromae* on *Morus alba* and *Agave sisalana* based on RAPD and ISSR molecular markers. **Mycology**, v. 7, n. 4, p. 155-164, 2016.

XU, L. *et al.* Identity, pathogenicity and genetic diversity of *Lasiodiplodia* associated with stem-end rot of avocado in China. **Plant Disease**, 2024.

ZHANG, E. *et al.* Evaluating species in *Botryosphaerales*. **Persoonia**, v. 46, p. 63-115, 2021.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome finger printing by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, p. 176-183, 1994.

ZOLET, A. C. T. *et al.* **Marcadores moleculares na era genômica: metodologias e aplicações.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. p. 181.

3 CAPÍTULO I: FILOGENIA, MORFOLOGIA E PATOGENICIDADE DE *LASIODIPLODIA* spp. CAUSANDO QUEIMA DAS FOLHAS E PODRIDÃO PEDUNCULAR DO COCO NO NORDESTE BRASILEIRO

Jamille Rabêlo de Oliveira¹, Eliane Mayumi Inokuti¹, Gustavo Freire Justino¹, Israel Lopes de Andrade¹, Maria Vitória Mendes Cordeiro¹, Jonas Queiroz Rodrigues¹, Patricia do Nascimento Bordallo², Christiana de Fátima Bruce da Silva², Cristiano Souza Lima¹

¹ Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal do Ceará, 60440-554, Fortaleza, CE, Brasil;

² Embrapa Agroindústria Tropical, 60511-110, Fortaleza, Ceará, Brasil;

*Autor para correspondência: Cristiano Souza Lima (csl@ufc.br)

Resumo

Dentre as doenças relatadas no coqueiro (*Cocos nucifera*), a queima das folhas e a podridão peduncular do coco possuem grande relevância, podendo causar perdas significativas. Os objetivos do trabalho foram identificar espécies de *Lasiodiplodia* associadas ao fruto, parte aérea e ao estipe do coqueiro por meio de análises filogenéticas e de haplótipos. Para os representantes das espécies encontradas, foi realizada a caracterização morfológica, cultural e a avaliação da sua patogenicidade. Foram obtidos e preservados 188 isolados de *Lasiodiplodia* spp., atuando como agentes causadores de doença em frutos, parte aérea e estipe, além de ocorrerem também como endófitos. Destes, foram selecionados 50 isolados para a realização da amplificação e sequenciamento da região do espaçador interno transcrito (ITS) do rDNA, fator de alongação 1- α (*TEF1*), β - tubulina (*TUB2*) e a segunda maior subunidade da RNA polimerase II (*RPB2*), e realizado a análise de haplótipos baseada nestas regiões concatenadas. Foram obtidos isolados nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco e Rio Grande do Norte e identificadas as espécies *L. brasiliensis*, *L. hormozganensis*, *L. pseudotheobromae* e *L. theobromae sensu stricto* e 20 haplótipos. *L. theobromae sensu stricto* foi a espécie mais frequentemente isolada (84%), seguida por *L. brasiliensis* (12%), *L. pseudotheobromae* (2%) e *L. hormozganensis* (2%). Os isolados testados foram patogênicos e estes variaram quanto à agressividade, sendo *L. pseudotheobromae* o mais agressivo dentre as espécies. Este estudo representa o primeiro relato de *L. hormozganensis* como agente causal da podridão peduncular em frutos de coco.

Palavras-chave: análise molecular, agressividade, *Lasiodiploda hormozganensis*.

Abstract

Among the diseases reported in coconut palm (*Cocos nucifera*), leaf blight and stem-end rot are highly relevant and can cause significant losses. The objectives of this study were to identify species of *Lasiodiplodia* associated with the fruit, aerial part and stem of the coconut palm through phylogenetic and haplotype analyses. Morphological and cultural characterizations were performed for the representatives of the species found, as well as an evaluation of their pathogenicity. A total of 188 isolates of *Lasiodiplodia* spp. were obtained and preserved, acting as disease-causing agents in fruits, aerial part and stem, in addition to also occurring as endophytes. Of these, 50 isolates were selected for amplification and sequencing based on the internal transcribed spacer (ITS) region of rDNA, elongation factor 1- α (*TEF1*), β -tubulin (*TUB2*) and the second largest subunit of RNA polymerase II (*RPB2*), and haplotype analysis based on these concatenated regions was performed. Isolates were obtained in the States of Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco and Rio Grande do Norte and the species *L. brasiliensis*, *L. hormozganensis*, *L. pseudotheobromae* and *L. theobromae* sensu stricto and 20 haplotypes were identified. *L. theobromae* sensu stricto was the most frequently isolated species (84%), followed by *L. brasiliensis* (12%), *L. pseudotheobromae* (2%) and *L. hormozganensis* (2%). The tested isolates were pathogenic and varied in aggressiveness, with *L. pseudotheobromae* being the most aggressive among the species. This study represents the first report of *L. hormozganensis* as a causal agent of stem-end rot in coconut fruits.

Keywords: molecular analysis, aggressiveness, *Lasiodiploda hormozganensis*.

3.1 Introdução

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma palmeira que apresenta grande relevância, pois seu cultivo comercial detém a capacidade de gerar emprego e renda (Benassi; Fanton; Santana, 2013). É uma planta de uso versátil, podendo ser comercializados os frutos ainda verdes (imaturos) para o consumo de água de coco ou secos para a agroindústria, madeira, fibra, bem como ser utilizada no paisagismo (Aragão *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2005; Oleke *et al.*, 2013; Martins; Jesus Junior, 2014; Oliveira *et al.*, 2019).

Os maiores produtores de coco no mundo são Indonésia, Filipinas, Índia e o Brasil ocupando a quarta posição no ranking mundial de produção (FAOSTAT, 2025). O Nordeste é a principal região produtora nacional com produção de 1.545.435 t. de coco, em 2023,

correspondendo a 82,7% da área colhida de coco do Brasil e 80% de sua produção, sendo o Ceará, Bahia e Pernambuco os principais estados produtores (IBGE, 2025).

No coqueiro são encontradas diversas doenças que atacam a planta nas diferentes fases de seu desenvolvimento, incidindo sobre o sistema radicular, estipe, folhas, inflorescência e frutos (Benassi; Fanton; Santana, 2013). Dentre as doenças, a queima das folhas e a podridão peduncular do coco possuem grande relevância podendo causar perdas significativas na produção e na pós-colheita (Viana *et al.*, 2002; Viana *et al.*, 2007; Rosado *et al.*, 2016; Mussi-Dias; Freire, 2016; Santos *et al.*, 2020; Coelho *et al.*, 2022).

A queima das folhas e a podridão peduncular do coco estão associadas ao fungo *Lasiodiplodia theobromae sensu lato* (Pat.) Griff. & Maubl., membro da família Botryosphaeriaceae e filo Ascomycota do Reino Fungi (Abdollahzadeh *et al.*, 2010; Phillips *et al.*, 2019). É um fungo cosmopolita, embora mais comum em regiões tropicais e subtropicais e possui uma ampla gama de espécies hospedeiras (Alves *et al.*, 2008). Além disso, podem atuar como saprófitas e também como endófitos em material vegetal assintomático, colonizando tecidos saudáveis sem provocar sintomas visíveis. Essa capacidade de viver de forma endofítica contribui significativamente para sua sobrevivência e dispersão, permitindo que se mantenham e se propaguem em plantas aparentemente saudáveis. Nessas condições, podem permanecer latentes até que fatores de estresse afetem os hospedeiros, momento em que se tornam capazes de causar doenças (Slippers; Wingfield 2007; Phillips *et al.*, 2013).

Além do coqueiro, outras culturas de importância econômica são afetadas por *Lasiodiplodia* spp. no Brasil, especialmente banana (*Musa* spp.), cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), gravioleira (*Annona muricata* L.), mangueira (*Mangifera indica* L.), mamoeiro (*Carica papaya* L.), videira (*Vitis vinifera* L.), pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), entre outras (Lima *et al.*, 2013; Marques *et al.*, 2013; Machado; Pinho; Pereira, 2014; Netto *et al.*, 2014; Correia *et al.*, 2016; Coutinho *et al.*, 2017; Netto *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2020).

Por muito anos, *L. theobromae sensu lato* foi considerado a única espécie do gênero e causadora de várias doenças, inclusive da queima das folhas e podridão peduncular do coco devido a identificação dos agentes causais serem baseados exclusivamente nas características morfológicas e culturais do patógeno, subestimando a verdadeira diversidade das espécies (Taylor *et al.*, 2000). Técnicas moleculares baseadas no sequenciamento de DNA abriram novas perspectivas para a pesquisa e têm sido amplamente utilizadas para identificação de espécies, pois são capazes de detectar a variabilidade genética entre indivíduos (Ferreira; Grattapaglia, 1998; Crous *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2013; Slippers *et al.*, 2013). Diante disso, a

identificação passou a ser resolvida através do sequenciamento de genes e da construção de filogenias multigênicas (Slippers *et al.*, 2017).

De acordo com os dados filogenéticos, até o momento, o gênero *Lasiodiplodia* possui cerca de 40 espécies filogenéticas descritas no mundo, evidenciando a existência de um complexo de espécies (Silva *et al.*, 2019; Pornsuriya *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2023). Destas espécies, quatro espécies de *Lasiodiplodia* foram relatadas causando a queima das folhas no coqueiro, no Brasil, a exemplo de *L. theobromae sensu stricto*, *Lasiodiplodia brasiliensis* M.S.B. Netto, M.W. Marques & A. J. L. Phillips, *Lasiodiplodia pseudotheobromae* A.J.L. Phillips, A. Alves & Crous e *Lasiodiplodia laeliocattleyae* (Sibilia) A. Alves (Santos *et al.*, 2020; Coelho *et al.*, 2022) e cinco espécies causando podridão peduncular do coco: *L. theobromae sensu stricto*, *L. brasiliense*, *L. pseudotheobromae*, *L. laeliocattleyae* e *L. subglobosa* A.R.Machado & O.L.Pereira (Rosado *et al.*, 2016; Coelho *et al.*, 2022).

Apesar da elevada importância econômica do coqueiro no Brasil e a perda produtiva devido às espécies de *Lasiodiplodia* causadoras das doenças queima das folhas do coqueiro e da podridão peduncular do coco ser conhecida, até o momento não foi realizado um estudo com um maior número de isolados das principais regiões produtoras. Portanto, os objetivos deste estudo foram: i. identificar espécies de *Lasiodiplodia* associadas ao fruto, parte aérea e estipe do coqueiro por meio de análises filogenéticas baseadas na região do espaçador interno transcrito (ITS) do rDNA, nos genes fator de alongação 1- α (*TEF1*), β - tubulina (*TUB2*) e da segunda maior subunidade da RNA polimerase II (*RPB2*); ii. identificar haplótipos das espécies identificadas por meio da análise concatenada das regiões do DNA; iii. realizar a caracterização morfológica e cultural; e iv. avaliar a patogenicidade dos isolados de *Lasiodiplodia* spp.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Coleta, isolamento e preservação dos isolados de *Lasiodiplodia*

Durante o período de 2021 a 2022, foram coletadas amostras de diferentes órgãos do coqueiro (*C. nucifera*) nas principais regiões produtoras de coco do Nordeste brasileiro. A coleta incluiu tecidos provenientes do ápice e da base das folhas, de frutos e do estipe, apresentando sintomas característicos, respectivamente, de queima das folhas, podridão da base foliar, podridão peduncular do coco e resinose no estipe. Também foram coletados frutos sadios para análise de endófitos.

As amostras foram acondicionadas e enviadas para o Laboratório de Micologia (Departamento de Fitotecnia, Setor de Fitossanidade) da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará.

Foi realizada a desinfestação superficial dos fragmentos coletados (base e ápice da folha e estipe), em álcool 70% por 30 segundos e hipoclorito de sódio (NaClO) 1% por um minuto e lavados duas vezes com água destilada esterilizada (ADE) durante 30 segundos, colocados para secar em papel de filtro esterilizado e, por fim, realizado o isolamento indireto. O isolamento indireto consistiu na transferência do tecido do hospedeiro, em torno de 3cm, infectado onde o patógeno se encontra em crescimento ativo nos tecidos para meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). Após o surgimento de colônias do fungo, disco de BDA contendo micélio, extraídos das bordas das colônias, foram transferidos para uma nova placa com meio BDA (Alfenas; Mafia, 2016).

Os frutos com sintomas de podridão peduncular foram lavados com água e sabão neutro e, em seguida, desinfestados superficialmente conforme o método descrito anteriormente. Os frutos coletados inicialmente sem sintomas foram submetidos à desinfestação superficial da mesma forma. Os frutos foram colocados em câmara úmida, composto por um chumaço de algodão embebido com ADE dentro de um saco plástico transparente. Eles foram incubados a 25 °C com um fotoperíodo de 12 horas para induzir a esporulação do patógeno e possibilitar o isolamento direto. O isolamento direto foi realizado assim que os sinais do patógeno se tornaram visíveis, por meio da transferência das estruturas diretamente do órgão infectado para o meio de cultura BDA (Alfenas; Mafia, 2016).

Foram obtidas 188 culturas puras, cada uma proveniente de um único esporo transferido para uma placa de *Petri* contendo meio de cultura BDA. Essas culturas foram preservadas em ADE utilizando o método de Castellani (Castellani, 1939) e depositadas na Coleção Micológica da UFC - UFCM, no Departamento de Fitotecnia, Setor de Fitossanidade, Laboratório de Micologia, em Fortaleza, Ceará.

3.2.2 *Extração, amplificação e sequenciamento de DNA*

Os 188 isolados fúngicos foram cultivados em meio de cultivo líquido batata-dextrose (BD) sob agitação por dois dias para obtenção de micélios jovens. Posteriormente, foram submetidos à extração de DNA utilizando Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) seguindo as instruções do fabricante, no Laboratório Multiusuário de Biologia

Molecular Aplicada à Agricultura (BIOAGRI), Departamento de Fitotecnia, Setor de Fitossanidade, Fortaleza, Ceará.

O DNA genômico extraído das amostras foi analisado em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X (0,89 M de Tris, 0,89 M de ácido bórico e 0,02 M de EDTA) corado com SYBR Safe, submetido à eletroforese a 90V por 50 minutos e visualizados em transiluminador sob luz UV. A quantificação do DNA foi determinada através da utilização do NanoDrop® 2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific), version 1.0 no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE.

Dos 188 isolados obtidos, uma subamostra de 50 (Tabela 1) foi selecionada para identificação molecular, com base na diversidade morfológica observada, como características culturais e coloração das colônias, representando diferentes regiões amostradas e distintos órgãos da planta.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) da região do espaçador interno transcrito (ITS) do rDNA foi realizada com os *primers* ITS-1 e ITS-4 (White *et al.*, 1990). O fator de alongação 1- α (*TEF1*) foi amplificado com os *primers* EF1-688F e EF1-1251R (Alves *et al.*, 2008). O gene β - tubulina (*TUB2*) foi amplificado com os *primers* Bt2a e Bt2b (Glass; Donaldson, 1995) e a região da segunda maior subunidade da RNA polimerase II (*RPB2*) foi amplificada usando os *primers* RPB2 -LasF e RPB2 -LasR (Cruywagen *et al.*, 2017).

A PCR foi composta por 12,5 μ l de PCR Master Mix (2X) (Taq DNA polimerase, tampões de reação, MgCl₂, dNTPs; Promega Corporation, Madison, WI, EUA), 0,6 μ l de cada *primer*, 1 μ l de DNA e 10,3 μ l de água ultra pura para completar o volume final de 25 μ l. As PCRs foram realizadas em termociclador Techne (TC-5000, Inc, Inglaterra) e o ciclo térmico da PCR para o gene *TEF1* consistiu em uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C durante 1 min; seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C (desnaturação), 1 min a 58 °C (anelamento), 1,5 min a 72 °C (extensão) e 10 min a 72 °C (extensão final). Para a região ITS e *TUB2* o ciclo consistiu de 95 °C durante 3 min (desnaturação inicial); seguido por 35 ciclos de 1 min a 95 °C (desnaturação), 30 segundos a 52 °C (anelamento), 1 min a 72 °C (extensão) e 10 min a 72 °C (extensão final). E para o gene *RPB2* a PCR consistiu de 95 °C durante 5 min (desnaturação inicial); seguido por 35 ciclos de 1 min. a 94 °C (desnaturação), 1 min a 53 °C (anelamento), 1 min a 72 °C (extensão) e 10 min a 72 °C (extensão final). Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose utilizando a mesma metodologia mencionada acima para a análise do DNA genômico.

Os produtos de PCR obtidos foram purificados com Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up (Promega Corporation, Madison, WI, EUA) seguindo a metodologia do fabricante e

encaminhados para sequenciamento na Plataforma do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brasil.

Tabela 1 - Lista dos isolados selecionados para análise filogenética, com indicação do código, dos sintomas apresentados e local de coleta

| Continua | | |
|----------------|---------------------------|------------------------|
| Isolado | Sintoma | Local de Coleta |
| JRO 02 | Podridão Peduncular | Fortaleza – CE |
| JRO 09 | Podridão Peduncular | Acaraú – CE |
| JRO 11 | Podridão Peduncular | Acaraú – CE |
| JRO 14 | Podridão Peduncular | Acaraú – CE |
| JRO 16 | Podridão Peduncular | Caucaia – CE |
| JRO 18 | Resinose | Acaraú – CE |
| JRO 23 | Fruto sadio | Acaraú – CE |
| JRO 26 | Queima das Folhas | Acaraú – CE |
| JRO 31 | Queima das Folhas | Acaraú – CE |
| JRO 32 | Queima das Folhas | Acaraú – CE |
| JRO 34 | Fruto sadio | Acaraú – CE |
| JRO 35 | Podridão Peduncular | Caucaia – CE |
| JRO 47 | Queima das Folhas | Trairi – CE |
| JRO 53 | Podridão Peduncular | Trairi – CE |
| JRO 55 | Podridão Peduncular | Paraipaba – CE |
| JRO 63 | Fruto sadio | Trairi – CE |
| JRO 77 | Podridão Peduncular | Paraipaba – CE |
| JRO 80 | Podridão na Base da Folha | Petrolina – PE |
| JRO 84 | Podridão na Base da Folha | Paraipaba – CE |
| JRO 91 | Queima das Folhas | Paraipaba – CE |
| JRO 99 | Fruto sadio | Paraipaba – CE |
| JRO 101 | Queima das Folhas | Paraipaba – CE |
| JRO 104 | Queima das Folhas | Paraipaba – CE |
| JRO 112 | Fruto sadio | Fortaleza – CE |
| JRO 113 | Fruto sadio | Paraipaba – CE |
| JRO 121 | Queima das Folhas | Paraipaba – CE |
| JRO 124 | Queima das Folhas | Paraipaba – CE |
| JRO 127 | Queima das Folhas | Petrolina – PE |
| JRO 128 | Queima das Folhas | Petrolina – PE |
| JRO 131 | Podridão Peduncular | Itapipoca – CE |
| JRO 133 | Podridão Peduncular | Itapipoca – CE |
| JRO 137 | Queima das Folhas | Paraipaba – CE |
| JRO 139 | Podridão na Base da Folha | Alto do Rodrigues – RN |
| JRO 141 | Podridão na Base da Folha | Alto do Rodrigues – RN |
| JRO 142 | Podridão na Base da Folha | Alto do Rodrigues – RN |
| JRO 143 | Podridão na Base da Folha | Alto do Rodrigues – RN |
| JRO 145 | Podridão Peduncular | Alto do Rodrigues – RN |

Tabela 1 - Lista dos isolados selecionados para análise filogenética, com indicação do código, dos sintomas apresentados e local de coleta

| Isolado | Sintoma | Local de Coleta | Conclusão |
|---------|---------------------------|------------------------|-----------|
| JRO 155 | Fruto sadio | Alto do Rodrigues – RN | |
| JRO 157 | Queima das Folhas | Alto do Rodrigues – RN | |
| JRO 167 | Podridão Peduncular | Alto do Rodrigues – RN | |
| JRO 181 | Queima das Folhas | Alto do Rodrigues – RN | |
| JRO 183 | Queima das Folhas | Alto do Rodrigues - RN | |
| JRO 185 | Resinose | Apodi - RN | |
| JRO 189 | Fruto sadio | Itapipoca - CE | |
| JRO 194 | Podridão na Base da Folha | Petrolina - PE | |
| JRO 196 | Queima das Folhas | Riachão das Neves - BA | |
| JRO 201 | Queima das Folhas | Riachão das Neves - BA | |
| JRO 202 | Queima das Folhas | Balsas - MA | |
| JRO 203 | Queima das Folhas | Balsas - MA | |
| JRO 204 | Queima das Folhas | Balsas - MA | |

Fonte: Elaborada pela autora.

3.2.3 Análises filogenéticas dos isolados de *Lasiodiplodia*

As sequências consensos dos isolados de cada gene foram obtidas utilizando o pacote Staden Package 1.6-r (Bonfield; Staden, 1996) e comparadas com o banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) por meio do algoritmo BLAST. As sequências foram alinhadas usando a interface online do MAFFT v.7 (Katoh; Standley, 2013) com sequências de *Lasiodiplodia* spp. selecionados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Tabela 2) e corrigidas manualmente no MEGA7 (Kumar, Stecher; Tamura, 2016).

As relações evolutivas foram inferidas usando Inferência Bayesiana (IB) e a Máxima verossimilhança (ML), ambas realizadas usando a plataforma CIPRES (<https://www.phylo.org/portal2/home.action>) para cada locus individual e realizada a matriz concatenada das regiões ITS, *TEF1*, *TUB2* e *RPB2*.

A IB foi realizada usando o programa MrBayes v. 3.2.6 (Ronquist *et al.*, 2012) utilizando o modelo estimado por meio do Phylogenetic Analysis Using Parsimony (PAUP* v.4) (Swofford, 1998) e MrModeltest 2.3 (Nylander, 2004), segundo o Critério de Informação Akaike (AIC) para cada região. A análise ML foi realizada com auxílio do programa RAxML HPC2 (8.2.10) (Stamatakis 2014) com o modelo GTR-GAMMA. O suporte do nó para ambas as análises foi estimado através da análise da probabilidade posterior e *bootstrap* com 1.000

replicações. As árvores filogenéticas de IB e ML geradas foram visualizadas no programa FigTree v 1.4.2 (Rambaut, 2014). E todas as sequências serão depositadas no banco de dados GenBank no site do NCBI.

As relações entre os haplótipos de *Lasiodiplodia* spp. foram estimadas usando uma rede de haplótipos construída utilizando o software PopArt baseada no método de median-joining (Bandelt; Rohl, 1999) utilizando 50 sequências dos isolados concatenados (ITS, *TEF1*, *TUB2* e *RPB2*).

