

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

INGRID BERNARDO DE LIMA COUTINHO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E CONTROLE DE FUNGOS DA
FAMÍLIA *Botryosphaeriaceae* EM FRUTEIRAS TROPICAIS**

**FORTALEZA
2016**

INGRID BERNARDO DE LIMA COUTINHO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E CONTROLE DE FUNGOS DA
FAMÍLIA Botryosphaeriaceae EM FRUTEIRAS TROPICAIS**

Tese submetida à coordenação do Curso Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Agronomia/Fitotecnia, da Universidade Federal do Ceará.

Orientador: José Emilson Cardoso

Coorientadores: Francisco Oliveira das Chagas Freire
Cristiano Souza Lima

**FORTALEZA
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C896c Coutinho, Ingrid Bernardo de Lima.
Caracterização molecular e controle de fungos da família Botryosphaeriaceae em fruteiras tropicais /
Ingrid Bernardo de Lima Coutinho. – 2016.
138 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-
Graduação em Agronomia (Fitotecnia), Fortaleza, 2016.
Orientação: Prof. Dr. José Emilson Cardoso.
Coorientação: Prof. Dr. Francisco Oliveira das Chagas Freire.
1. Taxonomia. 2. Filogenia. 3. Lasiodiplodia. 4. Fusicoccum. 5. Anacardiáceas. I. Título.
- CDD 630
-

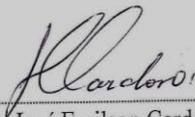
INGRID BERNARDO DE LIMA COUTINHO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E CONTROLE DE FUNGOS DA FAMÍLIA
BOTRYOSPHAERIACEAE EM FRUTEIRAS TROPICAIS**

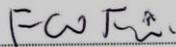
Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Agronomia/Fitotecnia, da Universidade Federal do Ceará. Área de concentração: Fitomoléstias Tropicais.

Aprovada em: 29 de julho de 2016

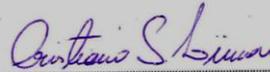
BANCA EXAMINADORA



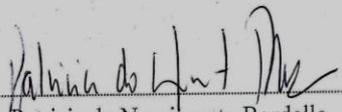
Prof. Dr. José Emilson Cardoso
Embrapa Agroindústria Tropical/UFC
(Orientador)



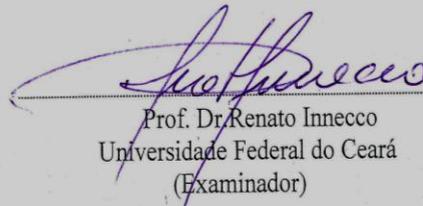
Dr. Francisco das Chagas de Oliveira Freire
Embrapa Agroindústria Tropical
(Examinador; Coorientador)



Prof. Dr. Cristiano Souza Lima
Universidade Federal do Ceará
(Examinador; Coorientador)



Dra. Patricia do Nascimento Bordallo
Embrapa Agroindústria Tropical
(Examinador)



Prof. Dr. Renato Innecco
Universidade Federal do Ceará
(Examinador)



Prof. Dr. Fernando Antonio Souza de Aragão
Embrapa Agroindústria Tropical/UFC
(Examinador)

Primeiramente, a Deus, pela presença constante em minha vida, por guiar meus passos e fazendo-me instrumento de vossa vontade. Envia-me senhor!!

Aos meus avós, Luiz Correia da Fonseca e Maria Conceição Correia de Souza, os quais tenha eterna gratidão por terem dedicados a mim o amor de verdadeiros pais, zelando por minha saúde e educação desde meus primeiros dias de vida.

DEDICO

Ao meu amado esposo Aníbal Coutinho do Rêgo. Por todo o companheirismo, amor, paciência e dedicação durante todas as fases de nossa união. A ele que foi meu principal incentivador e exemplo de profissionalismo dedico todo meu Amor. Sinto-me muito amada, e isso me faz muito bem.