Tabela 2 - Números de acesso ao Genbank de sequências de DNA de *Lasiodiplodia* spp. usados nas análises filogenéticas

| Espécies | Número do isolado | Hospedeiro | Localidade | ITS | Continuação | | |
|----------------------------|-------------------|-------------------------------|---------------|----------|-------------|-------------|-------------|
| | | | | | <i>TEF1</i> | <i>TUB2</i> | <i>RPB2</i> |
| <i>L. acácia</i> | CBS 136434* | <i>Acacia sp.</i> | Indonésia | MT587421 | MT592133 | MT592613 | MT592307 |
| <i>L. aquilariae</i> | CGMCC 3.18471* | <i>Aquilaria crassna</i> | Laos | KY783442 | KY848600 | - | KY848562 |
| <i>L. avicenniae</i> | CMW 41467* | <i>Avicennia marina</i> | África do Sul | KP860835 | KP860680 | KP860758 | KU587878 |
| <i>L. avicenniae</i> | LAS 199 | <i>Avicennia marina</i> | África do Sul | KU587957 | KU587947 | KU587868 | KU587880 |
| <i>L. brasiliensis</i> | CMM 4015* | <i>Mangifera indica</i> | Brasil | JX464063 | JX464049 | - | - |
| <i>L. brasiliensis</i> | CFS 097 | <i>Cocos nucifera</i> | Brasil | MG870584 | MG870576 | MG870604 | MG870614 |
| <i>L. brasiliensis</i> | AGQMy0010 | <i>Lo. maldivica</i> | México | MW274144 | MW604227 | MW604237 | MW604216 |
| <i>L. brasiliensis</i> | AGQMy0011 | <i>Lo. maldivica</i> | México | MW274145 | MW604228 | MW604238 | MW604217 |
| <i>L. brasiliensis</i> | COAD 1784 | <i>Cocos nucifera</i> | Brasil | KP244693 | KP308469 | KP308524 | - |
| <i>L. brasiliensis</i> | COAD 1786 | <i>Cocos nucifera</i> | Brasil | KP244696 | KP308471 | KP308526 | - |
| <i>L. brasiliensis</i> | COAD 1787 | <i>Cocos nucifera</i> | Brasil | KP244695 | KP308470 | KP308527 | - |
| <i>L. brasiliensis</i> | CDA 431 | <i>Cocos nucifera</i> | Brasil | KP244694 | KP308472 | KP308525 | - |
| <i>L. brasiliensis</i> | ARM357 | <i>Manihot esculenta</i> | Brasil | MK480492 | MK495401 | - | MN886581 |
| <i>L. brasiliensis</i> | ARM356 | <i>Manihot esculenta</i> | Brasil | MK480491 | MK495400 | - | MN886580 |
| <i>L. bruguierae</i> | CMW 41470* | <i>Bruguiera gymnorrhiza</i> | África do Sul | KP860832 | KP860677 | KP860755 | KU587875 |
| <i>L. bruguierae</i> | CMW 42480 | <i>Bruguiera gymnorrhiza</i> | África do Sul | KP860834 | KP860679 | KP860757 | KU587876 |
| <i>L. caatinguensis</i> | CMM 1325* | <i>Citrus sinensis</i> | Brasil | KT154760 | KT008006 | KT154767 | - |
| <i>L. caatinguensis</i> | IBL352 | <i>Anacardium occidentale</i> | Brasil | KT154759 | KT154753 | KT154766 | - |
| <i>L. chiangraiensis</i> | MFLUCC 21-0003* | Desconhecido | Tailândia | MW760854 | MW815630 | MW815628 | - |
| <i>L. chiangraiensis</i> | GZCC 21-0003 | Desconhecido | Tailândia | MW760853 | MW815629 | MW815627 | - |
| <i>L. cinnamomi</i> | CFCC 51997* | <i>Cinnamomum camphora</i> | China | MG866028 | MH236799 | MH236797 | MH236801 |
| <i>L. cinnamomi</i> | CFCC 51998 | <i>Cinnamomum camphora</i> | China | MG866029 | MH236800 | MH236798 | MH236802 |
| <i>L. citricola</i> | CBS 124707* | <i>Citrus sp.</i> | Irã | GU945354 | GU945340 | KU887505 | KU696351 |
| <i>L. citricola</i> | CBS 124706 | <i>Citrus sp.</i> | Irã | GU945353 | GU945339 | KU887504 | KU696350 |
| <i>L. crassispota</i> | CBS 118741* | <i>Santalum album</i> | Austrália | DQ103550 | DQ103557 | KU887506 | KU696353 |
| <i>L. crassispota</i> | CMW 13488 | <i>Eucalyptus urophylla</i> | Venezuela | DQ103552 | DQ103559 | KU887507 | KU696352 |
| <i>L. euphorbiaceicola</i> | CMM 3609* | <i>Jatropha curcas</i> | Brasil | KF234543 | KF226689 | KF254926 | - |

Tabela 2 - Números de acesso ao Genbank de sequências de DNA de *Lasiodiplodia* spp. usados nas análises filogenéticas

| Espécies | Número do isolado | Hospedeiro | Localidade | ITS | Continuação | | |
|----------------------------|-------------------|---------------------------|---------------|----------|-------------|-------------|-------------|
| | | | | | <i>TEF1</i> | <i>TUB2</i> | <i>RPB2</i> |
| <i>L. euphorbiaceicola</i> | CMW 33268 | <i>Adansonia</i> sp. | Senegal | KU887131 | KU887008 | KU887430 | KU887367 |
| <i>L. gilanensis</i> | CBS 124704* | <i>Citrus</i> sp. | Irã | GU945351 | GU945342 | KU887511 | KP872462 |
| <i>L. gilanensis</i> | CBS 124705 | <i>Citrus</i> sp. | Irã | GU945352 | GU945341 | KU887510 | KP872463 |
| <i>L. gonubiensis</i> | CMW 14077* | <i>Syzygium cordatum</i> | África do Sul | AY639595 | DQ103566 | DQ458860 | KU696359 |
| <i>L. gonubiensis</i> | CMW 14078 | <i>Syzygium cordatum</i> | África do Sul | AY639594 | DQ103567 | EU673126 | KU696358 |
| <i>L. gravistriata</i> | CMM 4564* | <i>Anacardium humile</i> | Brasil | KT250949 | KT250950 | - | - |
| <i>L. gravistriata</i> | CMM 4565 | <i>Anacardium humile</i> | Brasil | KT250947 | KT266812 | - | - |
| <i>L. hormozganensis</i> | CBS 124709* | <i>Olea</i> sp. | Irã | GU945355 | GU945343 | KU887515 | KU696361 |
| <i>L. hormozganensis</i> | CBS 124708 | <i>Mangifera indica</i> | Irã | GU945356 | GU945344 | KU887514 | KU696360 |
| <i>L. hormozganensis</i> | CBS 168.28 | <i>Cocos nucifera</i> | Indonésia | MT587427 | MT592138 | MT592621 | MT592316 |
| <i>L. iranensis</i> | CBS 124710* | <i>Salvadora persica</i> | Irã | GU945348 | GU945336 | KU887516 | KU696363 |
| <i>L. iranensis</i> | CBS 124711 | <i>Juglans</i> sp. | Irã | GU945347 | GU945335 | KU887517 | KU696362 |
| <i>L. laeliocattleyae</i> | CBS 130992* | <i>Mangifera indica</i> | Égito | JN814397 | JN814424 | KU887508 | KU696354 |
| <i>L. laeliocattleyae</i> | CBS 167.28 | <i>Laeliocattleya</i> sp. | Itália | MT587425 | MT592136 | MT592618 | MT592313 |
| <i>L. lignicola</i> | CBS 134112* | Madeira | Tailândia | JX646797 | KU887003 | JX646845 | KU696364 |
| <i>L. lignicola</i> | CGMCC 3.18449 | <i>Aquilaria crassna</i> | Laos | KY783466 | KY848619 | - | KY848586 |
| <i>L. macrospora</i> | CMM 3833 | <i>Jatropha curcas</i> | Brasil | KF226718 | KF234557 | KF254941 | - |
| <i>L. mahajangana</i> | CMW 27801* | <i>Terminalia catappa</i> | Madagascar | FJ900595 | FJ900641 | FJ900630 | KU696365 |
| <i>L. mahajangana</i> | CMW 27818 | <i>Terminalia catappa</i> | Madagascar | FJ900596 | FJ900642 | FJ900631 | KU696366 |
| <i>L. margaritacea</i> | CBS 122519* | <i>Adansonia gibbosa</i> | Austrália | EU144050 | EU144065 | KU887520 | KU696367 |
| <i>L. margaritacea</i> | CBS 138291 | <i>Combretum obovatum</i> | Zâmbia | KP872322 | KP872351 | KP872381 | KP872431 |
| <i>L. mediterrânea</i> | CBS 137783* | <i>Quercus ilex</i> | Itália | KJ638312 | KJ638331 | KU887521 | KU696368 |
| <i>L. mediterrânea</i> | CBS 137784 | <i>Vitis vinifera</i> | Itália | KJ638311 | KJ638330 | KU887522 | KU696369 |
| <i>L. microcondia</i> | CGMCC 3.18485* | <i>Aquilaria crassna</i> | Laos | KY783441 | KY848614 | - | KY848561 |
| <i>L. parva</i> | CBS 456.78* | Solo em campo de mandioca | Colômbia | EF622083 | EF622063 | KU887523 | KU696372 |
| <i>L. parva</i> | CBS 494.78 | Solo em campo de mandioca | Colômbia | EF622084 | EF622064 | EU673114 | KU696373 |
| <i>L. plurivora</i> | STE-U 5803* | <i>Prunus salicina</i> | África do Sul | EF445362 | EF445395 | KP872421 | KP872479 |

Tabela 2 - Números de acesso ao Genbank de sequências de DNA de *Lasiodiplodia* spp. usados nas análises filogenéticas

| Espécies | Número do isolado | Hospedeiro | Localidade | ITS | Continuação | | |
|----------------------------|-------------------|-------------------------------|----------------|----------|-------------|-------------|-------------|
| | | | | | <i>TEF1</i> | <i>TUB2</i> | <i>RPB2</i> |
| <i>L. plurivora</i> | STE-U 4583 | <i>Vitis vinifera</i> | África do Sul | AY343482 | EF445396 | KU887525 | KU696375 |
| <i>L. pontae</i> | CMM 1277* | <i>Spondias purpurea</i> | Brasil | KT151794 | KT151791 | KT151797 | - |
| <i>L. pontae</i> | CBS 117454 | <i>Anacardium occidentale</i> | Brasil | MT587432 | MT592144 | MT592626 | - |
| <i>L. pseudotheobromae</i> | CBS 116459* | <i>Gmelina arborea</i> | Costa Rica | EF622077 | EF622057 | EU673111 | KU696376 |
| <i>L. pseudotheobromae</i> | CBS 116460 | <i>Acacia mangium</i> | Costa Rica | KY783467 | KY848620 | KY848549 | KY848587 |
| <i>L. pseudotheobromae</i> | CBS 130991 | <i>Mangifera indica</i> | Egito | MT587433 | MT592145 | MT592629 | MT592325 |
| <i>L. rubropurpurea</i> | WAC 12535* | <i>Eucalyptus grandis</i> | Austrália | DQ103553 | DQ103571 | EU673136 | KU696380 |
| <i>L. rubropurpurea</i> | WAC 12536 | <i>Eucalyptus grandis</i> | Austrália | DQ103554 | DQ103572 | KU887530 | KU696381 |
| <i>L. subglobosa</i> | CMM 3872* | <i>Jatropha curcas</i> | Brasil | KF234558 | KF226721 | KF254942 | - |
| <i>L. subglobosa</i> | CMM 4046 | <i>Jatropha curcas</i> | Brasil | KF234560 | KF226723 | KF254944 | - |
| <i>L. syzygii</i> | GUCC 9719.1* | Maçã | Tailândia | MT990531 | MW016943 | MW014331 | - |
| <i>L. syzygii</i> | CBS:120512 | <i>Syzygium samarangense</i> | Tailândia | MT587434 | MT592147 | MT592632 | - |
| <i>L. tailândica</i> | CBS 138760* | <i>Mangifera indica</i> | Tailândia | KJ193637 | KJ193681 | - | - |
| <i>L. tailândica</i> | CGMCC 3.18384 | <i>Albizia chinensis</i> | China | KY767663 | KY751304 | KY751301 | KY751298 |
| <i>L. theobromae</i> | CBS 164.96* | Fruta | Papua | AY640255 | AY640258 | KU887532 | KU696383 |
| <i>L. theobromae</i> | CBS 306.58 | <i>Cocos nucifera</i> | - | EF622071 | EF622051 | MT592638 | MT592334 |
| <i>L. theobromae</i> | CFS 009 | <i>Cocos nucifera</i> | Brasil | MG870586 | MF997202 | MG870606 | MG870616 |
| <i>L. theobromae</i> | PE45L | <i>Theobroma cacao</i> | Malásia | OL831085 | OL863347 | OL863290 | OL863404 |
| <i>L. theobromae</i> | UACH264 | <i>Citrus latifolia</i> | México | MH277692 | MH286534 | MH279909 | - |
| <i>L. theobromae</i> | COAD 1788 | <i>Cocos nucifera</i> | Brasil | KP244698 | KP308476 | KP308528 | - |
| <i>L. theobromae</i> | CDA 467 | <i>Cocos nucifera</i> | Brasil | KP244702 | KP308473 | KP308536 | - |
| <i>L. tropica</i> | CGMCC 3.18477* | <i>Aquilaria crassna</i> | Laos | KY783454 | KY848616 | KY848540 | KY848574 |
| <i>L. venezuelensis</i> | WAC 12539* | <i>Acacia mangium</i> | Venezuela | DQ103547 | DQ103568 | KU887533 | KU696384 |
| <i>L. venezuelensis</i> | WAC 12540 | <i>Acacia mangium</i> | Venezuela | DQ103548 | DQ103569 | KU887534 | - |
| <i>L. viticola</i> | UCD 2604MO* | <i>Vitis vinifera</i> | Estados Unidos | HQ288228 | HQ288270 | HQ288307 | KU696386 |

Tabela 2 - Números de acesso ao Genbank de sequências de DNA de *Lasiodiplodia* spp. usados nas análises filogenéticas

| Espécies | Número do isolado | Hospedeiro | Localidade | ITS | TEF1 | Conclusão | |
|------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------|------------|-------------|------------------|-------------|
| | | | | | | TUB2 | RPB2 |
| <i>L. viticola</i> | CBS 128313 | <i>Vitis vinifera</i> | Estados Unidos | HQ288227 | HQ288269 | HQ288306 | KU696385 |
| <i>L. vitis</i> | CBS 124060* | <i>Vitis vinifera</i> | Itália | KX464148 | KX464642 | KX464917 | KX463994 |
| <i>Diplodia mutila</i> | CMW 7060* | <i>Fraxinus excelsior</i> | Holanda | AY236955 | AY236904 | AY236933 | EU339574 |

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: *Indica isolados tipo

3.2.4 *Caracterização morfológica e cultural de isolados de Lasiodiplodia spp.*

Para a caracterização cultural foram selecionados 11 isolados representantes da coleção, levando em consideração cada região de coleta, parte da planta com sintomas da doença e espécie de *Lasiodiplodia*. Um disco de micélio retirado da margem da colônia foi transferido para o centro da placa de Petri contendo meio de cultura BDA e incubado em 25 ± 2 °C sob regime de alternância luminosa de 12 h (Coutinho *et al.*, 2017). As medições do diâmetro da colônia foram realizadas em duas direções ortogonais, obtendo-se uma média para repetição. As avaliações foram concluídas quando o primeiro isolado atingiu a borda da placa, determinando-se assim a velocidade média de crescimento do fungo (mm/dia). A coloração da colônia (superfície e verso) foi avaliada 15 dias após a incubação, em meio de cultura BDA nas condições mencionadas acima, utilizando-se a carta de cores de Rayner (1970).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições, onde cada placa representou uma unidade experimental. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 1% de significância, utilizando o *software* Rstudio (v.4.0.2) com o pacote Easyanova (Arnhold, 2013).

A partir dos resultados das análises filogenéticas, um isolado de cada espécie foi selecionado para a caracterização morfológica e cultivados em placas de *Petri* em quatro meios de cultura diferentes para induzir o desenvolvimento das estruturas fúngicas. O meio de cultura batata-cenoura-ágar (BCA), batata-dextrose-ágar (BDA), *Synthetic nutriente-poor agar* (SNA) e Ágar-água (AA) ambos com acículas de *Pinus* sp. esterilizadas e submetidos a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 h de luz (Coutinho *et al.*, 2017). Os corpos de frutificação foram removidos manualmente e rompidos com 40steril esterilizado para as visualizações em microscópio de luz. Foram avaliados o tamanho, forma, cor, estrias, septação dos conídios, células conidiogênicas, presenças de paráfises e em seguida fotografados. Foram realizadas cinquenta medições dos conídios, considerando comprimento e largura, por microscopia associada ao programa computacional para análise de imagens Motic Image Plus 2.0[®].

3.2.5 *Avaliação da patogenicidade de isolados de Lasiodiplodia spp.*

Os isolados utilizados para a caracterização cultural foram utilizados para a avaliação da patogenicidade. A patogenicidade dos isolados foi testada em frutos de coco da variedade anão-verde, com aproximadamente cinco meses de idade após a abertura da

inflorescência, obtidos sem sintomas aparentes de doenças. As brácteas foram removidas para realizar a desinfestação superficial dos frutos com sabão neutro e água corrente. Em seguida, os frutos foram desinfestados superficialmente, imersos em álcool 70% por 30 segundos e hipoclorito de sódio (NaClO) 1% por dois minutos, os quais foram posteriormente enxaguados com água destilada esterilizada (ADE) e, em seguida, secos em temperatura ambiente.

Após a secagem dos frutos, os mesmos foram perfurados em três pontos equidistantes próximos as brácteas com aproximadamente 4 mm de profundidade com o auxílio de furador de rolha 41sterilizado de 5 mm de diâmetro, dentro da capela de fluxo laminar. Cada isolado foi inoculado na região perfurada com um disco de micélio cultivado por dois dias em BDA sob incubação de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h. No tratamento controle, somente um disco de BDA sem crescimento fúngico foi colocado sobre o ferimento.

Em seguida, os frutos foram mantidos em câmara úmida, utilizando saco plástico transparente e algodão umedecido com ADE e incubados a 25 ± 2 °C sob fotoperíodo de 12 h. A patogenicidade e a agressividade dos isolados foram avaliadas sete dias após a inoculação, medindo-se o comprimento e a largura da lesão em cada fruto com o auxílio de um paquímetro digital e fotografado (Rosado *et al.*, 2016). O experimento foi realizado duas vezes. Os fungos foram reisolados dos tecidos infectados para completar os postulados de Koch.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, onde cada isolado foi inoculado em três frutos e em cada fruto tinha três furos. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) utilizando o *software* Rstudio (v.4.0.2) com o pacote Easyanova (Arnhold, 2013) e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott significativo a 1%.

3.3 Resultados

3.3.1 Obtenção dos isolados

Foram obtidos 188 isolados nas principais regiões produtoras de coco no Nordeste brasileiro (Ceará, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Maranhão), distribuídos em 11 municípios e 24 plantações/locais (Tabela 3). Em todas as áreas visitadas foram detectados sintomas de doenças no coqueiro e frutos.

Tabela 3 - Lista dos estados nordestinos pesquisados neste estudo com municípios correspondentes, número de plantações/locais avaliados e número de isolados de *Lasiodiplodia* obtidos

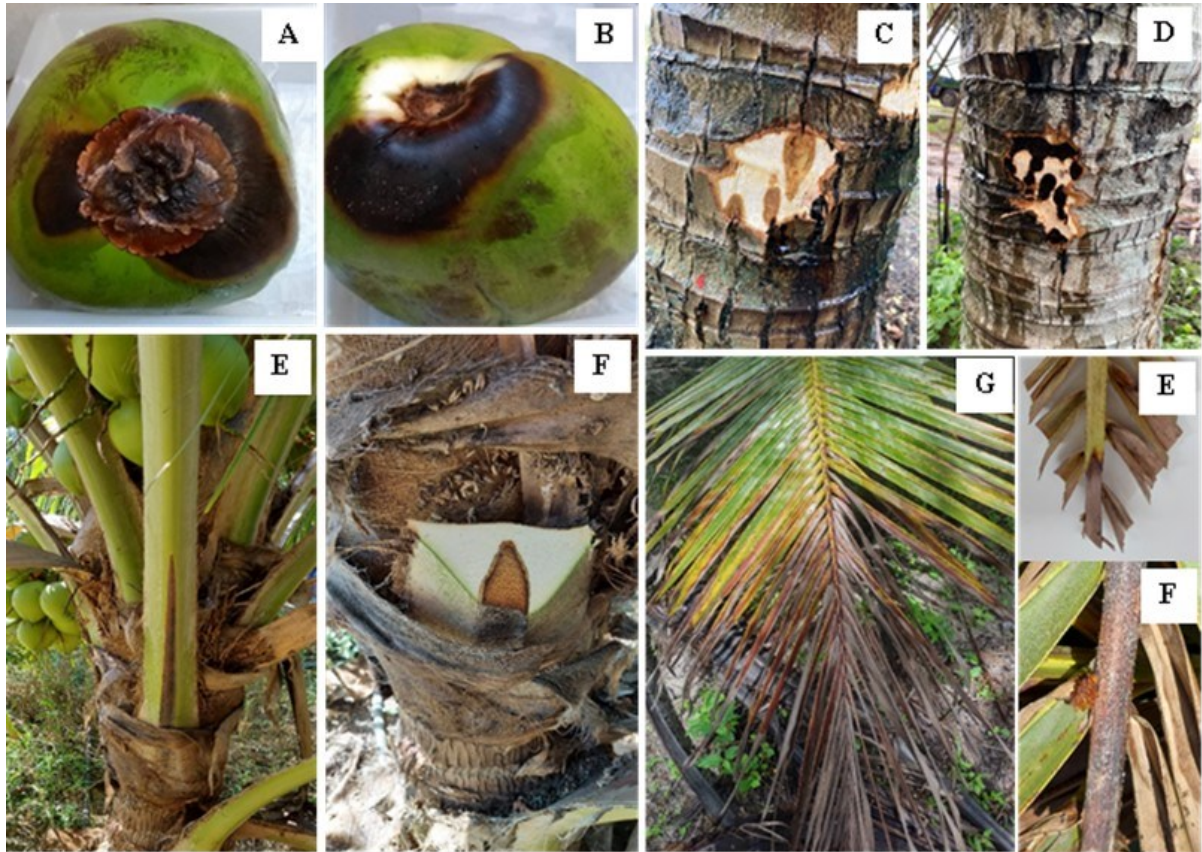
| Estados | Municípios | Nº de plantações/locais | Nº de isolados |
|----------------------------|--------------------|--------------------------------|-----------------------|
| Ceará | Acaraú | 4 | 35 |
| | Caucaia | 1 | 2 |
| | Fortaleza | 3 | 7 |
| | Itapipoca | 1 | 9 |
| | Paraipaba | 6 | 53 |
| | Trairí | 1 | 15 |
| Bahia | Riachão das Neves | 1 | 4 |
| Maranhão | Balsas | 1 | 3 |
| Pernambuco | Petrolina | 1 | 15 |
| Rio Grande do Norte | Alto dos Rodrigues | 4 | 43 |
| | Apodi | 1 | 2 |
| Total | 11 | 24 | 188 |

Fonte: Elaborada pela autora.

Todas as amostras coletadas, tanto sintomáticas quanto assintomáticas, resultaram no isolamento de fungos com características morfológicas típicas do gênero *Lasiodiplodia* (Phillips *et al.*, 2013). Dos 188 isolados obtidos, 57 estavam associados a podridão peduncular do coco, 45 à queima das folhas, 23 a podridão na base da folha e quatro à resinose no estipe (Figura 1). Além disso, 59 isolados foram obtidos de frutos sadios, nos quais o fungo estava presente em condição endofítica. Nenhum outro gênero fúngico além de *Lasiodiplodia* spp. foi identificado nas amostragens.

Dos 50 isolados selecionados para a análise filogenética, 42 estavam associados a algum tipo de sintoma nas plantas, enquanto 8 foram obtidos de frutos sadios, nos quais o fungo estava presente de forma endofítica.

Figura 1 - Sintomas de podridão peduncular do coco, resinose no estipe, podridão na base da folha do coqueiro e queima das folhas em plantações no Nordeste brasileiro associados a *Lasiodiplodia* spp. A – B: Podridão peduncular do coco. C - D: Resinose no estipe. E – F: Podridão na base da folha do coqueiro. G – E: Queima das folhas. F: Exsudação de resina na base do folíolo



Fonte: Elaborada pela autora.

3.3.2 Análise filogenética

Cinquenta isolados selecionados representativos da diversidade morfológica geral, das diferentes regiões amostradas e dos diferentes órgãos da planta (Tabela 1) foram identificados com base em análises filogenéticas pelos métodos de Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (IB) da região ITS e partes dos genes *TEF1*, *TUB2* e *RPB2*, individualmente e combinados, e produziram árvores com topologias quase idênticas na análise concatenada.

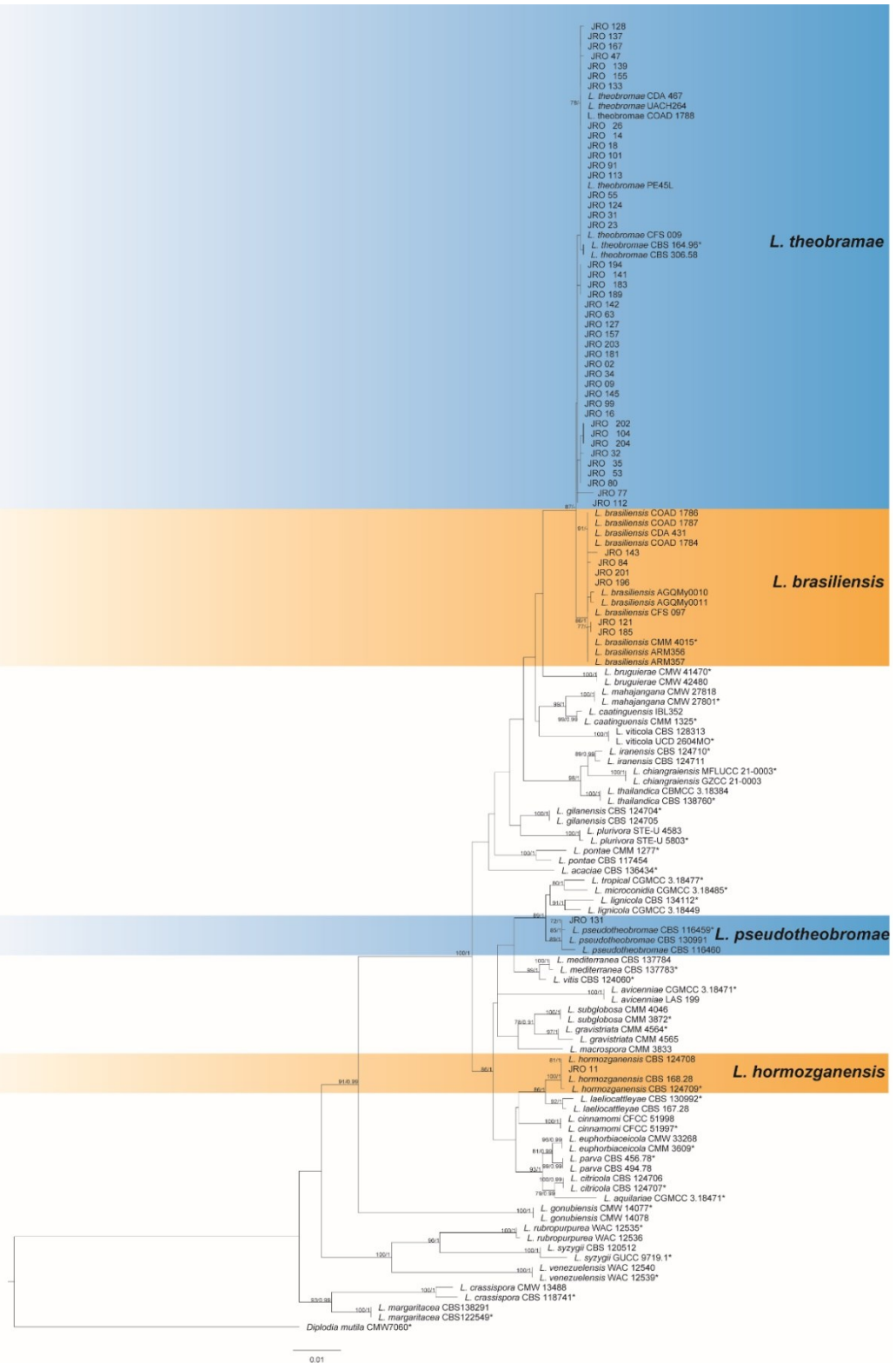
O conjunto dos dados combinados de ITS, *TEF1*, *TUB2* e *RPB2* consistiam em 131 táxons do grupo interno (50 seqüências obtidas neste estudo e 81 isolados de referência de 36 espécies de *Lasiodiplodia* descritas e disponíveis no GenBank) e um grupo externo (*Diplodia mutila* (Fr.) Fr.). O alinhamento combinado continha 1.725 caracteres, dos quais 474 correspondiam à região ITS, 309 correspondiam ao gene *TEF1*, 410 correspondiam ao gene *TUB2* e 532 ao gene *RPB2*. A árvore de máxima verossimilhança dos genes concatenados é apresentada na figura 2 com valores de suporte de *bootstrap* e probabilidade posterior acima dos ramos, respectivamente.

O conjunto dos dados combinados dos 50 isolados obtidos neste estudo agruparam-se em quatro clados correspondentes às espécies de *Lasiodiplodia* descritas anteriormente (Figura 2). A grande maioria dos isolados (42) agruparam-se com *L. theobromae sensu stricto*. O segundo clado com seis isolados (JRO 84, JRO 121, JRO 143, JRO 185, JRO 196 e JRO 201) agrupou-se com *L. brasiliensis*, com 86% de suporte *bootstrap*. No terceiro clado, apenas um isolado (JRO 131) agrupou-se com *L. pseudotheobromae*, com 89% de suporte *bootstrap*. O quarto clado com um isolado (JRO 11) agrupou-se com *L. hormozganensis* Abdollahz., Zare & A. J. L Phillips, com 100% de suporte de *bootstrap* (Figura 2). Esta topologia de árvore foi semelhante com a análise filogenética do gene *TEF1*. As demais análises baseadas em um único gene não formaram os quatro clados bem definidos.

O número de espécies de *Lasiodiplodia* encontrada em cada região de plantação variou em função do número de amostras analisadas. Entre as amostras coletadas no estado do Ceará (30 isolados) foram identificadas quatro espécies de *Lasiodiplodia* (*L. theobromae sensu stricto*, *L. brasiliensis*, *L. pseudotheobromae* e *L. hormozganensis*). No Rio Grande do Norte (11 isolados) foram observadas *L. theobromae sensu stricto* e *L. brasiliensis*. No Maranhão (três isolados) e Pernambuco (quatro isolados) observou-se apenas a espécie *L. theobromae sensu stricto*. Na Bahia (dois isolados) foi constatada apenas uma espécie, *L. brasiliensis*.

As espécies de *Lasiodiplodia* também variaram entre as doenças. *L. theobromae sensu stricto*, *L. pseudotheobromae* e *L. hormozganensis* foram identificadas causando podridão peduncular do coco, enquanto *L. theobromae sensu stricto* e *L. brasiliensis* causando queima das folhas do coqueiro e resinose no estipe.

Figura 2 - Árvore filogenética de espécies de *Lasiodiplodia* utilizando o método de Máxima Verossimilhança do conjunto de dados combinados de ITS, *TEF1*, *TUB2* e *RPB2*. Os valores de bootstrap ML ($\geq 70\%$) e probabilidade posterior IB ($\geq 0,7$) são fornecidos nos nós, respectivamente. A árvore foi enraizada com *D. mutila* CMW 7060. As espécies tipos foram destacadas com *



Fonte: Elaborada pela autora.

A diversidade dos haplótipos dos 50 isolados analisados com base no conjunto de dados combinados das regiões ITS, *TEF1*, *TUB2* e *RPB2* evidenciou a existência de 20 haplótipos.

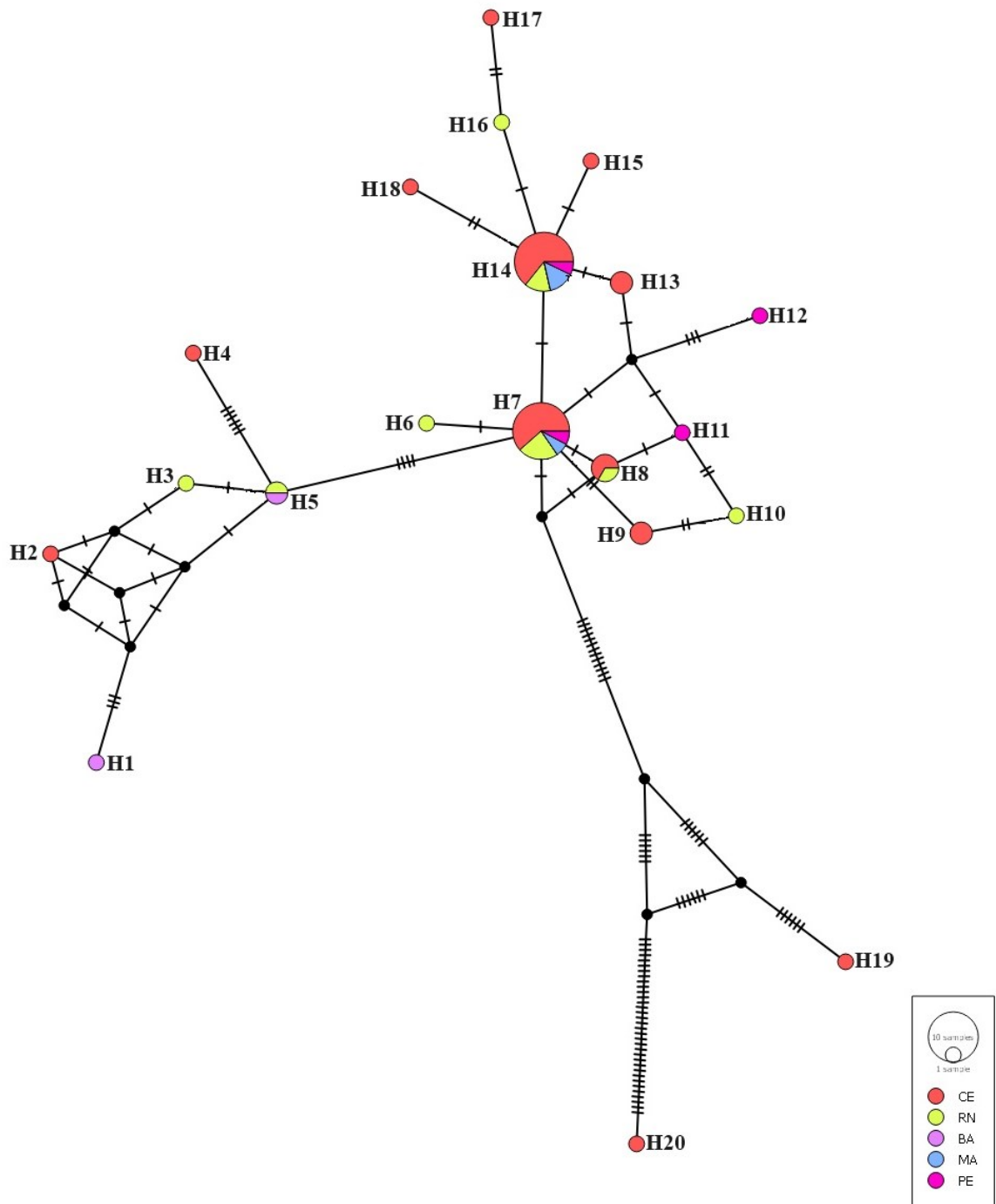
O haplótipo "H14" foi o mais frequente nas localidades em estudo, totalizando 14 isolados em 50 sequências obtidas (Tabela 4). Este haplótipo esteve presente em quatro dos cinco estados onde foram coletados. O segundo haplótipo mais frequente foi o "H7", este também apareceu em quatro estados, totalizando 13 isolados. Observamos 14 haplótipos singletons, ou seja, foram identificados apenas uma vez e, portanto, eram exclusivos do local (Figura 3).

Tabela 4 - Distribuição dos 20 haplótipos de *Lasiodiplodia* spp. entre 50 sequências combinadas de ITS, *TEF1*, *TUB2* e *RPB2* analisadas. Os números indicam a quantidade de haplótipos encontradas por estado e o traço indica ausência do haplótipo

| Haplótipos | Total | Bahia | Ceará | Maranhão | Rio Grande do Norte | Pernambuco |
|------------|-------|-------|-------|----------|---------------------|------------|
| H1 | 1 | 1 | - | - | - | - |
| H2 | 1 | - | 1 | - | - | - |
| H3 | 1 | - | - | - | 1 | - |
| H4 | 1 | - | 1 | - | - | - |
| H5 | 2 | 1 | - | - | 1 | - |
| H6 | 1 | - | - | - | 1 | - |
| H7 | 13 | - | 8 | 1 | 3 | 1 |
| H8 | 3 | - | 2 | - | 1 | - |
| H9 | 2 | - | 2 | - | - | - |
| H10 | 1 | - | - | - | 1 | - |
| H11 | 1 | - | - | - | - | 1 |
| H12 | 1 | - | - | - | - | 1 |
| H13 | 2 | - | 2 | - | - | - |
| H14 | 14 | - | 9 | 2 | 2 | 1 |
| H15 | 1 | - | 1 | - | - | - |
| H16 | 1 | - | - | - | 1 | - |
| H17 | 1 | - | 1 | - | - | - |
| H18 | 1 | - | 1 | - | - | - |
| H19 | 1 | - | 1 | - | - | - |
| H20 | 1 | - | 1 | - | - | - |
| Total | 50 | 2 | 30 | 3 | 11 | 4 |

Fonte: Elaborada pela autora.

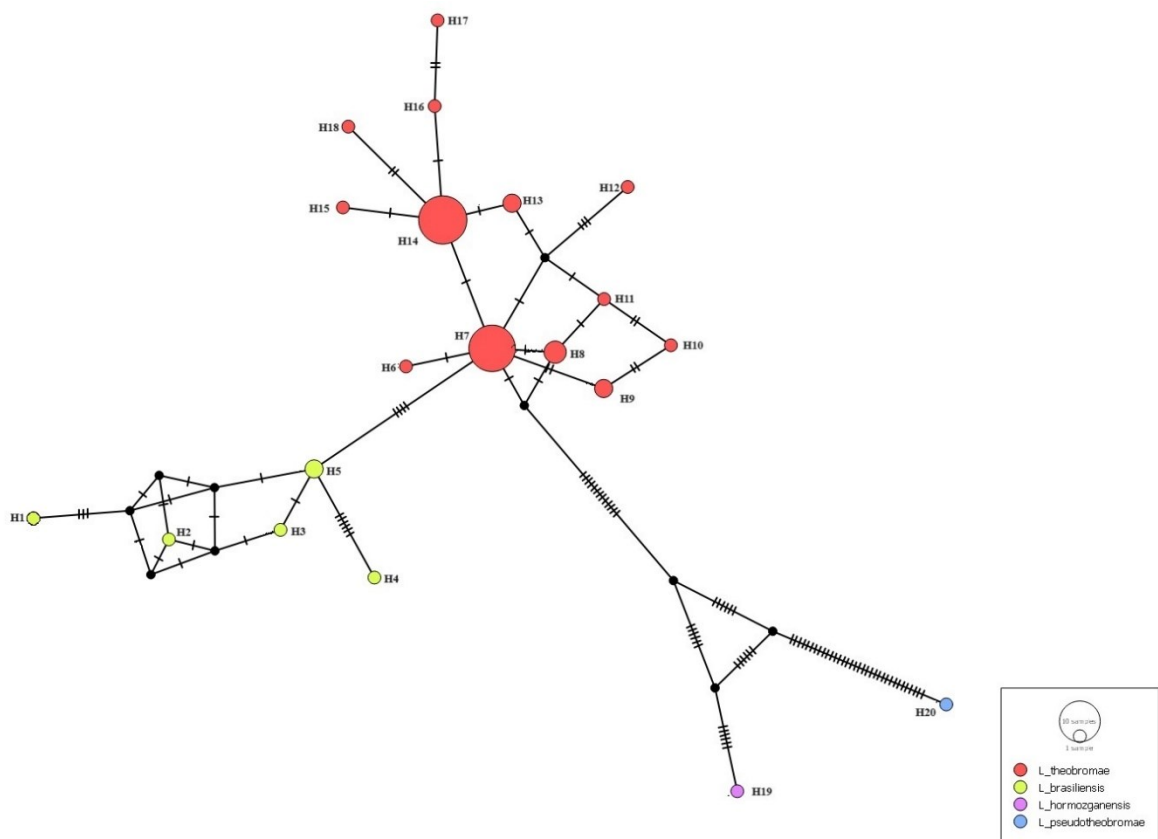
Figura 3 - Rede de haplótipos baseada na região geográfica de coleta construída com base no conjunto de dados combinados de ITS, *TEF1*, *TUB2* e *RPB2* e. Os haplótipos são diferenciados por cores e os tamanhos dos círculos indicam as frequências dos haplótipos. O tracejado das ramificações indicam o total de eventos de mutação e as barras de conexão entre dois haplótipos vizinhos representam um único evento de mutação.



Fonte: Elaborada pela autora.

Os cinco primeiros haplótipos (H1 a H5) estão representados pela espécie *L. Brasiliensis*, enquanto que do haplótipo “H6” até o haplótipo “H18” são pertencentes à espécie *L. Theobromae sensu stricto*. A espécie *L. Hormozganensis* foi identificada e pertence ao haplótipo “H19” e a espécie *L. Pseudotheobromae* ao haplótipo “H20” (Figura 4).

Figura 4 - Rede de haplótipos baseado nas espécies de *Lasiodiplodia* construída com base no conjunto de dados combinados de ITS, *TEF1*, *TUB2* e *RPB2*. Os haplótipos são diferenciados por cores e os tamanhos dos círculos indicam as frequências dos haplótipos. O tracejado das ramificações indica o total de eventos de mutação e as barras de conexão entre dois haplótipos vizinhos representam um único evento de mutação. Círculos pretos são os nós.



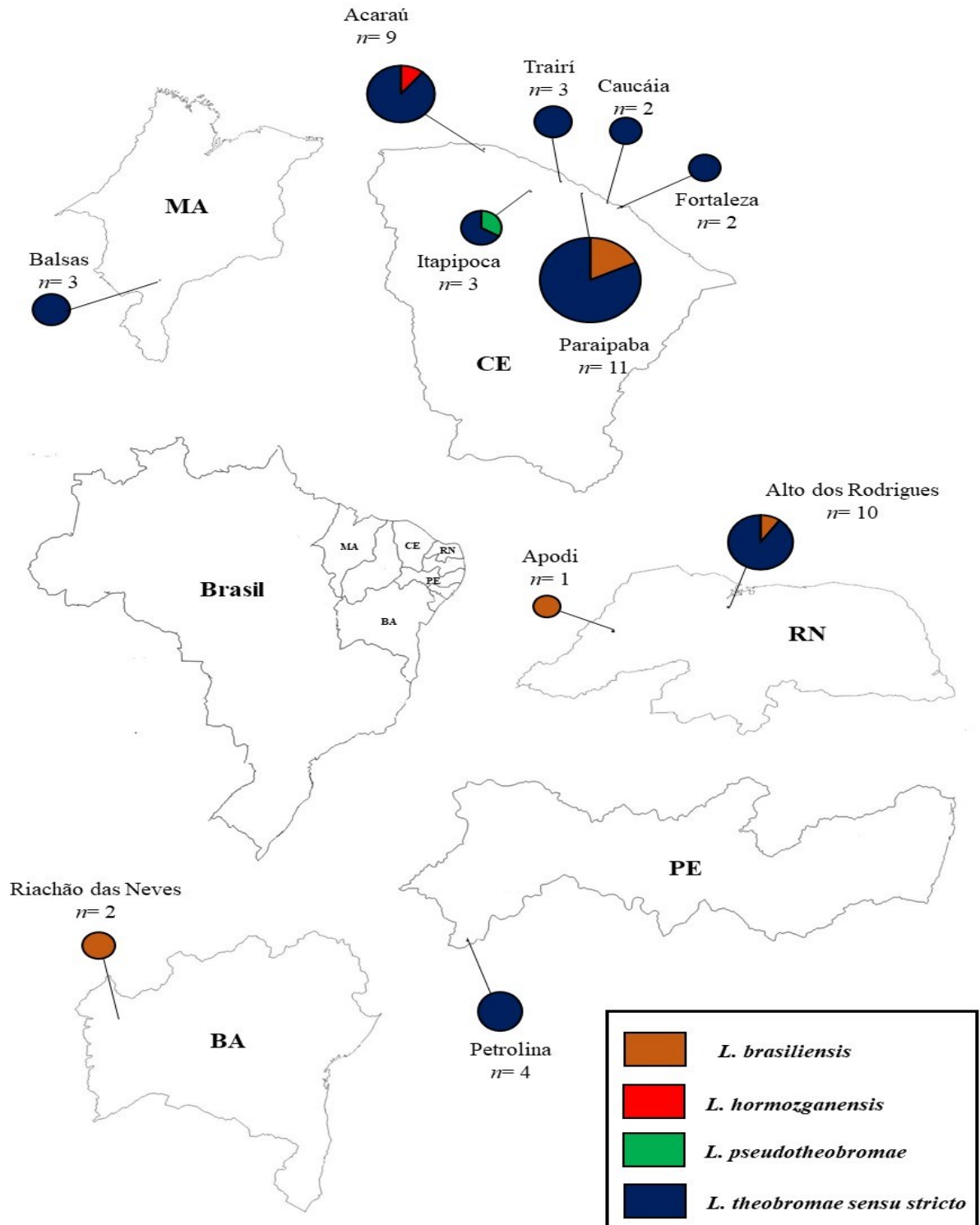
Fonte: Elaborada pela autora.