OFEREÇO

“Disse-me o Senhor: A minha graça te basta, porque o meu poder se aperfeiçoa na fraqueza. De boa vontade, pois, me gloriarei nas minhas fraquezas, para que em mim habite o poder de Cristo. Por isso sinto prazer nas fraquezas, nas injúrias, nas necessidades, nas perseguições, nas angústias por amor de Cristo.

Porque quando estou fraco então sou forte.”

2 Coríntios 12:8-10

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia, pela oportunidade da realização do meu curso de doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e de Ensino Superior (CAPES), pela bolsa de estudo concedida, através de convênio com o Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Agroindústria Tropical, Fortaleza, Ceará, onde foram realizados todos os experimentos deste trabalho.

Aos meus orientadores: Dr José Emilson Cardoso por ter aceitado me orientador mesmo já com um ano de curso, desde então proporcionando-me todo o apoio e incentivo durante todas as fases do meu doutoramento com bastante profissionalismo; ao Dr Francisco das Chagas Oliveira Freire pela valiosa coorientação desde o início desse trabalho, proporcionando-me todo o suporte técnico e científico necessários para sua execução. Aos dois agradeço igualmente pela compreensão, confiança e amizade depositada em mim, que contribuíram tanto para o sucesso do meu doutoramento como para minha vida pessoal durante esse período.

Ao Prof. Cristiano Souza Lima, pela coorientação e por ter compartilhado comigo seus conhecimentos de fitopatologia molecular e bioinformática, proporcionando-me todo o conhecimento empírico e prático para a execução desse estudo e por todas as sugestões para a melhoria do mesmo.

Aos demais membros da banca examinadora: Dra Patricia Bordallo, Dr Fernando Aragão e Dr Renato Inecco pelas valiosas sugestões e contribuições para o aperfeiçoamento deste trabalho.

A professora Carmem Dolores Gonzaga Santos pela amizade, carinho, confiança e conselhos valiosíssimos que irei levar por toda minha vida profissional e pessoal.

Aos meus avôs, Luiz Correria e Conceição Correria, aos quais dedico a conquista desse título, pelo amor incondicional e doação durante todas as fases da minha vida.

Aos profissionais e amigos do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa (Joilson, Naide, Francisco, Marcio, Daniela, Fábio, Natália, Glauber, Lívia, Samara, Dr Marlon Valentim e ao Dr Marto Viana); do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa (Ancelita, Maraisa e Dra Patrícia Bordallo); aos amigos do Laboratório de Micologia da UFC (Prof. Cristiano Lima, Israel, Arivaldo, Bruna): a todos meu muito obrigada por

todo o apoio, sentimento de amizade que foram construídas e mantidas ao longo desse período, pelos conhecimentos compartilhados, e por toda a colaboração técnica e científica durante a execução deste trabalho e da minha vida acadêmica.

Ao meu esposo Aníbal Coutinho do Rêgo, ao qual ofereço essa conquista, por todo o sentimento de amor, fidelidade, respeito e incentivo que foram fundamentais para que juntos conquistássemos todos nossos objetivos profissionais e pessoais. Te amo meu Bem!

Aos meus pais Heriberto e Suely pela dádiva do meu nascimento e pela amizade e apoio necessário durante as fases da minha vida.

Ao meu grande irmão Heriberto Filho pela amizade, amor incondicional e dedicação a nossa irmandade, permitindo-me participar diariamente de sua vida.

A todos os meus familiares pela força conjunta na busca pela união e felicidade da nossa grande e linda família.

Aos meus pequenos, Luiz Neto, Luna Maria, Maria Eduarda e João Guilherme, por trazerem a minha vida: a pureza, a paz e a doçura que necessito. Perto deles sinto-me mais próxima de Deus!