3.3.3 Distribuição de espécies de *Lasiodiplodia*

L. theobromae sensu stricto foi a espécie mais frequentemente isolada (84%) entre as amostras com sintomas de doenças no coqueiro, seguida por *L. Brasiliensis* (12%), *L. Pseudotheobromae* (2%) e *L. Hormozganensis* (2%). A distribuição das espécies de *Lasiodiplodia* variou nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Maranhão e Bahia. *L. Theobromae sensu stricto* foi encontrado em todos os estados, exceto na Bahia. *L.*

Brasiliensis foi encontrada em três estados dos cinco amostrados. *L. Pseudotheobromae* e *L. Hormozganensis* foram identificadas apenas nas populações de Itapipoca e Acaraú, respectivamente, localizadas no Ceará. No Ceará foi encontrada as quatro espécies de *Lasiodiplodia* identificadas nesta pesquisa. No Rio Grande do Norte, as espécies *L. Brasiliensis* e *L. Theobromae sensu stricto*. Na Bahia apenas *L. Brasiliensis*. No Maranhão e Pernambuco apenas *L. Theobromae sensu stricto* (Figura 5).

Figura 5 - Locais de coleta de isolados de *Lasiodiplodia* spp. associados à doenças no coqueiro em cinco estados brasileiro. Os círculos representam a frequência de associação de cada espécie com plantas apresentando sintomas de doença em cada pomar amostrado, n é o número de isolados analisados em cada pomar. BA = Bahia, CE = Ceará, MA = Maranhão, PE = Pernambuco, RN = Rio Grande do Norte.



Fonte: Elaborada pela autora.

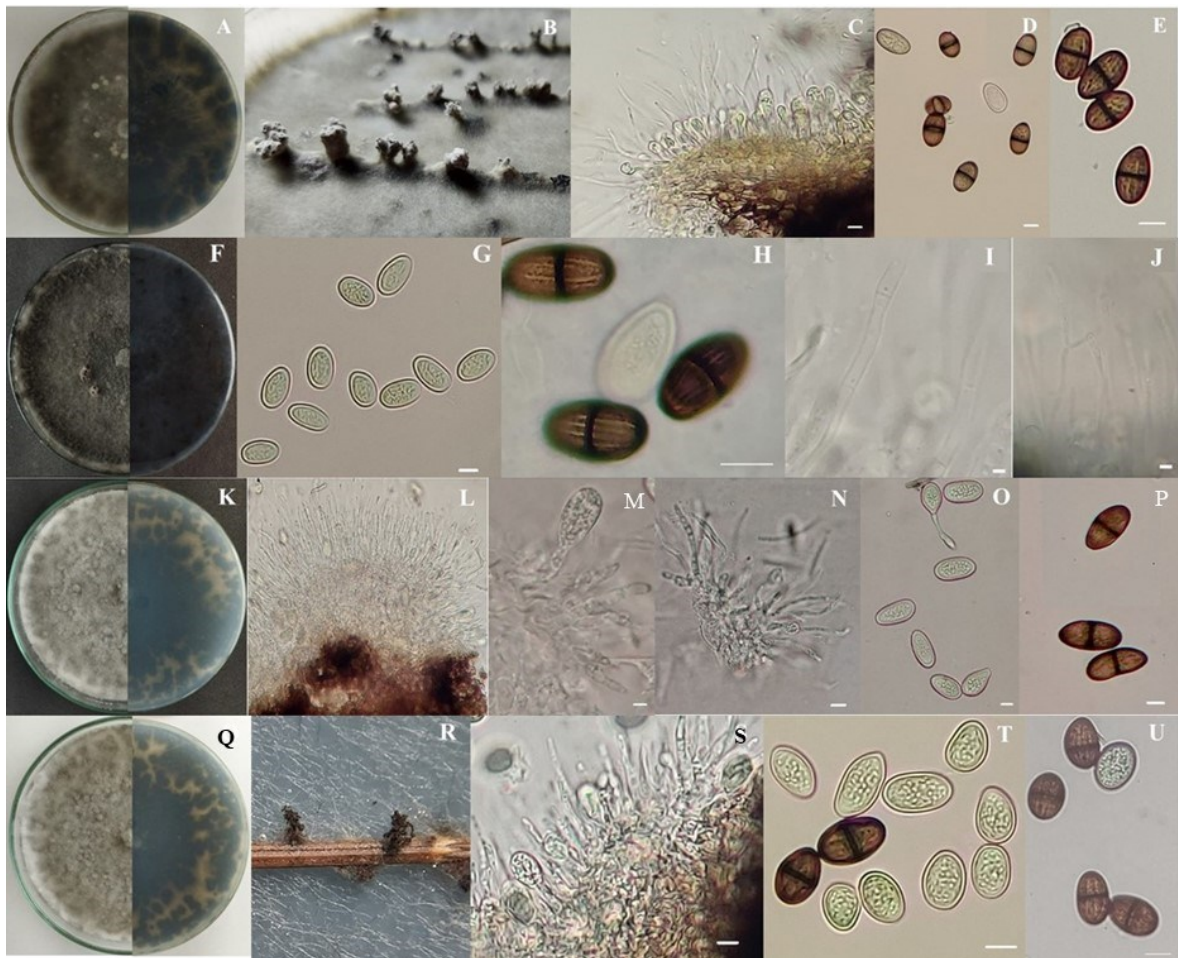
3.3.4 Caracterização morfológica e cultural das espécies de *Lasiodiplodia*

Entre os meios de cultura testados, o BDA suplementado com acículas de *Pinus* sp. foi o que proporcionou a melhor esporulação dos isolados selecionados. Esse meio favoreceu o desenvolvimento das estruturas reprodutivas fúngicas, permitindo uma caracterização morfológica mais eficiente das espécies analisadas.

Os quatro isolados, representando diferentes espécies, formaram picnídios nas acículas de *Pinus* sp. cultivadas em BDA entre duas e quatro semanas. Nenhuma estrutura sexual foi observada. Todas as espécies desenvolveram o estado assexuado típico do gênero *Lasiodiplodia*.

Os conídios de *L. Theobromae sensu stricto*, *L. Brasiliensis*, *L. Hormozganensis* e *L. Pseudotheobromae* inicialmente são hialinos e asseptados, tornando-se pigmentados e com um septo mediano transversal e estrias longitudinais ao atingir a maturidade (Figura 6 – D, H, O, P e T). As células conidiogênicas são holoblásticas, hialinas e discretas sendo produzidas entre as inúmeras paráfises (Figuras 6 – C, M e S). As paráfises de *L. Brasiliensis* são hialinas, cilíndricas, asseptadas e ápice arredondado (Figura 6 – C). O isolado de *L. Hormozganensis* apresentou paráfises hialinas, cilíndricas, inicialmente asseptadas, tornando-se septadas quando madura, apresentando raramente algumas ramificações (Figura 6 – I e J). Os isolados de *L. Pseudotheobromae* e *L. Theobromae sensu stricto* apresentaram paráfises hialinas, cilíndricas, septadas com a extremidade arredondada (Figuras 6 – N e S).

Figura 6 - *Lasiodiplodia* spp. *Lasiodiplodia brasiliensis*. A: Frente e verso da placa em BDA com 15 dias; B: picnídios em meio de cultura BDA com 40 dias; C: corte transversal do picnídio, paráfises e conidiogênese; D: conídios maduros e imaturo; E: estrias longitudinais nos conídios maduros. *Lasiodiplodia hormozganensis*. F: Frente e verso da placa em BDA com 15 dias; G: conídios imaturos; H: estrias longitudinais nos conídios maduros; I: paráfise septada; J: paráfise ramificada. *Lasiodiplodia pseudotheobromae*. K: Frente e verso da placa em BDA com 15 dias; L: corte transversal do picnídio e paráfises; M: conidiogênese e paráfises; N: paráfises; O: conídios imaturos; P: conídios maduros. *L. Theobromae sensu stricto*. Q: Frente e verso da placa em BDA com 15 dias; R: cirros conidiais em meio de cultura ágar água (AA); S: corte transversal do picnídio, paráfises e conidiogênese; T: conídios maduros e imaturo; U: estrias longitudinais nos conídios maduros. Escala de barra: 10 μ m.



Fonte: Elaborada pela autora.

Os conídios de *L. Brasiliensis* eram de 20,0 – 29,9 (24,0) μ m \times 11,3 – 15,2 (13,1) μ m. Os conídios de *L. Hormozganensis* possuem 19,9 – 26,1 (23,0) μ m \times 10,5 – 14,9 (13,2) μ m. A espécie *L. Pseudotheobromae* apresentam conídios 29,5 – 34,6 (31,9) μ m \times 13,3 – 18,5 (16,4) μ m. Enquanto os conídios de *L. Theobromae sensu stricto* eram 20,1 – 26,1 (23,0) μ m \times 11,9 – 17,5 (14,0) μ m. Comparações das dimensões dos conídios deste estudo e de pesquisas anteriores estão descritos na tabela 5.

Tabela 5 - Dimensão de conídios de *Lasiodiplodia* spp. examinados neste estudo e em estudos anteriores

| Espécies | Conídios (μm) | Referências |
|------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| <i>L. brasiliensis</i> | 20,0 - 29,9 \times 11,3 - 15,2 | Neste estudo |
| | 22,7 - 29,2 \times 11,7 - 17,0 | Netto <i>et al.</i> , 2014 |
| | 20,0 - 26,0 \times 12,0 - 18,0 | Rosado <i>et al.</i> , 2016 |
| | 22,8 - 28,7 \times 11,9 - 16,7 | Correia <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>L. hormozganensis</i> | 19,9 - 26,1 \times 10,5 - 14,9 | Neste estudo |
| | 19,6 - 23,4 \times 11,7 - 13,3 | Abdollahzadeh <i>et al.</i> , 2010 |
| | 15,6 - 26,0 \times 10,4 - 13,0 | Brito <i>et al.</i> , 2020 |
| | 21,0 - 23,0 \times 13,0 - 13,4 | Netto <i>et al.</i> , 2024 |
| <i>L. pseudotheobromae</i> | 29,5 - 34,6 \times 13,3 - 18,5 | Neste estudo |
| | 23,5 - 32,0 \times 14,0 - 18,0 | Alves <i>et al.</i> , 2008 |
| | 25,0 - 32,0 \times 14,0 - 18,0 | Rosado <i>et al.</i> , 2016 |
| | 26,0 - 31,0 \times 13,0 - 16,0 | Machado <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>L. theobromae sensu stricto</i> | 20,1 - 26,1 \times 11,9 - 17,5 | Neste estudo |
| | 20,8 - 26,0 \times 13,0 - 15,6 | Brito <i>et al.</i> , 2020 |
| | 22,4 - 24,2 \times 12,9 - 14,3 | Abdollahzadeh <i>et al.</i> , 2010 |
| | 26,2 - 27,0 \times 14,0 - 14,4 | Alves <i>et al.</i> , 2008 |

Fonte: Elaborada pela autora.

Entre os isolados de *L. theobromae sensu stricto* a taxa média de crescimento micelial foi de 7,7 cm/dia, 7,6 cm/dia para *L. hormozganensis*, 6,6 cm/dia para *L. brasiliensis* e 6,0 cm/ dia para *L. pseudotheobromae*. Observou-se ainda entre os isolados e espécies, diferença significativa entre as médias de crescimento micelial, ocorrendo também variação na coloração da colônia na população de fungos cultivados em BDA (Tabela 6).

Tabela 6 - Taxa de crescimento micelial e coloração da colônia de 11 isolados de *Lasiodiplodia* spp. examinados neste estudo, cultivados em meio BDA

| Isolado | Espécie | Crescimento (mm/dia) * | Coloração da colônia*** | |
|---------|------------------------------|---------------------------|-------------------------|-----------------|
| | | | Frente | Verso |
| JRO 53 | <i>L. theobromae s. str.</i> | 7,8 A** | Dark mouse grey | Leaden black |
| JRO 55 | <i>L. theobromae s. str.</i> | 7,6 A | Pale mouse grey | Leaden black |
| JRO 11 | <i>L. hormozganensis</i> | 7,6 A | Dark mouse grey | dark slate blue |
| JRO 127 | <i>L. theobromae s. str.</i> | 7,5 A | Pale mouse grey | Leaden black |
| JRO 204 | <i>L. theobromae s. str.</i> | 7,2 B | Olivaceous grey | Leaden black |
| JRO 167 | <i>L. theobromae s. str.</i> | 6,9 C | Iron grey | Dark slate blue |
| JRO 124 | <i>L. theobromae s. str.</i> | 6,7 C | Olivaceous grey | Leaden black |
| JRO 196 | <i>L. brasiliensis</i> | 6,7 C | Olivaceous grey | Leaden black |
| JRO 185 | <i>L. brasiliensis</i> | 6,7 C | Mouse gray | Dark slate blue |
| JRO 194 | <i>L. theobromae s. str.</i> | 6,5 C | Pale olivaceous grey | Iron grey |
| JRO 131 | <i>L. pseudotheobromae</i> | 6,0 D | Smoke grey | Smoke grey |

Fonte: Elaborada pela autora.

Notas: *Média de cinco repetições por tratamento. **Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 1% de significância. ***Coloração segundo a carta de cores de Rayner (1970).

3.3.5 Caracterização patogênica dos isolados

Todos os 11 isolados testados foram patogênicos, causando lesões visíveis nos frutos (cocos) a partir do quarto dia após a inoculação. Esses isolados foram provenientes de amostras com sintomas de queima das folhas, podridão peduncular do coco, podridão da base foliar e resinose no estipe. Os sintomas típicos da podridão peduncular ocasionado por *Lasiodiplodia* spp. foram observados sete dias após a inoculação, caracterizando-se por lesões necróticas de coloração marrom-escuro, acompanhadas de crescimento micelial ao redor dos pontos de inoculação. Nesses locais, foi possível identificar anasarca e a formação de uma linha divisória bem definida entre os tecidos doentes e saudáveis. Em contraste, os frutos do tratamento controle permaneceram assintomáticos (Figura 7). Durante a progressão da doença, observaram-se numerosos cirros conidiais emergindo dos picnídios presentes sobre as lesões.

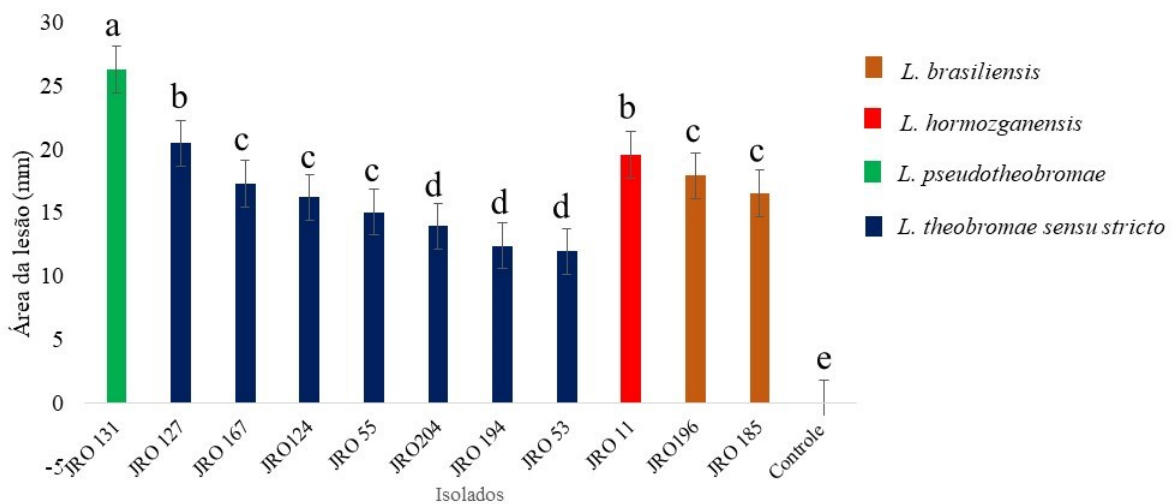
Figura 7 - Resultado do teste de patogenicidade com 11 isolados de *Lasiodiplodia* spp. sete dias após a inoculação em frutos de coco. A: JRO 131, B: JRO 127, C: JRO 167, D: JRO 124, E: JRO 55, F: JRO 204, G: JRO 194, H: JRO 53, I: JRO 11, J: JRO 196, L: JRO 185, M: controle.



Fonte: Elaborada pela autora.

Houve diferenças ($P \leq 0,01$) na agressividade entre as espécies de *Lasiodiplodia*. *L. pseudotheobromae* foi a espécie mais agressiva de todas as espécies testadas, causando lesões grandes, em média de $26,26 \text{ cm}^2$. As outras espécies apresentavam lesões variando de $11,96 \text{ cm}^2$ a $20,46 \text{ cm}^2$ e diferiam significativamente do controle (Figura 8). Foi possível reisolar o fungo com características de *Lasiodiplodia* spp. dos frutos inoculados e completar o postulado de Kock.

Figura 8 - Agressividade média das lesões em frutos de coqueiro inoculados com isolados de *Lasiodiplodia* spp. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 1% de significância.



Fonte: Elaborada pela autora.

3.4 Discussão

Neste estudo foram obtidos isolados de *Lasiodiplodia* causando as doenças queima das folhas, podridão peduncular do coco e resinose no estipe nas principais regiões produtoras de coco no Nordeste brasileiro: Ceará (30 isolados), Rio Grande do Norte (11 isolados), Pernambuco (quatro isolados), Maranhão (três isolados) e Bahia (dois isolados). Até o momento, as pesquisas desenvolvidas com *Lasiodiplodia* associadas às doenças queima das folhas e podridão peduncular do coco incluíram dados de 45 isolados da Paraíba e 26 isolados de Pernambuco (Coelho *et al.*, 2022), além de 10 isolados do Rio de Janeiro, oito de Pernambuco, dois do Pará, um da Bahia, um de Alagoas e um de Sergipe (Santos *et al.*, 2020) e 18 isolados da Bahia, cinco isolados do Ceará, 36 isolados de Minas Gerais e um isolado da Paraíba (Rosado *et al.*, 2016). Como observado, ainda não havia um levantamento de isolados que incluísse vários estados da região Nordeste, incluindo o Ceará, o maior estado produtor de coco do Nordeste e do Brasil.

Por meio de uma abordagem polifásica foram identificados neste estudo a ocorrência de *L. brasiliensis* e *L. theobromae sensu stricto* como agentes causadores da queima das folhas e resinose no estipe e *L. hormozganensis*, *L. pseudotheobromae* e *L. theobromae sensu stricto*, como agentes causadores da podridão peduncular do coco. Em pesquisa desenvolvida por Coelho *et al.* (2022), foram identificadas as espécies *L. brasiliensis*, *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae sensu stricto* e *L. subglobosa* como agente etiológico da queima das folhas e podridão peduncular do coco. Enquanto, Santos *et al.*, (2020) encontraram as espécies *L. brasiliense*, *L. pseudotheobromae*, *L. laeliocattleyae* causando a queima das folhas no coqueiro.

Diante das pesquisas já desenvolvidas com o coqueiro, até o momento não há registros de *Lasiodiplodia hormozganensis* causando doenças nessa cultura. Assim, este estudo representa o primeiro relato da ocorrência dessa espécie como agente causal da podridão peduncular do coco, tanto no Brasil quanto em nível mundial.

Até o momento, a resinose no estipe do coqueiro tem sido atribuída principalmente ao fungo *Thielaviopsis paradoxa* (De Seynes) Höhn. No entanto, os resultados obtidos nesta pesquisa indicam que o quadro sintomático de resinose também pode ser causado por espécies do gênero *Lasiodiplodia*, especificamente *Lasiodiplodia theobromae sensu stricto* e *Lasiodiplodia brasiliensis*, ambas associadas à ocorrência da resinose no estipe.

No estado do Ceará foram encontradas quatro espécies de *Lasiodiplodia* (*L. brasiliensis*, *L. hormozganensis*, *L. pseudotheobromae* e *L. theobromae sensu stricto*) em

coqueiros, enquanto que no Rio Grande do Norte foram encontradas as espécies *L. brasiliensis* e *L. theobromae sensu stricto*, na Bahia apenas *L. brasiliensis* e no Maranhão e Pernambuco somente *L. theobromae sensu stricto*. A diversidade de espécies por estado pode ter sido influenciada pelo número de isolados analisados. Visto que no Ceará, onde foi observado as quatro espécies de *Lasiodiplodia*, foram analisados 30 isolados, enquanto que no Rio Grande do Norte, Pernambuco, Maranhão e Bahia foram analisados onze, quatro, três e dois isolados, respectivamente.

Após a identificação filogenética, verificou-se que *L. theobromae sensu stricto* foi a espécie mais frequentemente (84%) isolada entre as amostras com sintomas de doenças no coqueiro. Da mesma forma, Netto *et al.* (2014) relataram esta espécie sendo predominante (44%) entre cinco espécies de *Lasiodiplodia* associadas com a podridão peduncular do mamão (*Carica papaya*). Assim como, em estudos de doenças no coqueiro, onde 93% dos isolados foram identificados como *L. theobromae sensu stricto* (Coelho *et al.*, 2022).

A espécie *L. brasiliensis* foi a segunda espécie mais frequente (12%) isolada em áreas de plantações de coco e estava causando podridão na base da folha, resinose no estipe e queima das folhas do coqueiro. Esta espécie foi descrita pela primeira vez no Brasil em 2014, causando podridão peduncular do mamão (Netto *et al.*, 2014). Além de *Cocos nucifera* e *Carica papaya* L., a espécie também foi relatada sendo agente causal de doenças causando podridão em fruta de *Artocarpus heterophyllus* Lam. (Souza *et al.*, 2024), podridão da coroa em *Musa acuminata* (Santos *et al.*, 2023), podridão radicular em *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai (Alves *et al.*, 2023), podridão em raízes de *Manihot esculenta* Crantz. (Brito *et al.*, 2020), morte peduncular da *Vitis* spp. (Correia *et al.* 2016), causando doenças em frutíferas (Coutinho *et al.*, 2016), gomose em *Anacardium occidentale* L. (Netto *et al.*, 2016), entre outros.

L. pseudotheobromae foi uma das espécies menos frequentes (2%) no estudo, sendo obtido apenas um isolado que estava causando podridão peduncular no coco. *L. pseudotheobromae* foi relatado a primeira vez por Alves *et al.*, (2008) em *Gmelina arborea*, na Costa Rica. E desde então esta espécie vem sendo relatada em outras culturas causando diferentes sintomas, como a podridão em cladódio de *Hylocereus* sp. (Mello *et al.*, 2022), morte do *Coffea arabica* L. (Freitas-Lopes, Machado; Lopes, 2020), em frutíferas, incluindo *A. occidentale* (Coutinho *et al.* 2016; Netto *et al.*, 2017) e podridão peduncular da *Mangifera indica* L. (Marques *et al.* 2013). Os seus conídios diferem de *L. theobromae sensu stricto* por serem maiores, mais elipsóides e não afilando tão fortemente em direção à base (Alves *et al.*, 2008).

Assim como *L. pseudotheobromae*, a espécie *L. hormozganensis* foi encontrada em apenas um isolado dentre os isolados coletados nesta pesquisa e também estava causando podridão peduncular no coco. A espécie foi originalmente descrita no Irã, a partir de isolados obtidos de *Olea oleraceae* e *Mangifera indica* (Abdollahzadeh *et al.*, 2010). *L. hormozganensis* tem sido associada a doenças em culturas economicamente importantes no Brasil. Esta espécie foi relatada causando mancha foliar em *Aloe vera* (Netto *et al.*, 2024), podridão da coroa em banana (França *et al.*, 2024), podridão em raízes de batata-doce e mandioca (Brito *et al.*, 2020; Mello *et al.*, 2021), podridão do caule em mamona (Custódio *et al.*, 2018), morte peduncular da videira (Correia *et al.*, 2016) e podridão peduncular da manga (Marques *et al.*, 2013).

Em todo o mundo, diversas espécies foram descritas dentro do complexo *L. theobromae sensu lato*, principalmente devido ao incremento do uso de dados moleculares (Phillips *et al.*, 2013). Quando a identificação das espécies era baseada apenas em caracteres morfológicos e culturais era conhecido apenas a *L. theobromae sensu lato* como espécie do gênero *Lasiodiplodia*. Quando se iniciaram os estudos filogenéticos dentro do gênero em 2004, constatou-se que havia espécies crípticas e desde então a filogenia tem desempenhado papel significativo na distinção das espécies. Em 2004, os estudos começaram utilizando a região do espaçador interno transcrito (ITS) do rDNA (Pavlic *et al.*, 2004). Quatro anos depois, um estudo foi conduzido com uma coleção de isolados inicialmente identificados como *L. theobromae sensu lato*, utilizando tanto a região ITS quanto o gene do fator de alongação 1- α (*TEF1*) (Alves *et al.*, 2008).

Atualmente, além de ITS e *TEF1* estão sendo incorporados os genes *TUB2* e *RPB2* nas análises filogenéticas para aumentar a resolução na separação das espécies de *Lasiodiplodia* (Wang *et al.*, 2013; Coutinho *et al.*, 2016; Cruywagen *et al.*, 2017; Batista-Cruz *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019; Huda-Shakirah *et al.*, 2022; França *et al.*, 2024; Netto *et al.*, 2024). Nesta pesquisa, baseada em quatro regiões (ITS, *TEF1*, *TUB2* e *RPB2*), a espécie *L. theobromae sensu stricto* mostrou ser um grupo muito próximo de *L. brasiliensis*. Este mesmo comportamento filogenético foi observado em outras pesquisas envolvendo o gênero *Lasiodiplodia* (Abdollahzadeh *et al.*, 2010; Netto *et al.*, 2014; Batista-Cruz *et al.*, 2019; Brito *et al.*, 2020; Douanla-Meli; Scharnhorst, 2021; Huda-Shakirah *et al.*, 2022; Souza *et al.*, 2024).

Cruywagen *et al.* (2017) em suas análises filogenéticas com cinco loci individuais (ITS, *TEF1*, *TUB2*, *RPB2* e *CMDA*) afirmam que *L. brasiliensis* é um híbrido e pode ter surgido pelo cruzamento entre *L. theobromae* e outra espécie atualmente desconhecida. A tendência aparentemente disseminada de hibridização entre espécies de *Lasiodiplodia* exige que

filogenias de múltiplos loci (preferencialmente quatro ou mais, e não apenas dois) sejam comparadas para verificar congruência antes da descrição de novas espécies. Isso ajudará a evitar que híbridos sejam erroneamente identificados como novos táxons, como ocorreu no passado.

L. hormozganensis formou um grupo irmão de *L. laeliocattleyae* assim como visto por outros pesquisadores (Batista-Cruz *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2019; Brito *et al.*, 2020; Netto *et al.*, 2024; França *et al.*, 2024) e *L. pseudotheobromae* formou um grupo irmão com um clado composto por *Lasiodiplodia microconidia* Y. Zhang *et al.* & S. Lin, *Lasiodiplodia lignicola* (Ariyaw., Jian K. Liu & K.D. Hyde) A.J.L. Phillips, A. Alves & Abdollahz. e *Lasiodiplodia tropica* Y. Zhang *et al.* & S. Lin., da mesma forma que foi observado em outras pesquisas com *Lasiodiplodia* (Douanla-Meli; Scharnhorst, 2021; Zhang *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021; Coelho *et al.*, 2022).

Através da rede de haplótipos dos isolados utilizando os dados combinados das quatro regiões (ITS, *TEF1*, *TUB2* e *RPB2*) é possível verificar que existem 20 haplótipos distribuídos nos cinco estados de coleta. Os haplótipos H1 ao H5 pertencem a espécie *L. brasiliensis* que estão mais próximo do haplótipo H7 que é pertencente a espécie *L. theobromae sensu stricto* apresentando apenas quatro passos mutacionais. *L. brasiliensis* e *L. theobromae sensu stricto* são espécies muito próximas filogeneticamente, o que pode ser confirmado pela árvore filogenética. Ainda com base na rede de haplótipos pode ser observado a grande distância dos haplótipos H19 e H20, pertencentes às espécies *L. hormozganensis* e *L. pseudotheobromae*, respectivamente, em relação aos outros haplótipos. O grande número de nucleotídeos diferentes entre essas duas espécies e *L. theobromae sensu stricto* pode ter contribuído para que os haplotipos H19 e H20 estivessem localizados distantes dos demais e apresentado vários passos mutacionais na rede de haplótipos. Esses dados são congruentes com os dados filogenéticos, onde observa-se que as espécies *L. hormozganensis* e *L. pseudotheobromae* encontram-se distantes filogeneticamente de *L. brasiliensis* e *L. theobromae sensu stricto*.

O haplótipo H14 com 14 isolados e H7 com 13 isolados foram os mais representativos entre os 20 haplótipos. O haplótipo H14 está presente em quatro dos cinco estados investigados e o haplótipo H7 está presente em quatro estados amostrados. Esse resultado pode indicar que está ocorrendo reprodução assexuada e dispersão do fungo entre os estados investigados, o que também foi observado em outras pesquisas (Mohali, Burgess, Wingfield, 2005; Marsberg *et al.*, 2017).

Esta pesquisa evidencia a variabilidade na agressividade tanto entre espécies quanto entre isolados de *Lasiodiplodia* spp. Os ensaios de patogenicidade demonstraram que todas as espécies e isolados testados foram patogênicos aos frutos de coco, com o rápido desenvolvimento de sintomas típicos de podridão peduncular, claramente visíveis sete dias após a inoculação. Dentre as espécies avaliadas, *L. pseudotheobromae* destacou-se como a mais agressiva, causando sintomas significativamente mais severos ($P \leq 0,01$) em comparação com os isolados de *L. theobromae sensu stricto*, *L. brasiliensis* e *L. hormozganensis*. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores que também apontam *L. pseudotheobromae* como altamente agressiva em diferentes hospedeiros, como em limão ‘Persa’ no México (Batista-Cruz *et al.*, 2019), mudas de manga no Egito (Ismail *et al.*, 2012), frutos de manga na Austrália (Sakalidis *et al.*, 2011) e árvores jovens de *Terminalia catappa* em Camarões (Begoude *et al.*, 2011). No entanto, esses achados contrastam com os resultados obtidos por Coelho *et al.* (2022) e Rosado *et al.* (2016), que identificaram *L. theobromae sensu stricto* como a espécie mais agressiva em frutos de coqueiro. A divergência entre os estudos pode ser atribuída a diferentes fatores, como a variabilidade genética dos isolados. Essa discrepância reforça a importância de estudos regionais e do uso de múltiplos isolados para avaliar o real potencial patogênico das espécies de *Lasiodiplodia* em diferentes contextos agrícolas.

A informação da patogenicidade do isolado de *L. hormozganensis* no coco se torna uma informação de relevância, pois esta espécie é aqui relatada pela primeira vez causando doença em coco.

Esta pesquisa evidencia que as doenças da queima das folhas no coqueiro e a podridão peduncular no coco no Nordeste do Brasil são causadas por quatro espécies do gênero *Lasiodiplodia*, sendo elas *L. brasiliensis*, *L. hormozganensis*, *L. pseudotheobromae* e *L. theobromae sensu stricto*. E dentre as espécies identificadas foram observados 20 haplótipos por meio da análise das regiões do DNA concatenadas utilizadas na análise filogenética. Todas as espécies de *Lasiodiplodia* encontradas têm potencial para causar doenças ao coqueiro, sendo *L. pseudotheobromae* a espécie mais agressiva e *L. theobromae sensu stricto* a espécie mais frequente entre os isolados. Este estudo é o primeiro a abordar *L. hormozganensis* como agente causal da doença podridão peduncular no coco com base em dados filogenéticos, morfológicos e patogênicos. E as informações geradas neste estudo sobre as espécies de *Lasiodiplodia* associadas à queima das folhas no coqueiro e a podridão peduncular do coco no Nordeste do Brasil poderão servir de subsídio para elaboração de estratégia de manejo mais eficiente na cultura do coco.

Referências

- ABDOLLAHZADEH, J. *et al.* Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. **Persoonia**, v. 25, p. 1-10, 2010.
- ALVES, C. P. S. S. *et al.*, First Report of *Lasiodiplodia brasiliensis* causing root rot on watermelon in Brazil. **Plant Disease**, v. 107, n.2, 2023.
- ALVES, A. *et al.* Morphological and molecular data reveal cryptic species in *Lasiodiplodia theobromae*. **Fungal Diversity**, v. 28, p. 1-13, 2008.
- ARAGÃO, W. M. *et al.* Fruto do coqueiro para consumo natural. In: ARAGÃO, W. M. (Ed.). **Coco pós-colheita**. Brasília: Embrapa – CTATC, 2002, cap. 3, p. 19-25
- ARNHOLD, E. Pacote no ambiente R para análise de variância e análises complementares. **Revista Brasileira de Pesquisa Veterinária e Zootecnia**, v. 50, n.6, p. 488-492, 2013.
- BANDELT, H.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 1, p. 37-48, 1999.
- BATISTA-CRUZ, M. A. *et al.* Phylogeny, distribution, and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with cankers and dieback symptoms of persian lime in Mexico. **Plant Disease**, v. 103, n. 6, 2019.
- BENASSI, A. C.; FANTON, C. J.; SANTANA, E. N. **O cultivo do coqueiro-anão-verde: tecnologias de produção**. Vitória, ES: Incaper, 2013. p. 120
- BONFIELD, J.K.; STADEN, R. Experiment files and their application during large-scale sequencing projects. **DNA Sequence**, v. 6, p. 109-117, 1996.
- BRITO, A. C. Q. *et al.* Diversity and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with black root rot and stem cutting dry rot in *Manihot esculenta* in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 157, p. 583-598, 2020.
- CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 42, n. 3, p. 225-226, 1939.
- COELHO, I. L. *et al.* *Lasiodiplodia* species diversity associated with coconut leaf blight and stem-end rot in Northeastern Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 162, p. 45-61, 2022.
- COUTINHO, I. B. L. *et al.* Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. **Plant Pathology**, v. 66, p. 90-104, 2017.
- CORREIA, K. C. *et al.* Phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of table grape in the main Brazilian exporting region. **Plant Pathology**, v. 65, p. 92-103, 2016.

COSTA, R. S. C *et al.* **Cultivo do coqueiro em Rondônia**. Ed. Téc. NASCENTE, A.S. EMBRAPA Rondônia. Versão Eletrônica: ISSN 1807-1805. Porto Velho, Rondônia, 2005.

CROUS, P. W. *et al.* Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Studies in Mycology**, v. 55, p. 235-253, 2006.

CRUYWAGEN, E. M. *et al.*, Phylogenetic species recognition and hybridisation in *Lasiodiplodia*: A case study on species from Baobabs. **Fungal Biology**, v. 121, p. 420-436, 2017.

CUSTÓDIO, F. L. *et al.* *Lasiodiplodia hormozganensis* causing basal stem rot on *Ricinus communis* in Brazil. **Australasian Plant Disease**, v. 13, n. 25, 2018.

DOUANLA-MELI, C.; SCHARNHORST, A. Palm foliage as pathways of pathogenic Botryosphaeriaceae fungi and host of new *Lasiodiplodia* species from Mexico. **Pathogens**, v. 10, n. 10, p. 1-16, 2021.

FAOSTAT. (2023). Estatísticas da Food and Agriculture Organization of the United Nations. **World Production**. Disponível em: Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 01 mai. 2025.

FERREIRA, M.E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed., Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p. 220

FRANÇA, K. R. S. *et al.* First report of *Lasiodiplodia hormozganensis* and *Lasiodiplodia laeliocattleyae* causing crown rot disease in banana fruits in Brazil. **Crop Protection**, 2024.

FREITAS-LOPES, R. L.; MCHADO, A. R.; LOPES, U. P. Coffee dieback caused by *Lasiodiplodia pseudotheobromae* in Brazil. **Plant Disease**, v. 104, n. 3, 2020.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, 61, 1323-30, 1995.

HUDA-SHAKIRAH, A. R. *et al.* *Lasiodiplodia theobromae* as a causal pathogen of leaf blight, stem canker, and pod rot of *Theobroma cacao* in Malaysia. **Scientific Reports**, v. 12, 2022.

IBGE. (2022). **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/>>. Acesso em: 01 mai. 2024.

ISMAIL, A. M. *et al.* *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica*) in Egypt. **Australasian Plant Pathology**, v. 41, p. 649-660, 2012.

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

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

LIMA, J. S. *et al.* Caracterização cultural, morfológica e patogênica de *Lasiodiplodia theobromae* associado a frutíferas tropicais. **Summa Phytopathologica**, v. 39, p. 81-88, 2013.

MACHADO, A. R.; PINHO, D. B.; PEREIRA, O. L. Phylogeny, identification and pathogenicity of the Botryosphaeriaceae associated with collar and root rot of the biofuel plant *Jatropha curcas* in Brazil, with a description of new species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Diversity**, v. 67, p. 231-247, 2014.

MARQUES, M. W. *et al.* Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, v. 61, p.181-193, 2013.

MARTINS, C. R.; JESUS JUNIOR, L. A. **Produção e comercialização de coco no Brasil frente ao comércio internacional: panorama 2014** / Carlos Roberto Martins – Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, p. 51 2014.

MARSBERG, A. *et al.* *Botryosphaeria dothidea*: a latent pathogen of global importance to woody plant health. **Molecular Plant Pathology**, v. 18, n. 4, p. 477-488, 2017.

MELLO, J. F. *et al.*, First report of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* causing cladode rot in *Hylocereus* sp. in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 104, p. 899, 2022.

MILLER, M.A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees. **In Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), New Orleans CA, USA**, p. 1-8, 2010.

MOHALI, S.; BURGESS, T. I.; WINGFIELD, M. J. Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. **Forest Pathology**, v. 35, p. 385-396, 2005.

MUSSI-DIAS, V.; FREIRE, M. G. M. Evaluation of postharvest stem-end rot on coconut fruits. **Journal of Agriculture and Environmental Sciences**, v.5, n. 2, p. 25-35, 2016.

NETTO, M. S. B. *et al.* *Lasiodiplodia hormozganensis* causing leaf blight on *Aloe vera* in Brazil. **Crop Protection**, v. 179, 2024.

NETTO, M. S. B. *et al.* Analysis of phylogeny, distribution, and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with gummosis of *Anacardium* in Brazil, with a new species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Biology**, v. 121, n. 4, p. 437-451, 2017.

NETTO, M. S. B. *et al.* Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. **Fungal Diversity**, v. 67, p. 127-141, 2014.

NYLANDER, J. A. A. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary. **Biology Centre**, 2004.

OLEKE, J. M. *et al.* Ex-ante economic analysis of biological control of coconut Mite in Benin. **AgBioForum**, v. 16, p. 161-169, 2013.

OLIVEIRA, M. C. *et al.* Mudras de tomateiro produzidas à base de pó de coco e esterco bovino curtido. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 9, n. 3, p. 87-95, 2019.

PHILLIPS, A. J. *et al.* Families in Botryosphaeriales: a phylogenetic, morphological and evolutionary perspective. **Fungal Diversity**, v. 94, p. 1-22, 2019.

PHILLIPS, A. J. L. *et al.* The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. **Studies in Mycology**, v. 76, p. 51-167, 2013.

PORNSURIYA C, *et al.* Morphological and phylogenetic evidences reveal *Lasiodiplodia chonburiensis* and *L. theobromae* associated with leaf blight in *Hevea brasiliensis* in Southern Thailand. **Diversity**, v. 15, 2023.

RAMBAUT, A. **FigTree, a graphical view of phylogenetic trees**. 1.4.2 ed. Edinburgh: The author, Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, 2014.

RAYNER, R. W. A mycological color chart. Commonwealth Mycological Institute. Kew. **Surrey and British Mycological Society**, 1970, p. 34

RODRÍGUEZ-GÁLVEZ, E.; MALDONADO, E.; ALVES, A. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* causing dieback of table grapes in Peru. **European Journal of Plant Pathology**, v. 141, p. 477-489, 2015.

RODRÍGUEZ-GÁLVEZ, E. *et al.* Phylogeny and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of mango in Peru. **Fungal Biology**, v. 121, p. 452-465, 2017.

RONQUIST, F. *et al.* MrBayes v. 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, p. 539-542, 2012.

ROSADO, A. W. C. *et al.* Phylogeny, identification, and pathogenicity of *Lasiodiplodia* associated with postharvest stem-end rot of coconut in Brazil. **Plant Disease**, v. 100, n. 3, p. 561-568, 2016.

SANTOS, J. E. A. *et al.* First Report of *Lasiodiplodia brasiliensis* causing crown rot on banana in Brazil. **Plant Disease**, v. 107, n. 8, 2023.

SANTOS, P. H. D. *et al.* Is *Lasiodiplodia theobromae* the only species that causes leaf blight disease in Brazilian coconut palms? **Tropical Plant Pathology**, v. 45, p. 434-442, 2020.

SANTOS, P. H. D. *et al.* Phylogeography and population structure analysis reveals diversity by mutations in *Lasiodiplodia theobromae* with distinct sources of selection. **Genetics and Molecular Research: GMR**, v. 16, n. 2, p. 1-14, 2017.

SAKALIDIS, M. L. *et al.* Pathogenic Botryosphaeriaceae associated with *Mangifera indica* in the Kimberley region of Western Australia. **European Journal of Plant Pathology**, v. 130, p. 379-391, 2011.

SILVA, N. I. *et al.* Phylogeny and morphology of *Lasiodiplodia* species associated with *Magnolia* forest plants. **Scientific Reports**, v. 9, 2019.

SLIPPERS, B. *et al.* Diversity in the Botryosphaerales: Looking back, looking forward. **Fungal Biology**, v. 121, n. 4, 2017.

SLIPPERS, B. *et al.* Phylogenetic lineages in the Botryosphaerales: a systematic and evolutionary framework. **Studies Mycology**, v. 76, p. 31-49, 2013.

SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: Diversity, ecology and impact. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p. 90-106. 2007.

SOUZA, J. F. F. *et al.* *Lasiodiplodia theobromae* and *Lasiodiplodia brasiliense* causing dieback and rot fruit of jackfruit tree in Brazil. **Crop Protection**, v. 184, p. 106763, 2024.

TAYLOR, J. W. *et al.* Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 31, p. 21-32, 2000.

VIANA, F. M. P. *et al.* **Tratamento do coco verde para exportação com ênfase no controle da podridão-basal-pós-colheita.** In: Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 29, Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. p. 30

VIANA, F. M. P. *et al.* Podridão-basal-pós-colheita de coco verde no Estado do Ceará. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 5, p. 545, 2002.

WANG, Y. *et al.* *Lasiodiplodia regiae* sp. nov.: A new species causing canker and dieback of fruit trees in China. **Phytopathology**, v. 113, p. 1210-1221, 2023.

WANG, Y. *et al.* Multigene Phylogenetics and morphology reveal five novel *Lasiodiplodia* species associated with blueberries. **Life**, v. 11, n. 7, 2021.

WANG, Y. *et al.* *Lasiodiplodia* spp. associated with *Aquilaria crassna* in Laos. **Mycological Progress**, v. 18, p. 683-701, 2019.

WHITE, T. J. *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. PCR Protocols: A guide to methods and applications. **Publisher: Academic Press**, p. 315-322. 1990.

ZHANG, E. *et al.* Evaluating species in *Botryosphaerales*. **Persoonia**, v. 46, p. 63-115, 2021.

ZHAO, L. *et al.* Stem blight of blueberry caused by *Lasiodiplodia vaccinii* sp. nov. in China. **Plant disease**, v. 103, n. 8, 2019.