A todos meus amigos que juntos somam uma grande riqueza adquirida na minha vida. Em especial, a minha amiga Mônica Maria por sempre está ao meu lado como uma verdadeira irmã, permitindo-me participar de sua família ao longo de mais de 16 anos de amizade, e por sempre está presente nos principais momentos da minha vida. A amigo Airton Rodrigues por sua fiel amizade ao longo dos últimos dez anos, estando sempre disposto a alegrar-me e consolar-me durante os momentos de aflição, fazendo-se presente nos momentos mais felizes de minha vida; a minha amiga Eveline pelo companheirismo e amizade cultivada desde a graduação, sendo reforçada durante a luta da pós-graduação e hoje consolidada para toda a vida; as amigas de doutorado Conceição e Elaine por terem sido grandes parceiras durante o curso, compartilhando comigo seus conhecimentos e experiências pessoais.

A professora Maria Nenmaura Gomes Pessoa, que mesmo após sua aposentadoria, continua sendo a grande mentora da minha conduta profissional, permanecendo em minha vida como amiga e sempre me acolhendo com muito carinho.

Aos amigos que fizemos em Belém-PA, que na sua maioria não são naturais da região, e que juntos conseguimos formar uma grande família. A cada encontro

conseguimos amenizar a saudade da família, e nos sentirmos acolhidos e felizes junto a vocês. Obrigada por vossas amizades!

Aos meus sogros, Ludmila e Tarcísio, meus cunhados e toda a família Coutinho por sempre me acolheram com muito carinho e respeito.

Aos colaboradores: Abigail Marcelino pela execução e ensino da análise bayesiana; Alexandre Machado e Olinto Liparini pelos cortes microscópicos e fotografias das novas espécies descritas neste trabalho.

A Professora María Esperanza Sánchez Hernández por ter aceitado a orientar-me durante os dois meses de estágio que passei junto ao seu grupo de pesquisa em Patologia Agroflorestal da Universidade de Córdoba, na Espanha. Como também aos amigos do laboratório: Mario, Maria, Maria Angeles, Javi e José, pelos conhecimentos compartilhados e momentos de descontração.

Por fim, encerro constando meu muito obrigada a todos que de alguma forma participaram e contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

A família Botryosphaeriaceae (Ascomycota, Botryosphaeriales) é composta por complexos de espécies crípticas endofíticas e patogênicas capazes de provocar sintomas de cancos e morte descendente de ramos a diversos hospedeiros, sobretudo plantas lenhosas, dentre as fruteiras tropicais se destacam. Objetivou-se com o presente estudo realizar a caracterização biológica, molecular e o controle de isolados fúngicos família Botryosphaeriaceae associados a fruteiras tropicais no Nordeste brasileiro. Dentre as técnicas utilizadas estão: o sequenciamento gênico combinado das regiões do espaçador interno transcrito (ITS) do DNA ribossômico, fator de alongação 1-alfa (TEF-1 α) e β -tubulina (β t) para a determinação das relações filogenéticas entre os isolados, dados de caracteres morfofisiológicos e patógeno, bem como a avaliação dos métodos de controle químico e genético das espécies identificadas. Diante da caracterização molecular foi possível a identificação de seis espécies do complexo *Lasiodiplodia*, dentre as quais duas novas espécies, duas espécies de *Neofusicoccum*, uma de *Pseudofusicoccum* e uma de *Neoscytalidium* associadas a diversas fruteiras tropicais. Dentre essas espécies e seus respectivos hospedeiros estão: *Lasiodiplodia brasiliense* (*Manilkara zapota*, *Mangifera indica* e *Spondias purpurea*), *L. caatinguensis* sp. nov. (*Anarcadium occidentale*, *S. purpurea*, *S. mombin* e *Citrus sinensis*), *L. euphorbicola* (*Annona muricata* e *Cocos nucifera*), *L. theobromae* (*S. purpurea*, *Talisia esculenta* e *A. occidentale*), *L. pontae* sp. nov. (*S. purpurea* e *A. occidentale*), *L. pseudotheobromae* (*S. purpurea*, *Tamarindus indica* e *A. occidentale*), *Neofusicoccum brasiliense* (*Psidium guajava*), *Neofusicoccum kwambonambiense* (*A. occidentale*), *Neoscytalidium hyalinum* (*A. occidentale*, *M. indica*) e *Pseudofusicoccum stromaticum* (*A. occidentale*). Através da caracterização morfológica dos isolados, percebeu-se grandes semelhanças morfofisiológicas entre os isolados, notando-se variações em taxa de crescimento quando submetidos a diferentes meios de cultura e temperaturas de incubação. Em geral, os isolados apresentaram abundante crescimento micelial, de coloração inicialmente esbranquiçada se tornando escura com a idade. Quanto à patogenicidade, todos os isolados de Botryosphaeriaceae foram patogênicos a frutos de manga, aos diferentes genótipos de cajueiro e as plantas jovens de umbu-cajá. Todas as espécies de *Lasiodiplodia* foram patogênicas a plantas jovens de gravioleira. No entanto, a