4 CAPÍTULO II: ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE *Lasiodiplodia theobromae sensu stricto* ASSOCIADOS À QUEIMA DAS FOLHAS E PODRIDÃO PEDUNCULAR DO COCO NO NORDESTE DO BRASIL

Jamille Rabêlo de Oliveira¹, Eliane Mayumi Inokuti¹, Gustavo Freire Justino¹, Myrella Maria Tabosa de Almeida² Patricia do Nascimento Bordallo², Christiana de Fátima Bruce da Silva²,
Cristiano Souza Lima¹

¹ Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal do Ceará, 60440-554, Fortaleza, CE, Brasil;

² Embrapa Agroindústria Tropical, 60511-110, Fortaleza, Ceará, Brasil;

*Autor para correspondência: Cristiano Souza Lima (csl@ufc.br)

Resumo

O marcador molecular *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) tem sido amplamente utilizado para investigar a diversidade genética e estrutura populacional de patógenos de plantas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética e estrutura populacional de isolados de *Lasiodiplodia theobromae sensu stricto* associados à queima das folhas e podridão peduncular do coco no Nordeste do Brasil, com marcadores moleculares ISSR. Foi analisada a diversidade genética e a estrutura populacional de 42 isolados de *L. theobromae sensu stricto* utilizando 11 *primers* ISSR. De acordo com o valor do conteúdo de informações polimórficas (PIC), os *primers* UBC 884, UBC 811 e UBC 825 foram moderadamente polimórficos e os demais foram pouco polimórficos. Os isolados distribuíram-se em quatro populações, sendo a população 1 (CE), população 2 (RN), população 3 (MA) e população 4 (PE). A diversidade genética foi considerada baixa dentro das populações, com o número de diferentes alelos ($N_a = 1,313$), número de alelos efetivos ($N_e = 1,306$), índice de Shannon ($I = 0,255$), diversidade haplotípica ($h = 0,174$) e diversidade genética imparcial ($u_h = 0,212$). Dentre as populações, a população 1 (CE) foi a que mostrou diversidade genética mais alta, onde foi obtido o maior número de isolados ($n = 26$) e municípios de coleta ($n = 6$), logo pode ter influenciado na sua diversidade. Os menores valores de diversidade corresponderam a população 3 (MA) com três isolados. A variação genética total foi obtida 100% dentro das populações e as populações foram divididas em dois grupos genéticos e não mostraram estrutura populacional. De acordo com nosso conhecimento, esta é a primeira investigação sobre a diversidade genética e estrutura populacional de *L. theobromae sensu stricto* associada

à queima das folhas e podridão peduncular do coco no Nordeste brasileiro, utilizando marcadores ISSR.

Palavras-chave: coqueiro, variabilidade genética, marcador molecular

Abstract

The molecular marker Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) has been widely used to investigate the genetic diversity and population structure of plant pathogens. The objective of this work was to evaluate the genetic diversity and population structure of isolates of *L. theobromae sensu stricto* associated with leaf blight and coconut stem-end rot in Northeast Brazil, with ISSR molecular markers. The genetic diversity and population structure of 42 isolates of *L. theobromae sensu stricto* were demonstrated using 11 ISSR primers. According to the polymorphic information content (PIC) value, the primers UBC 884, UBC 811 and UBC 825 were moderately polymorphic and the others were slightly polymorphic. The isolates were distributed in four populations, being population 1 (CE), population 2 (RN), population 3 (MA) and population 4 (PE). Genetic diversity was considered low within populations, with the number of different alleles ($N_a = 1.313$), number of effective alleles ($N_e = 1.306$), Shannon index ($I = 0.255$), haplotypic diversity ($h = 0.174$) and diversity unbiased genetics ($u_h = 0.212$). Among the populations, population 1 (CE) was the one that showed the highest genetic diversity, where the largest number of isolates ($n = 26$) and collection municipalities ($n = 6$) were obtained, so this may have influenced its diversity. The lowest diversity values corresponded to population 3 (MA) with three isolates. The total genetic variation was obtained 100% within the populations and the populations were divided into two genetic groups and showed no population structure. To the best of our knowledge, this is the first investigation into the genetic diversity and population structure of *L. theobromae sensu stricto* associated with leaf blight and coconut stem-end rot in Northeast Brazil, using ISSR markers.

Keywords: coconut tree, genetic variability, molecular marker.

4.1 Introdução

Lasiodiplodia theobromae sensu stricto (Pat.) Griffon & Maubl. é membro da família Botryosphaeriaceae (Ordem Botryosphaeriales, Classe Dothideomycetes, Filo Ascomycota e Reino Fungi) (Abdollahzadeh *et al.*, 2010; Phillips *et al.*, 2019) que tem

distribuição cosmopolita, embora seja mais comum em regiões tropicais e subtropicais e possui ampla gama de espécies hospedeiras (Alves *et al.*, 2008).

Este fungo pode causar inúmeras doenças em culturas de importância econômica, a exemplo da banana (*Musa* spp.), cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), coqueiro (*Cocos nucifera* L.), gravioleira (*Annona muricata* L.), mangueira (*Mangifera indica* L.), mamoeiro (*Carica papaya* L.), pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), videira (*Vitis vinifera* L.), entre outras (Lima *et al.*, 2013; Marques *et al.*, 2013; Machado; Pinho; Pereira, 2014; Netto *et al.*, 2014; Correia *et al.*, 2016; Coutinho *et al.*, 2017; Netto *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2020).

A cocoicultura apresenta elevada importância econômica por gerar emprego e renda. De acordo com a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), em 2023, os principais produtores de coco no mundo foram Indonésia, Filipinas, Índia e Brasil, nessa ordem. No Brasil, em 2023, a área cultivada com coqueiros é de 186.712 h., produzindo um total de 1.932.282 t. (IBGE, 2025). O Nordeste se destaca como a principal região produtora do país, com uma produção de 1.545.435 t. de coco em 2023. Isso representa 82,7% da área colhida e 80% da produção nacional total (IBGE, 2025). Os estados que mais se destacaram na produção foram o Ceará, com 519.037 t.; a Bahia, com 387.404 t.; e Pernambuco, com 245.832 t. de frutos (IBGE, 2025).

A produção de coco enfrenta diversas limitações e a ocorrência de doenças exerce um impacto significativo, resultando em uma redução considerável tanto na produção quanto na qualidade dos produtos (Brito *et al.*, 2002; Rosado *et al.*, 2016). O fungo *L. theobromae sensu stricto* foi relatado sendo agente causal de doenças de grande relevância no coqueiro, como a queima das folhas e podridão peduncular do coco em diferentes regiões do Brasil ocasionando sérios prejuízos (Viana *et al.*, 2007; Benassi; Fanton; Santana, 2013; Rosado *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2020; Coelho *et al.*, 2022).

A queima das folhas ocorre principalmente nas folhas mais velhas, onde é possível observar a lesão em forma de “V”, de coloração marrom-avermelhada observada nas extremidades das folhas que progride em direção a raque, que seca e cai (Warwick; Talamini, 2009; Talamini; Ferreira; Ramos, 2013; Moura *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2020). Já a podridão peduncular é a principal doença pós-colheita do coco no Brasil, gerando impactos negativos na produção e comercialização dos frutos devido à depreciação e apodrecimento dos mesmos (Viana *et al.*, 2007; Benassi; Fanton; Santana, 2013). O sintoma inicia abaixo das brácteas e se estende por todo o fruto, causando a podridão dos tecidos, consequentemente inviabilizando a sua comercialização (Viana *et al.*, 2002; Mussi-Dias; Freire, 2016; Rosado *et al.*, 2016).

O estudo da diversidade genética da população de patógeno gera informação sobre o nível e distribuição da variabilidade genética dos isolados existentes em uma população ou região e permite identificar populações com maior ou menor diversidade e, por consequência, as chances de sobrevivência e ou extinção (Cruz; Ferreira; Pessoni, 2020). Representa um importante elemento para os programas de melhoramento genético de plantas que visam resistência às doenças. Populações de fungos com alto nível de diversidade genética são difíceis de controlar, uma vez que podem adaptar-se mais rapidamente a qualquer medida de controle, seja química ou através da introdução de hospedeiro resistente (Carlier *et al.*, 2003). O estudo da estrutura populacional pode estimar o fluxo gênico e a dispersão de uma espécie, além de fornecer dados sobre a diferenciação genética de populações ao longo da distribuição geográfica do organismo (Zolet *et al.*, 2017). E para estes estudos, marcadores moleculares estão sendo utilizados.

Os marcadores moleculares em geral têm se mostrado eficazes nos estudos de diversidade genética em populações por detectar o polimorfismo diretamente no DNA. Neste aspecto, os marcadores do tipo *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) tem sido amplamente utilizados para investigar a diversidade genética e estrutura populacional de patógenos de plantas (Fan *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2016; Elena *et al.*, 2015; Longya; Talumphai; Jantasuriyarat, 2020; Bhat *et al.*, 2023). Este marcador se baseia na amplificação de regiões entre sequências microssatélites do DNA via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Marcadores do tipo ISSR consistem em sequências repetidas que são abundantes e dispersas em todo genoma, apresentam alta reprodutibilidade e são altamente polimórficos. Por não necessitar do conhecimento prévio da sequência de DNA da espécie alvo do estudo é um marcador molecular considerado universal (Zietkiewicz; Rafalski; Labuda, 1994; Reddy *et al.*, 2002; Borba *et al.*, 2005; Domingues *et al.*, 2017).

Diante de toda a importância da cultura e do problema enfrentado por ela devido ao fungo *L. theobromae sensu stricto* e ainda não haver estudo da diversidade genética e estrutura populacional de isolados deste patógeno provenientes de áreas produtora da região Nordeste, os objetivos desta pesquisa foram avaliar a diversidade genética e a estrutura populacional do fungo *L. theobromae sensu stricto* associados aos coqueiros provenientes de quatro estados produtores de coco no Nordeste brasileiro, por meio de marcadores moleculares ISSR.

4.2 Material e métodos

Neste estudo foram utilizados 42 isolados de *L. theobromae sensu stricto* caracterizados morfomolecularmente em Oliveira *et al.* (2025). Os isolados utilizados neste estudo estão listados na tabela 1.

Tabela 1 - Isolados utilizados no estudo, com indicação do código, dos sintomas apresentados e local de coleta

| Continua | | |
|----------------|---------------------------|------------------------|
| Isolado | Sintoma | Local de Coleta |
| JRO 02 | Podridão Peduncular | Fortaleza - CE |
| JRO 09 | Podridão Peduncular | Acaraú - CE |
| JRO 14 | Podridão Peduncular | Acaraú - CE |
| JRO 16 | Podridão Peduncular | Caucaia - CE |
| JRO 18 | Resinose | Acaraú - CE |
| JRO 23 | Fruto sadio | Acaraú - CE |
| JRO 26 | Queima das Folhas | Acaraú - CE |
| JRO 31 | Queima das Folhas | Acaraú - CE |
| JRO 32 | Queima das Folhas | Acaraú - CE |
| JRO 34 | Fruto sadio | Acaraú - CE |
| JRO 35 | Podridão Peduncular | Caucaia - CE |
| JRO 47 | Queima das Folhas | Trairí - CE |
| JRO 53 | Podridão Peduncular | Trairí - CE |
| JRO 55 | Podridão Peduncular | Paraipaba - CE |
| JRO 63 | Fruto sadio | Trairí - CE |
| JRO 77 | Podridão Peduncular | Paraipaba - CE |
| JRO 80 | Podridão na Base da Folha | Petrolina - PE |
| JRO 91 | Queima das Folhas | Paraipaba - CE |
| JRO 99 | Fruto sadio | Paraipaba - CE |
| JRO 101 | Queima das Folhas | Paraipaba - CE |
| JRO 104 | Queima das Folhas | Paraipaba - CE |
| JRO 112 | Fruto sadio | Fortaleza - CE |
| JRO 113 | Fruto sadio | Paraipaba - CE |
| JRO 124 | Queima das Folhas | Paraipaba - CE |
| JRO 127 | Queima das Folhas | Petrolina - PE |
| JRO 128 | Queima das Folhas | Petrolina - PE |
| JRO 133 | Podridão Peduncular | Itapipoca - CE |
| JRO 137 | Queima das Folhas | Paraipaba - CE |
| JRO 139 | Podridão na Base da Folha | Alto do Rodrigues - RN |
| JRO 141 | Podridão na Base da Folha | Alto do Rodrigues - RN |
| JRO 142 | Podridão na Base da Folha | Alto do Rodrigues - RN |
| JRO 145 | Podridão Peduncular | Alto do Rodrigues - RN |

Tabela 1 - Isolados utilizados no estudo, com indicação do código, dos sintomas apresentados e local de coleta

| Isolado | Sintoma | Local de Coleta | Conclusão |
|---------|---------------------------|------------------------|-----------|
| JRO 155 | Fruto sadio | Alto do Rodrigues - RN | |
| JRO 157 | Queima das Folhas | Alto do Rodrigues - RN | |
| JRO 167 | Podridão Peduncular | Alto do Rodrigues - RN | |
| JRO 181 | Queima das Folhas | Alto do Rodrigues - RN | |
| JRO 183 | Queima das Folhas | Alto do Rodrigues - RN | |
| JRO 189 | Fruto sadio | Itapipoca - CE | |
| JRO 194 | Podridão na Base da Folha | Petrolina - PE | |
| JRO 202 | Queima das Folhas | Balsas - MA | |
| JRO 203 | Queima das Folhas | Balsas - MA | |
| JRO 204 | Queima das Folhas | Balsas - MA | |

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.1 Análise da diversidade genética e estrutura populacional de L. theobromae sensu stricto por meio de marcadores ISSR

Um total de 20 *primers* de ISSR (UBC 807, UBC 810, UBC 811, UBC 818, UBC 825, UBC 834, UBC 840, UBC 841, UBC 849, UBC 858, UBC 868, UBC 878, UBC 880, UBC 881, UBC 884, UBC 885, UBC 888, UBC 890, (GA) 9T e (GA) 9C) foram testados em três isolados (JRO 02, JRO 26 e JRO 127) previamente nesta pesquisa para selecionar os mais polimórficos para *L. theobromae sensu stricto*. Destes, 11 *primers* (Tabela 2) mais polimórficos foram selecionados para realizar a análise da diversidade genética e estrutura populacional, no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, Ceará.

As reações em cadeia da polimerase (PCR) dos *primers* ISSR foram realizadas em um volume total de 20 µL, composta por 1X do tampão da reação, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,4 µM de iniciador ISSR, 1U Taq DNA Polimerase e 30 ng de DNA e água ultra pura para completar o volume final. A PCR foi realizada no termociclador Veriti (Applied Biosystems) e o ciclo consistiu de desnaturação inicial à 95 °C por 5 minutos, 40 ciclos compostos por desnaturação à 95 °C por 30 segundos, temperatura de anelamento variando entre 42 a 50 °C por 45 segundos entre os *primers* (Tabela 1), extensão à 72 °C por 2 minutos e a extensão final à 72 °C por 15 minutos.

Os produtos da PCR foram visualizados por separação em gel de agarose a 1,5%, preparado em solução tampão tris-borato-EDTA 1X (0,89 M de Tris, 0,89 M de ácido bórico e 0,02 M de EDTA) corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL). O marcador de DNA de 1 Kb

Plus (Invitrogen) foi utilizado como padrão de comparação das bandas geradas e realizado à eletroforese a 100V por 150 minutos, visualizados sob luz UV e fotografados em fotodocumentador (Loccus Biotecnologia).

4.2.2 *Análise dos dados de ISSR*

O padrão de bandas de cada *primer* foi pontuado como 1 (banda presente) e 0 (banda ausente) e o padrão foi convertido em uma matriz binária. A matriz de dados binários foi usada para realizar todas as análises.

O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) foi calculado para quantificar o polimorfismo genético do loco, aplicando-se a fórmula $PIC = 1 - [f^2 + (1-f)^2]$, conforme Riek *et al.*, (2001).

O conjunto de dados de ISSR foi analisado para os índices de diversidade genética, como N: tamanho da amostra; Na: número de diferentes alelos; Ne: número efetivo de alelos; I: índice de Shannon; h: diversidade; uh: diversidade genética imparcial; PLP: porcentagem de loci polimórficos usando o software de genética populacional GenALEx v. 6.5 (Peakall; Smouse, 2012).

A análise da coordenada principal (PCoA) foi conduzida empregando o software GenALEx v. 6.5 para estimar a representação espacial das distâncias genéticas relativas entre as populações e foi baseada na matriz de distância genética da população (Peakall; Smouse, 2012).

A distribuição da variação genética dentro das populações e entre as populações, foi calculada realizando a análise de variância molecular (AMOVA) no GenALEx v. 6.5 (Peakall; Smouse, 2012).

A estrutura populacional de *L. theobromae sensu stricto* foi inferida pelo software Structure baseado na estatística Bayesiana utilizado para inferir o número de grupos geneticamente diferenciados (k) entre os isolados (Pritchard; Stephens; Donnelly, 2000; Falush; Stephens; Pritchard, 2003, 2007;). As análises foram realizadas utilizando 20 corridas para cada valor de número de agrupamento K (K de 1 a 10). Em cada simulação, foram consideradas 100.000 interações pelo método de Monte Carlo via Cadeia de Markov (MCMC) com descarte inicial (*burn in*) de 20.000. Para a definição do número de K mais provável empregou-se a média e o desvio padrão de cada valor de probabilidade de K e o método ΔK proposto por Evanno *et al.* (2005), a partir do software Structure Harvester (Earl; Von Holdt, 2012). O

CLUMPAK (Kopelman *et al.*, 2015) foi utilizado para inspeções detalhadas sobre a convergência entre corridas independentes para cada K e interpretações gráficas dos resultados.

4.3 Resultados

4.3.1 Diversidade genética

Os 11 *primers* ISSR amplificaram um total de 134 bandas, das quais 97 bandas eram polimórficas (72,39%) na avaliação de diversidade genética de *L. theobromae sensu stricto*. A quantidade de bandas por *primer* variou entre 9 e 18, apresentando, em média, 12,18 por *primer* e os pesos moleculares dos diferentes locos variaram entre 250 e 3500 pares de bases (pb). Os valores do conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) variaram de 0,07 (UBC 888) à 0,33 (UBC 825) com média de 0,21 (Tabela 2).

Tabela 2 - *Primers* ISSR utilizados e respectivas sequências de bases, temperatura de anelamento (Ta), número de bandas (NB), número de bandas polimórficas (NBP), conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) e pares de bases (pb) mínimo e máximo dos isolados obtidos de *L. theobromae sensu stricto*

| <i>Primers</i> ISSR | Sequências nucleotídicas 5' > 3' | Ta (°C) | NB | NBP | PIC | pb (min-max) | Referência |
|------------------------|----------------------------------|---------|----|-----|------|--------------|-------------------------------|
| UBC 810 | GAGAGAGAGAGAGAGAT | 42 | 10 | 7 | 0.18 | 400 - 1650 | Xie <i>et al.</i> , 2016 |
| UBC 811 | GAGAGAGAGAGAGAGAC | 50 | 11 | 8 | 0.26 | 300 - 1500 | Bayraktar; Dolar, 2011 |
| UBC 818 | CACACACACACACAG | 45 | 18 | 10 | 0.22 | 350 - 3000 | Xie <i>et al.</i> , 2016 |
| UBC 825 | ACACACACACACACT | 50 | 12 | 11 | 0.33 | 400 - 2500 | Bayraktar; Dolar, 2011 |
| UBC 840 | AGAGAGAGAGAGAGAGT | 42 | 11 | 10 | 0.23 | 350 - 2000 | Xie <i>et al.</i> , 2016 |
| UBC 880 | GAGAGAGAGAGAGAGAC | 42 | 9 | 5 | 0.13 | 300 - 2500 | Xie <i>et al.</i> , 2016 |
| UBC 884 | ACACACACACACACT | 42 | 14 | 13 | 0.25 | 300 - 2500 | Xie <i>et al.</i> , 2016 |
| UBC 885 | GAGAGAGAGAGAGAGAT | 42 | 14 | 9 | 0.17 | 250 - 2500 | Xie <i>et al.</i> , 2016 |
| UBC 888 | GAGAGAGAGAGAGAGAC | 48 | 12 | 6 | 0.07 | 350 - 3000 | Xie <i>et al.</i> , 2016 |
| UBC 890 | GTGTGTGTGTGTGTVHV | 45 | 13 | 11 | 0.24 | 300 - 3500 | Xie <i>et al.</i> , 2016 |
| (GA) ₉ T | GAGAGAGAGAGAGAGAT | 45 | 10 | 7 | 0.23 | 450 - 1650 | AKBAR <i>et al.</i> , 2018 |

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: H = (A,C,T); V = (A,C,G).

Os 42 isolados de *L. theobromae sensu stricto* analisados neste estudo foram agrupados em quatro populações. A população 1 corresponde ao estado do Ceará, a população 2 ao estado do Rio Grande do Norte, a população 3 ao Maranhão e a população 4 ao estado de Pernambuco (Tabela 3).

No nível populacional, o número de diferentes alelos (N_a) variou entre 1,069 à 1,576, com média de 1,313, enquanto que o número de alelos efetivos (N_e) variou de 1,233 à 1,361 e média de 1,306. O índice de Shannon (I), variou entre 0,186 à 0,318, com média de 0,255, a diversidade (h) apresentou valores de 0,130 à 0,211 e seu valor médio entre as populações foi de 0,174. A diversidade genética imparcial (u_h), variou de 0,194 à 0,219, com média nas populações 0,212. A porcentagem de loci polimórficos para cada população variou de 29,17% na população 3 a 64,58% na população 1, com percentual médio de 45,31% (Tabela 3). A população 1 (CE) e população 3 (MA) tiveram o maior e menor índices de diversidade genética, respectivamente.

Tabela 3 - Análise da diversidade genética de *L. theobromae sensu stricto* com 11 primers ISSR em cada população

| População | N | N_a | N_e | I | h | u_h | P % |
|------------------|----|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| População 1 (CE) | 26 | 1,576 | 1,361 | 0,318 | 0,211 | 0.219 | 64.58% |
| População 2 (RN) | 9 | 1,361 | 1,330 | 0,273 | 0,186 | 0.209 | 47.22% |
| População 3 (MA) | 3 | 1,069 | 1,233 | 0,186 | 0,130 | 0.194 | 29.17% |
| População 4 (PE) | 4 | 1,243 | 1,300 | 0,246 | 0,169 | 0.226 | 40.28% |
| Média | | 1,313 | 1,306 | 0,255 | 0,174 | 0.212 | 45.31% |

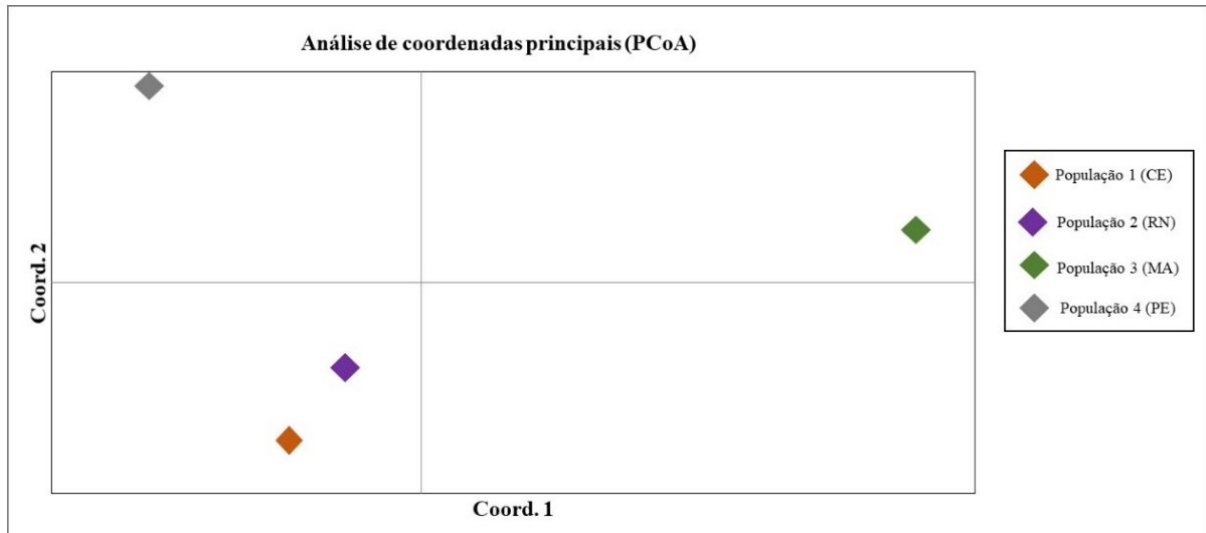
Fonte: Elaborada pela autora.

N = número de indivíduos, N_a = números de diferentes alelos, N_e = alelos efetivos, I = índice de Shannon, h = diversidade, u_h = diversidade genética imparcial, P = porcentagem de loci polimórfico.

A análise de variância molecular (AMOVA) indicou que 100% da variação genética total entre os isolados ocorreu apenas dentro das populações.

A análise de coordenadas principais (PCoA) foi realizada para estimar a representação espacial das distâncias genéticas relativas entre as populações e foi baseada na matriz de distância genética da população. O gráfico da PCoA mostra que as populações estão divididas em três grupos. O grupo 1 consistia na população 1 (CE) e população 2 (RN), o grupo 2 consistia na população 3 (MA) e o grupo 3 consistia na população 4 (PE) (Figura 1).

Figura 1 - Gráfico de análise de coordenadas principais (PCoA) mostrando o agrupamento do 42 isolados de *L. theobromae sensu stricto* baseados em 11 *primers* ISSR. As quatro populações são codificadas por cores da seguinte forma: população 1 (CE) (marrom), população 2 (RN) (roxo), população 3 (MA) (verde) e população 4 (cinza). Porcentagem de variação explicada pelos 3 primeiros eixos (1, 2 e 3) são 60,76%, 25,46% e 13,79%, respectivamente.

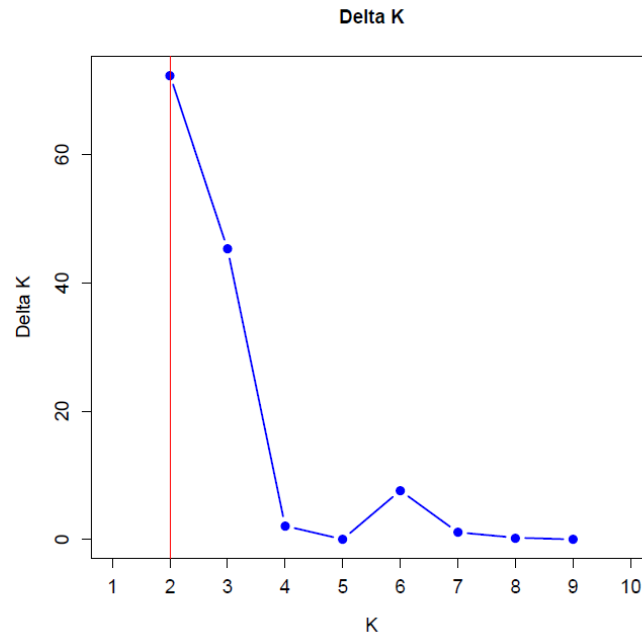


Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.2 Estrutura populacional

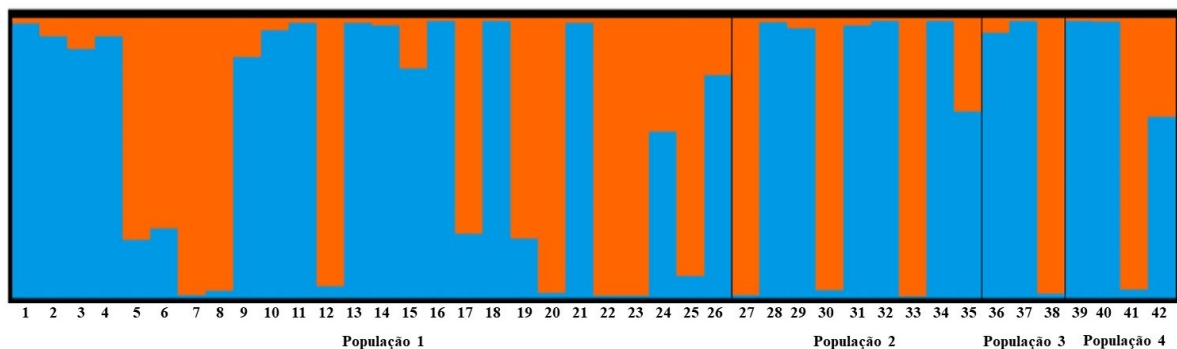
A análise da estrutura populacional dos isolados de *L. theobromae sensu stricto*, utilizando a estatística Bayesiana obtidos pelo Structure, indica que as populações foram agrupadas em dois grupos (K=2) e o valor da similaridade do K=2 foi de 0.992, segundo a metodologia de Evanno *et al.* (2005) (Figura 2). A representação gráfica indica a divisão dos indivíduos de *L. theobromae sensu stricto* da população 1 (1 a 26), população 2 (27 a 35), população 3 (36 a 38) e população 4 (39 a 42) em dois grupos genéticos identificados pelas cores laranja e azul na figura 3.

Figura 2 - Valores de ΔK para cada valor de K das populações de *L. theobromae sensu stricto*, conforme Evanno *et al.* (2005).



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 3 - Representação dos 42 indivíduos de *L. theobromae sensu stricto* utilizando o programa Structure. Os indivíduos de 1 a 26 (isolados de CE), 27 a 35 (isolados do Rio Grande do Norte), 36 a 38 (isolados do Maranhão) e 39 a 42 (isolados de Pernambuco), estão representados por barras verticais. O grupo 1 (cor azul), grupo 2 (cor laranja)



Fonte: Elaborada pela autora.

4.4 Discussão

Os marcadores ISSR tornaram-se uma ferramenta útil para avaliar a diversidade genética de muitas espécies de fungos, pois possuem alta resolução, revelam o polimorfismo, não precisam de conhecimento prévio da sequência, possuem baixo custo e possuem reprodutibilidade (Xie *et al.*, 2016; Xie *et al.*, 2019; Leala; El -Shahawy; Tolba, 2021; Xu *et*

al., 2024). Neste trabalho, marcadores ISSR foram usados para avaliar a diversidade genética e estrutura populacional de populações de *L. theobromae sensu stricto* em áreas produtoras de coco no Nordeste brasileiro.

Os valores do conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) variaram de 0,07 à 0,33, com média de 0,21. Segundo a classificação de PIC proposta por Botstein *et al.* (1980), valores do PIC > 0,5 são *primers* altamente informativos, de 0,25 < PIC < 0,5 são considerados moderadamente informativos e valores de PIC < 0,25 são considerados pouco informativos. Três *primers* utilizados nesta pesquisa (UBC 884, UBC 811 e UBC 825) mostraram um nível moderado de polimorfismo e os *primers* UBC 810, UBC 818, UBC 840, UBC 880, UBC 885, UBC 888, UBC 890, (GA)9T foram pouco informativos. Desta forma, o polimorfismo detectado pelos marcadores ISSR utilizados neste estudo estavam na faixa de pouco informativo a moderadamente informativo. O valor de PIC auxilia na classificação dos *primers* conforme a eficiência na detecção do polimorfismo, servindo de parâmetro para a seleção dos *primers*. Assim, no presente estudo, pode-se considerar que os *primers* (UBC 884, UBC 811 e UBC 825) são moderadamente eficientes para identificar polimorfismo entre os indivíduos de *L. theobromae sensu stricto*.

Os marcadores moleculares utilizados neste foram previamente empregados por Xie *et al.* (2016) em análises de diversidade genética de isolados de *L. theobromae* associados às culturas de *Morus alba* e *Agave sisalana*, na China. Os autores observaram altos níveis de polimorfismo genético: os *primers* ISSR produziram 135 bandas, com 93,96% de loci polimórficos. Esses resultados destacam a eficácia desses marcadores na detecção de variabilidade genética, justificando sua escolha no presente estudo para avaliar a diversidade de isolados fúngicos associados ao coqueiro.

A diversidade genética foi considerada baixa dentro das populações de *L. theobromae sensu stricto*, com base no número de diferentes alelos ($N_a = 1,313$), número de alelos efetivos ($N_e = 1,306$), índice de Shannon ($I = 0,255$), diversidade haplotípica ($h = 0,174$), diversidade genética imparcial ($uh = 0,212$). A porcentagem de loci polimórfico variou de 29,17% a 64,58% para a população 3 e 1, respectivamente. A baixa diversidade genética entre os isolados pode ser indicativa de reprodução assexuada e dispersão de propágulos vegetativos a curtas distâncias. Segundo Phillips (2002), o modo reprodutivo das espécies da família Botryosphaeryaceae é predominantemente assexuado em campo. Resultado semelhante foi observado no estudo com populações de *L. theobromae sensu stricto* em *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, *Eucalipto urophylla* e *Acacia mangium* na Venezuela, no qual as populações indicavam reprodução clonal e fluxo gênico frequente (Mohali; Burgess; Wingfield, 2005).

Embora as populações de *L. theobromae sensu stricto* tenham apresentado baixa diversidade genética, a população 1 (CE) foi a que mostrou diversidade genética mais alta em comparação às demais populações, onde foi obtido o maior número de isolados ($n = 26$) e municípios de coleta ($n = 6$), logo isto pode ter influenciado na sua diversidade.

De acordo com a análise de variância molecular (AMOVA), 100% da diversidade genética foi observada dentro das populações. A diversidade encontrada dentro das populações pode ser atribuída ao fluxo gênico populacional (Mohali; Burgess; Wingfield, 2005). O comércio de mudas de coqueiro é prática comum entre os agricultores da região Nordeste, este fato pode ocasionar movimento frequente do inóculo do patógeno entre as localizações geográficas e conseqüentemente estar gerando diversidade apenas dentro das populações.

Por meio do gráfico construído pelo software Structure para investigar a estrutura populacional de *L. theobromae sensu stricto* é possível observar que a distribuição dos isolados em diferentes grupos era independente de sua origem geográfica, portanto ambos os grupos continham isolados de todas as quatro populações geográficas e, dessa forma, indica que as populações não estão estruturadas geneticamente. Isso significa que os indivíduos dentro dessa população não apresentam variações genéticas significativas que possam ser agrupadas em subpopulações distintas.

Esse aspecto aponta que está havendo entre as quatro populações (Ceará, Rio Grande do Norte, Maranhão e Pernambuco) um intenso intercâmbio de material genético por meio da migração, que é o movimento de indivíduos entre populações. A semelhança de alelos em populações separadas geograficamente evidencia a presença de fluxo gênico entre as populações. Este é um mecanismo que permite a troca de indivíduos separados geograficamente, podendo ser causado de forma aleatória na população ou induzida através de atividades antrópicas, como o movimento e troca de propágulos e outros materiais de plantios infectados e a ocorrência de hospedeiros alternativos. Outra hipótese para as populações não serem estruturadas é não possuírem barreiras geográficas e estarem próximas geograficamente. Outras pesquisas também verificaram que isolados de Botryosphaeriaceae em videiras e macieiras também não apresentavam estrutura genética, usando marcadores ISSR em suas análises (Elena *et al.* 2015; Bhat *et al.*, 2023).

Compreender a diversidade genética e estrutura populacional são importantes porque irão auxiliar na compreensão da dinâmica populacional de patógenos, identificar populações com maior diversidade e, por conseqüência, as chances de sobrevivência e/ou extinção ou monitorar a sensibilidade de fungicidas em uma coleção de isolados (Cruz; Ferreira;

Pessoni, 2020). Esse entendimento é fundamental para o desenvolvimento de estratégias aprimoradas de manejo integrado de pragas.

Esse trabalho é o único, até o presente, que investigou a diversidade genética e estrutura populacional de *L. theobromae sensu stricto* associada à queima das folhas e podridão peduncular do coco em regiões produtoras de coco no Nordeste do Brasil: Ceará, Maranhão, Pernambuco e Rio Grande do Norte, utilizando marcadores ISSR. E revela que as populações de *L. theobromae sensu stricto* em coqueiros no Nordeste brasileiro tem baixa diversidade genética baseado em marcadores ISSR, bem como, estão distribuídas em dois grupos e não possuem estrutura genética.

Referências

- ABDOLLAHZADEH, J. *et al.* Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. **Persoonia**, v. 25, p. 1-10, 2010.
- ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. **Métodos em Fitopatologia**. 2º edição, atualizada e ampliada. Viçosa, MG, Editora UFV. 2016. p. 516.
- ALVES, A. *et al.* Morphological and molecular data reveal cryptic species in *Lasiodiplodia theobromae*. **Fungal Diversity**, v. 28, p. 1-13, 2008.
- BAYRAKTAR, H. ; DOLAR, F. S.; MADEN, S. Use of rapd and issr markers in detection of genetic variation and population structure among *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* isolates on chickpea in Turkey. **Journal of Phytopathology**, v. 156, n. 3, p. 146-154, 2008.
- BENASSI, A. C.; FANTON, C. J.; SANTANA, E. N. **O cultivo do coqueiro-anão-verde: tecnologias de produção**. Vitória, ES: Incaper, 2013. p. 120.
- BHAT, A. H. *et al.* Morphological, pathogenic and genetic diversity in *Diplodia seriata* associated with black rot canker of apple in India. **Scientific Reports**, v. 13, 2023.
- BORBA, R. S. *et al.* Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma westwood* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**, v.34, p. 565-569, 2005.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNIEK, M.; DAVIS, R.V. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal Human Genetic**, n.32, p. 314-331, 1980.
- CARRIER, J. *et al.* Genetic differentiation in *Mycosphaerella* leaf spot pathogens. In: Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San Jose, 2002, Costa Rica. **Mycosphaerella leaf spot diseases of bananas: present status and outlook**, p. 123-129, 2003.

- CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, n. 3, p. 225-226, 1939.
- COELHO, I. L. *et al.* *Lasiodiplodia* species diversity associated with coconut leaf blight and stem-end rot in Northeastern Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 162, p. 45-61, 2022.
- COUTINHO, I. B. L. *et al.* Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. **Plant Pathology**, v. 66, p. 90-104, 2017.
- CORREIA, K. C. *et al.* Phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of table grape in the main Brazilian exporting region. **Plant Pathology**, v. 65, p. 92-103, 2016.
- CRUYWAGEN, E. M. *et al.*, Phylogenetic species recognition and hybridisation in *Lasiodiplodia*: A case study on species from Baobabs. **Fungal Biology**, v. 121, p. 420-436, 2017.
- CRUZ; C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. 2^a ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2020. p. 614.
- DOMINGUES, S. D. *et al.* Selection of primers for Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) in *Cereus* sp. (Cactaceae). **Revista Biotecnologia & Ciência**, v. 6, n. 2, p. 46-54, 2017.
- EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, p. 359-361, 2012.
- ELENA, G. *et al.* Intraspecific variation in *Diplodia seriata* isolates occurring on grapevines in Spain. **Plant Pathology**, v. 64, p. 680–689, 2015.
- EVANNO, G. *et al.* Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2611–2620, 2005.
- FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: Dominant markers and null alleles. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 574-578, 2007.
- FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. **Genetics**, v. 164, p. 1567-1587, 2003.
- FAN, J. *et al.* Genetic diversity of populations of *Monilinia fructicola* (Fungi, Ascomycota, Helotiales) from China. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 57, p. 206-212, 2010.
- GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1323-30, 1995.

- KOPELMAN, N. M., I. *et al.* Clumpak: A program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. **Molecular Ecology Resources**, v. 15, p. 1179-1191, 2015.
- LEALA, M. I.; EL –SHAHAWY, I. E.; TOLBA, I. H. Characterization of *Lasiodiplodia* isolates obtained from acid lime and Valencia orange in Egypt. **Al-Azhar Journal of Agricultural Research**, v. 46, n. 2, p. 51-67, 2021.
- LIMA, J. S. *et al.* Caracterização cultural, morfológica e patogênica de *Lasiodiplodia theobromae* associado a frutíferas tropicais. **Summa Phytopathologica**, v. 39, p. 81-88, 2013.
- LONGYA, A.; TALUMPHAI, S. JANTASURIYARAT, C. Morphological characterization and genetic diversity of rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*, from Thailand using ISSR and SRAP markers. **Journal Fungi**, v. 6, n. 38, 2020.
- MACHADO, A. R.; PINHO, D. B.; PEREIRA, O. L. Phylogeny, identification and pathogenicity of the Botryosphaeriaceae associated with collar and root rot of the biofuel plant *Jatropha curcas* in Brazil, with a description of new species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Diversity**, v. 67, p. 231-247, 2014.
- MARQUES, M. W. *et al.* Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, v. 61, p.181-193, 2013.
- MARULANDA, M. L. *et al.* Microsatellite isolation and characterization for *Colletotrichum* spp, causal agent of anthracnose in Andean blackberry. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, p. 7673-7685, 2014.
- MILLER, M.A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees. In : **Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), New Orleans CA, USA**, p. 1-8, 2010.
- MOHALI, S.; BURGESS, T. I.; WINGFIELD, M. J. Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. **Forest Pathology**, v. 35, p. 385-396, 2005.
- MOURA, J. I. L. *et al.* Efeito de injeção com ciproconazole no controle das doenças foliares e na produtividade do coqueiro. **Summa Phytopathologica**, v. 45, n. 2, p. 186-190, 2019.
- MUSSI-DIAS, V.; FREIRE, M. G. M. Evaluation of postharvest stem-end rot on coconut fruits. **Journal of Agriculture and Environmental Sciences**, v.5, n. 2, p. 25-35, 2016.
- NETTO, M. S. B. *et al.* Analysis of phylogeny, distribution, and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with gummosis of *Anacardium* in Brazil, with a new species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Biology**, v. 121, n. 4, p. 437-451, 2017.
- NETTO, M. S. B. *et al.* Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. **Fungal Diversity**, v. 67, p. 127-141, 2014.
- NOO. S. *et al.* Inter simple sequence repeat-based genetic divergence and varietal identification of banana in Pakistan. **Agronomy**, v. 12, n. 12, p. 1-15, 2022.

PEAKALL, R.; SMOUSE P.E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, v. 28, p. 2537-2539, 2012.

PHILLIPS, A. J. *et al.* Families in Botryosphaerales: a phylogenetic, morphological and evolutionary perspective. **Fungal Diversity**. v. 94, p. 1-22, 2019.

PHILLIPS, A. J. *Botryosphaeria* species associated with disease of grapevines in Portugal. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 41, n. 1, p. 3-18, 2002.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, 2000.

REDDY, M. P. *et al.* Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphis mand its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, p. 9-17, 2002.

RIEK, J. *et al.* AFLP based alternatives for the assessment of distinctness, uniformity and stability of sugar beet varieties. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 103, p. 1254-1265, 2001.

RONQUIST, F. *et al.* MrBayes v. 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, p. 539-542, 2012.

ROSADO, A. W. C. *et al.* Phylogeny, identification, and pathogenicity of *Lasiodiplodia* associated with postharvest stem-end rot of coconut in Brazil. **Plant Disease**, v. 100, n. 3, p. 561-568, 2016.

SANTOS, P. H. D. *et al.* Is *Lasiodiplodia theobromae* the only species that causes leaf blight disease in Brazilian coconut palms? **Tropical Plant Pathology**, v. 45, p. 434-442, 2020.

TALAMINI, V.; FERREIRA, J. M. S; RAMOS, S. R. R. **Incidência e severidade da queima-das-folhas em cultivares de coqueiro, em Pernambuco**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2013. p. 13.

VIANA, F. M. P. *et al.* **Tratamento do coco verde para exportação com ênfase no controle da podridão-basal-pós-colheita**. In: Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 29, Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. p. 30

VIANA, F. M. P. *et al.* Podridão-basal-pós-colheita de coco verde no Estado do Ceará. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 5, p. 545, 2002.

WARWICK, D. R.; TALAMINI, V. Doenças e métodos de controle ajustados à baixa capacidade de investimento dos pequenos produtores rurais. In: Fernando L.D. Cintra; Humberto R. Fontes; Edson E.M. Passos; Joana M.S. Ferreira. (Org.). **Fundamentos tecnológicos para a revitalização das áreas cultivadas com coqueiro gigante no Nordeste do Brasil**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2009. p. 157-190.

WHITE, T. J. *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. PCR Protocols: A guide to methods and applications. **Publisher: Academic Press**, p. 315-322. 1990.

XIE, H-H, *et al.* ISSR analysis of genetic diversity for mulberry *Lasiodiplodia* root rot pathogen. **Journal of Southern Agriculture**, v. 50, n. 7, p. 1505-1511, 2019.

XIE, H. H. *et al.* Genetic diversity analyses of *Lasiodiplodia theobromae* on *Morus alba* and *Agave sisalana* based on RAPD and ISSR molecular markers. **Mycology**, v. 7, n. 4, p. 155-164, 2016.

XU, L. *et al.* Identity, pathogenicity and genetic diversity of *Lasiodiplodia* associated with stem-end rot of avocado in China. **Plant disease**, 2024.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome finger printing by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, p. 176-183, 1994.

ZOLET, A. C. T. *et al.* **Marcadores moleculares na era genômica: metodologias e aplicações.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. 181 p.

5 CONCLUSÃO

A queima das folhas e a podridão peduncular do coco nos locais amostrados neste estudo possuem como agentes etiológicos *L. brasiliensis*, *L. hormozganensis*, *L. pseudotheobromae* e *L. theobromae sensu stricto*, as quais representaram 20 haplótipos, com *L. theobromae sensu stricto* sendo a espécie mais frequente.

Todas as espécies foram patogênicas no coco e *L. pseudotheobromae* foi a espécie mais agressiva dentre todas elas.

Este estudo representa o primeiro relato de *Lasiodiplodia* spp. como agente causal da resinose no estipe do coqueiro. Além disso, trata-se também do primeiro registro de *Lasiodiplodia hormozganensis* associada a podridão peduncular do coco

As populações de *L. theobromae sensu stricto* em coqueiros no Nordeste brasileiro tem baixa diversidade genética baseado em marcadores ISSR, estão distribuídas em dois grupos e não possuem estrutura genética.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHZADEH, J. *et al.* Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. **Persoonia**, v. 25, p. 1-10, 2010.
- ABESHA, E.; CAETANO-ANOLLÉS, G. Studying the ecology, systematics, and evolution of plant pathogens at the molecular level. In: Trigiano, R. N.; Windham, M. T.; Windham, A. S. **Plant Pathology - Concepts and Laboratory Exercises**. 2006, p. 722.
- ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. **Métodos em Fitopatologia**. 2ª edição, atualizada e ampliada. Viçosa, MG, Editora UFV. 2016. p. 516.
- ALVES, C. P. S. S. *et al.*, First Report of *Lasiodiplodia brasiliensis* causing root rot on watermelon in Brazil. **Plant Disease**, v. 107, n. 2, 2023.
- ALVES, A. *et al.* Morphological and molecular data reveal cryptic species in *Lasiodiplodia theobromae*. **Fungal Diversity**, v. 28, p. 1-13, 2008.
- ARAGÃO, W. M. *et al.* Fruto do coqueiro para consumo natural. In: ARAGÃO, W. M. (Ed.). **Coco pós-colheita**. Brasília: Embrapa – CTATC, 2002, cap. 3, p. 19-25.
- ARNHOLD, E. Pacote no ambiente R para análise de variância e análises complementares. **Revista Brasileira de Pesquisa Veterinária e Zootecnia**, v. 50, n.6, p. 488-492, 2013.
- BANDELT, H.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 1, p. 37-48, 1999.
- BATISTA-CRUZ, M. A. *et al.* Phylogeny, distribution, and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with cankers and dieback symptoms of persian lime in Mexico. **Plant Disease**, v. 103, n. 6, 2019.
- BAYRAKTAR, H. ; DOLAR, F. S.; MADEN, S. Use of rapd and issr markers in detection of genetic variation and population structure among *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* isolates on chickpea in Turkey. **Journal of Phytopathology**, v. 156, n. 3, p. 146-154, 2008.
- BENASSI, A. C.; FANTON, C. J.; SANTANA, E. N. **O cultivo do coqueiro-anão-verde: tecnologias de produção**. Vitória, ES: Incaper, 2013.
- BHAT, A. H. *et al.* Morphological, pathogenic and genetic diversity in *Diplodia seriata* associated with black rot canker of apple in India. **Scientific Reports**, v. 13, 2023.
- BORBA, R. S. *et al.* Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma westwood* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**, v.34, p. 565-569, 2005.
- BONFIELD, J.K.; STADEN, R. Experiment files and their application during large-scale sequencing projects. **DNA Sequence**, v. 6, p. 109-117, 1996.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNIEK, M.; DAVIS, R.V. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal Human Genetic**, n.32, p. 314-331, 1980.

BRITO, A. C. Q. *et al.* Diversity and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with black root rot and stem cutting dry rot in *Manihot esculenta* in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v, 157, p. 583-598, 2020.

BRITO, N. M. *et al.* Determination of pesticide residues in coconut water by liquid– liquid extraction and gas chromatography with electron-capture plus thermionic specific detection and solid-phase extraction and high- performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A**, v. 957, p. 201-209, 2002.

CARLIER, J. *et al.* Genetic differentiation in *Mycosphaerella* leaf spot pathogens. In: Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San Jose, 2002, Costa Rica. **Mycosphaerella leaf spot diseases of bananas: present status and outlook**, 2003. p. 123-129

CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 42, n. 3, p. 225-226, 1939.

COELHO, I. L. *et al.* *Lasiodiplodia* species diversity associated with coconut leaf blight and stem-end rot in Northeastern Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 162, p. 45-61, 2022.

COUTINHO, I. B. L. *et al.* Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. **Plant Pathology**, v. 66, p. 90-104, 2017.

CORREIA, K. C. *et al.* Phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of table grape in the main Brazilian exporting region. **Plant Pathology**, v. 65, p. 92-103, 2016.

CORREIA, M. S.; COSTA, J. L. S. Dispersão anemófila do fungo *Lasiodiplodia theobromae* em plantações de coqueiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 150-154. 2005.

COSTA, R. S. C *et al.* **Cultivo do coqueiro em Rondônia**. Ed. Téc. NASCENTE, A.S. EMBRAPA Rondônia. Versão Eletrônica: ISSN 1807-1805. Porto Velho, Rondônia, 2005.

CROUS, P. W. *et al.* Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Studies in Mycology**, v. 55, p. 235-253, 2006.

CRUZ; C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. 2ª ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2011.

CRUYWAGEN, E. M. *et al.*, Phylogenetic species recognition and hybridisation in *Lasiodiplodia*: A case study on species from Baobabs. **Fungal Biology**, v. 121, p. 420-436, 2017.

CRUZ; C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. 2ª ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2020. p. 614.

CUSTÓDIO, F. L. *et al.* *Lasiodiplodia hormozganensis* causing basal stem rot on *Ricinus communis* in Brazil. **Australasian Plant Disease**, v. 13, n. 25, 2018.

DOUANLA-MELI, C.; SCHARNHORST, A. Palm foliage as pathways of pathogenic Botryosphaeriaceae fungi and host of new *Lasiodiplodia* species from Mexico. **Pathogens**, v. 10, n. 10, p. 1-16, 2021.

DOMINGUES, S. D. *et al.* Selection of primers for Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) in *Cereus* sp. (Cactaceae). **Revista Biotecnologia & Ciência**, v. 6, n. 2, p. 46-54, 2017.

DUARTE, A. G. *et al.* Disposição do nematóide *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb) Baujard, em coqueiros portadores da doença anel-vermelho. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 3, p. 622-627, 2008.

EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, p. 359-361, 2012.

ELENA, G. *et al.* Intraspecific variation in *Diplodia seriata* isolates occurring on grapevines in Spain. **Plant Pathology**, v. 64, p. 680–689, 2015.

EVANNO, G. *et al.* Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2611–2620, 2005.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: Dominant markers and null alleles. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 574-578, 2007.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. **Genetics**, v. 164, p. 1567-1587, 2003.

FAN, J. *et al.* Genetic diversity of populations of *Monilinia fructicola* (Fungi, Ascomycota, Helotiales) from China. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 57, p. 206-212, 2010.

FAOSTAT. (2023). Estatísticas da Food and Agriculture Organization of the United Nations. **World Production**. Disponível em: Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 01 mai. 2025.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed., Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p. 220.

FRANÇA, K. R. S. *et al.* First report of *Lasiodiplodia hormozganensis* and *Lasiodiplodia laeliocattleyae* causing crown rot disease in banana fruits in Brazil. **Crop Protection**, 2024.

FREITAS-LOPES, R. L.; MCHADO, A. R.; LOPES, U. P. Coffee dieback caused by *Lasiodiplodia pseudotheobromae* in Brazil. **Plant Disease**, v. 104, n. 3, 2020.

FONTES, H. R. **Caracterização do quadro atual e principais ameaças à produção de coco seco no nordeste do Brasil**. 2010. Disponível em:

<<http://www.portaldoagronegocio.com.br>>; 8 dez. 2010, <<http://www.agrosoft.org.br>>; <<http://www.diadecampo.com.br>>. Acesso em: 01 mai. 2024.

FONTES, H. R.; FERREIRA, J. M. S. **A cultura do coqueiro**. 1.ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, Coleção Plantar, 48, 2006.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, 61, 1323-30, 1995.

GUPTA, M. *et al.* Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 89, p. 998-1006, 1994.

HUDA-SHAKIRAH, A. R. *et al.* *Lasiodiplodia theobromae* as a causal pathogen of leaf blight, stem canker, and pod rot of *Theobroma cacao* in Malaysia. **Scientific Reports**, v. 12, 2022.

IBGE. (2022). **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/>>. Acesso em: 01 mai. 2024.

ISMAIL, A. M. *et al.* *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica*) in Egypt. **Australasian Plant Pathology**, v. 41, p. 649-660, 2012.

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

KOPELMAN, N. M., I. *et al.* Clumpak: A program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. **Molecular Ecology Resources**, v. 15, p. 1179-1191, 2015.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

LEALA, M. I.; EL-SHAHAWY, I. E.; TOLBA, I. H. Characterization of *Lasiodiplodia* isolates obtained from acid lime and Valencia orange in Egypt. **Al-Azhar Journal of Agricultural Research**, v. 46, n. 2, p. 51-67, 2021.

LIU, F. *et al.* Genetic diversity of *Fusarium mangiferae* isolated from mango malformation disease in China. **Scientia Horticulturae**, v. 165, p. 352-356, 2014.

LIMA, J. S. *et al.* Caracterização cultural, morfológica e patogênica de *Lasiodiplodia theobromae* associado a frutíferas tropicais. **Summa Phytopathologica**, v. 39, p. 81-88, 2013.

LIYANAGE, D. V. Varieties and forms of the coconut palm grown in Ceylon. **Ceylon Coconut Quarterly**, v. 9, p. 1-10, 1958.

- LONGYA, A.; TALUMPHAI, S. JANTASURIYARAT, C. Morphological characterization and genetic diversity of rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*, from Thailand using ISSR and SRAP markers. **Journal Fungi**, v. 6, n. 38, 2020.
- MACHADO, A. R.; PINHO, D. B.; PEREIRA, O. L. Phylogeny, identification and pathogenicity of the Botryosphaeriaceae associated with collar and root rot of the biofuel plant *Jatropha curcas* in Brazil, with a description of new species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Diversity**, v. 67, p. 231-247, 2014.
- MARINHO, J. L. M.; GHEYI, H. R.; FERNANDES, P. D. Cultivo do coco “Anão Verde” irrigado com águas salinas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 1277-1284, 2006.
- MARQUES, M. W. *et al.* Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, v. 61, p.181-193, 2013.
- MARTINS, C. R.; JESUS JUNIOR, L. A. de. **Produção e comercialização de coco no Brasil frente ao comércio internacional: panorama 2014** / Carlos Roberto Martins – Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2014.
- MARULANDA, M. L. *et al.* Microsatellite isolation and characterization for *Colletotrichum* spp, causal agent of anthracnose in Andean blackberry. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, p. 7673-7685, 2014.
- MARSBERG, A. *et al.* *Botryosphaeria dothidea*: a latent pathogen of global importance to woody plant health. **Molecular Plant Pathology**, v. 18, n. 4, p. 477-488, 2017.
- MELLO, J. F. *et al.*, First report of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* causing cladode rot in *Hylocereus* sp. in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 104, p. 899, 2022.
- MILLER, M.A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees. **In Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**, New Orleans CA, USA, p. 1-8, 2010.
- MIRANDA, F. D. *et al.* **Tópicos Especiais em Genética e Melhoramento II**. Dados eletrônicos. - Alegre, ES: CCA-UFES, 2018.
- MOHALI, S.; BURGESS, T. I.; WINGFIELD, M. J. Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. **Forest Pathology**, v. 35, p. 385-396, 2005.
- MONTEIRO, C. M. P. *et al.* Control of foliar diseases by the axillary application of systemic fungicides in Brazilian coconut Palms. **Crop Protection**, v.52, p.78-83, 2013.
- MOURA, J. I. L. *et al.* Efeito de injeção com ciproconazole no controle das doenças foliares e na produtividade do coqueiro. **Summa Phytopathologica**, v. 45, n. 2, p. 186-190, 2019.
- MUSSI-DIAS, V.; FREIRE, M. G. M. Evaluation of postharvest stem-end rot on coconut fruits. **Journal of Agriculture and Environmental Sciences**, v.5, n. 2, p. 25-35, 2016.
- NETTO, M. S. B. *et al.* *Lasiodiplodia hormozganensis* causing leaf blight on *Aloe vera* in Brazil. **Crop Protection**, v. 179, 2024.

- NETTO, M. S. B. et al. Analysis of phylogeny, distribution, and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with gummosis of *Anacardium* in Brazil, with a new species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Biology**, v. 121, n. 4, p. 437-451, 2017.
- NETTO, M. S. B. et al. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. **Fungal Diversity**, v. 67, p. 127-141, 2014.
- NIU, X-Q. et al. First report of leaf spot disease in coconut seedling caused by *Bipolaris setariae* in China. **Plant Disease**, v. 98, n. 12, 2014.
- NOO, S. et al. Inter simple sequence repeat-based genetic divergence and varietal identification of banana in Pakistan. **Agronomy**, v. 12, n. 12, p. 1-15, 2022.
- NYLANDER, J. A. A. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary. **Biology Centre**, 2004.
- OLEKE, J. M. et al. Ex-ante economic analysis of biological control of coconut Mite in Benin. **AgBioForum**, v. 16, p. 161-169, 2013.
- OLIVEIRA, M. C. et al. Mudras de tomateiro produzidas à base de pó de coco e esterco bovino curtido. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 9, n. 3, p. 87-95, 2019.
- PEAKALL, R.; SMOUSE P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, v. 28, p. 2537-2539, 2012.
- PHILLIPS, A. J. et al. Families in Botryosphaeriales: a phylogenetic, morphological and evolutionary perspective. **Fungal Diversity**, v. 94, p. 1-22, 2019.
- PHILLIPS, A. J. L. et al. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. **Studies in Mycology**, v. 76, p. 51-167, 2013.
- PHILLIPS, A. J. *Botryosphaeria* species associated with disease of grapevines in Portugal. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 41, n. 1, p. 3-18, 2002.
- PHILLIPS, R. L.; VASIL, I. K. **Dna-Based markers in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2 ed. 2001.
- PORNSURIYA C, et al., Morphological and phylogenetic evidences reveal *Lasiodiplodia chonburiensis* and *L. theobromae* associated with leaf blight in *Hevea brasiliensis* in Southern Thailand. **Diversity**, v. 15, 2023.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, 2000.
- RAMBAUT, A. **FigTree, a graphical view of phylogenetic trees**. 1.4.2 ed. Edinburgh: The author, Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, 2014.
- RAM, C. Epidemiologia e controle químico da queima-das-folhas (*Botryodiplodia theobromae*) do coqueiro (*Cocos nucifera* L.). **Fitopatologia Brasileira**, v. 14, n. 3/4, p. 215-220, 1989.

RAYNER, R. W. A mycological color chart. Commonwealth Mycological Institute. Kew. **Surrey and British Mycological Society**, 1970, p. 34

REDDY, M. P. *et al.* Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, p. 9-17, 2002.

RIEK, J. *et al.* AFLP based alternatives for the assessment of distinctness, uniformity and stability of sugar beet varieties. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 103, p. 1254-1265, 2001.

RODRÍGUEZ-GÁLVEZ, E.; MALDONADO, E.; ALVES, A. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* causing dieback of table grapes in Peru. **European Journal of Plant Pathology**, v. 141, p. 477-489, 2015.

RODRÍGUEZ-GÁLVEZ, E. *et al.* Phylogeny and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of mango in Peru. **Fungal Biology**, v. 121, p. 452-465, 2017.

RONQUIST, F. *et al.* MrBayes v. 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, p. 539-542, 2012.

ROSADO, A. W. C. *et al.* Phylogeny, Identification, and Pathogenicity of *Lasiodiplodia* Associated with Postharvest Stem-End Rot of Coconut in Brazil. **Plant Disease**, v. 100, n. 3, p. 561-568, 2016.

SANTOS, J. E. A. *et al.* First Report of *Lasiodiplodia brasiliensis* causing crown rot on banana in Brazil. **Plant Disease**, v. 107, n. 8, 2023.

SANTOS, P. H. D. *et al.* Is *Lasiodiplodia theobromae* the only species that causes leaf blight disease in Brazilian coconut palms? **Tropical Plant Pathology**, v. 45, p. 434-442, 2020.

SANTOS, P. H. D. *et al.* Phylogeography and population structure analysis reveals diversity by mutations in *Lasiodiplodia theobromae* with distinct sources of selection. **Genetics and Molecular Research: GMR**, v. 16, n. 2, p. 1-14, 2017.

SAKALIDIS, M. L. *et al.* Pathogenic Botryosphaeriaceae associated with *Mangifera indica* in the Kimberley region of Western Australia. **European Journal of Plant Pathology**, v. 130, p. 379-391, 2011.

SILVA, N. I. *et al.* Phylogeny and morphology of *Lasiodiplodia* species associated with *Magnolia* forest plants. **Scientific Reports**, v. 9, 2019.

SILVA, A. C. Reaproveitamento da casca de coco verde. **Revista Monografias Ambientais**, v. 13, n. 5, p. 4077-4086, 2014.

SILVA, N. I. *et al.* Phylogeny and morphology of *Lasiodiplodia* species associated with *Magnolia* forest plants. **Scientific Reports**, v. 9, 2019.

SILVA, C. M. *et al.* Distribuição espacial do anel vermelho (*Bursaphelenchus cocophilus*) e da resinose (*Thielaviopsis paradoxa*) em coqueiro. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.11, n.3, p.192-197, 2016.

SILVA, J. M. *et al.* Evaluation of dwarf coconut (*Cocos nucifera* L.) germplasm to the damage intensity caused by foliar diseases. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 10, p. 1374-1380, 2017.

SLIPPERS, B. *et al.* Diversity in the Botryosphaerales: Looking back, looking forward. **Fungal Biology**, v. 121, n. 4, 2017.

SLIPPERS, B. *et al.* Phylogenetic lineages in the Botryosphaerales: a systematic and evolutionary framework. **Studies Mycology**, v. 76, p. 31-49, 2013.

SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: Diversity, ecology and impact. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p. 90-106. 2007.

SOBRAL, L. F. **O produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2018.

SOUZA, J. F. F. *et al.* *Lasiodiplodia theobromae* and *Lasiodiplodia brasiliense* causing dieback and rot fruit of jackfruit tree in Brazil. **Crop Protection**, v. 184, p. 106763, 2024.

SOUZA FILHO, B. F.; SANTOS, H. P.; ROBBS, C. F. Etiologia da queima das folhas do coqueiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 4, p. 5-10, 1979.

TALAMINI, V.; FERREIRA, J. M. S; RAMOS, S. R. R. **Incidência e severidade da queima-das-folhas em cultivares de coqueiro, em Pernambuco**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2013. p. 13.

TAYLOR, J. W. *et al.* Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 31, p. 21-32, 2000.

VIANA, F. M. P. *et al.* **Tratamento do coco verde para exportação com ênfase no controle da podridão-basal-pós-colheita**. In: Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 29, Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. p. 30

VIANA, F. M. P. *et al.* Podridão-basal-pós-colheita de coco verde no Estado do Ceará. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 5, p. 545, 2002.

VITÓRIA, N. S. *et al.* *Camarotella torrendiella* comb. nov. e *C. acrocomiae*: agentes etiológicos das lixas do coqueiro. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n.4, p. 295-301, 2008.

WANG, Y. *et al.* *Lasiodiploda regia* sp. nov.: A new species causing canker and dieback of fruit trees in China. **Phytopathology**, v. 113, p. 1210-1221, 2023.

WANG, Y. *et al.* Multigene Phylogenetics and morphology reveal five novel *Lasiodiplodia* species associated with blueberries. **Life**, v. 11, n. 7, 2021.

- WANG, Y. *et al.* *Lasiodiplodia* spp. associated with *Aquilaria crassna* in Laos. **Mycological Progress**, v. 18, p. 683-701, 2019.
- WARWICK, D. R. N. *et al.* **Coco (*Cocos nucifera*) controle de doenças**. In: Vale, F.X.R. do, Zambolin, L.; (Eds.) Controle de doenças de plantas: grandes culturas. Viçosa, MG: UFV; Brasília: Ministério da Agricultura e Abastecimento, 1997. p.765-787.
- WARWICK, D. R. N.; PASSOS, E. E. M. Outbreak of stem bleeding in coconuts caused by *Thielaviopsis paradoxa* in Sergipe, Brazil. **Tropical Plant Pathology**, Brazilian, v. 34, n. 3, p. 175-177, 2009.
- WARWICK, D. R.; TALAMINI, V. Doenças e métodos de controle ajustados à baixa capacidade de investimento dos pequenos produtores rurais. In: Fernando L.D. Cintra; Humberto R. Fontes; Edson E.M. Passos; Joana M.S. Ferreira. (Org.). **Fundamentos tecnológicos para a revitalização das áreas cultivadas com coqueiro gigante no Nordeste do Brasil**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2009. p. 157-190.
- WHITE, T. J. *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. PCR Protocols: A guide to methods and applications. **Publisher: Academic Press**, p. 315-322. 1990.
- XIE, H-H, *et al.* ISSR analysis of genetic diversity for mulberry *Lasiodiplodia* root rot pathogen. **Journal of Southern Agriculture**, v. 50, n. 7, p. 1505-1511, 2019.
- XIE, H. H. *et al.* Genetic diversity analyses of *Lasiodiplodia theobromae* on *Morus alba* and *Agave sisalana* based on RAPD and ISSR molecular markers. **Mycology**, v. 7, n. 4, p. 155-164, 2016.
- XU, L. *et al.* Identity, pathogenicity and genetic diversity of *Lasiodiplodia* associated with stem-end rot of avocado in China. **Plant Disease**, 2024.
- ZHANG, E. *et al.* Evaluating species in *Botryosphaerales*. **Persoonia**, v. 46, p. 63-115, 2021.
- ZHAO, L. *et al.* Stem blight of blueberry caused by *Lasiodiplodia vaccinii* sp. nov. in China. **Plant disease**, v. 103, n. 8, 2019.
- ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome finger printing by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, p. 176-183, 1994.
- ZOLET, A. C. T. *et al.* **Marcadores moleculares na era genômica: metodologias e aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. p. 181.