agressividade dos isolados variou quanto à espécie e ao hospedeiro, sendo as espécies de *Lasiodiplodia* as mais agressivas. No que concerne às medidas de controle genético e químico, respectivamente: o genótipo BRS253 foi o mais susceptível as espécies, seguido do CCP76, BRS189 e BRS226 que não diferiram entre si. Os demais genótipos foram moderadamente resistentes, com destaque para BRS274 e Embrapa 51, nos quais as espécies não diferiram em virulência; os fungicidas tebuconazole e carbendazin inibiram o crescimento *in vitro* das espécies, não obstante o carbendazin tenha se mostrado mais eficiente.

Palavras-chave: Taxonomia; Filogenia; *Lasiodiplodia*; *Fusicoccum*; Anacardiáceas.

ABSTRACT

The family Botryosphaeriaceae (Ascomycota, Botryosphaeriales) encompasses several ecologically diverse fungal species, which are usually isolated as endophytes or pathogens, from various woody hosts. The present work aimed to identify morphologically and by molecular techniques as well as to assess the pathogenicity of isolates of Botryosphaeriaceous fungi obtained from fruit plants grown in the Brazilian Northeastern region. After the isolation of DNA from the fungi the combined analyses of fragments sequence of transcribed spacer (ITS) of ribosomal DNA, translation elongation factor 1- α (TEF-1 α) and β -tubulina (β t) were used to determine the phylogenetic relationships among the isolates which lead to identification of six fungal species of *Lasiodiplodia*, two of *Neofusicoccum*, one of *Pseudofusicoccum* and one of *Neoscytalidium* associated with die-back and cankers on the following host plants: *Lasiodiplodia brasiliense* (*Manilkara zapota*, *Mangifera indica* and *Spondias purpurea*), *L. caatinguensis* sp. nov (*Anarcadium occidentale*, *S. purpurea*, *S. mombin* and *Citrus sinensis*), *L. euphorbicola* (*Annona muricata* and *Cocos nucifera*), *L. theobromae* (*S. purpurea*, *Talisia esculenta* and *A. occidentale*), *L. pontae* sp. nov (*S. purpurea* and *A. occidentale*), *L. pseudotheobromae* (*S. purpurea*, *Tamarindus indica* and *A. occidentale*), *Neofusicoccum brasiliense* (*Psidium guajava*), *Neofusicoccum kwambonambiense* (*A. occidentale*), *Neoscytalidium hyalinum* (*A. occidentale* and *M. indica*) e *Pseudofusicoccum stromaticum* (*A. occidentale*). As far as the morphology of isolates is concerned there were significant differences among them, mainly concerning the culture media and the incubation temperatures adopted. Generally, isolates presented a white mycelial growth, becoming dark after aging. As for pathogenicity all species were pathogenic to fruits of mango as well as to seedlings of *A. occidentale* and *S. purpurea*. All species of pathogenic *Lasiodiplodia* were the young plants of soursop. However, the aggressiveness of the isolates varied as the species and the host species *Lasiodiplodia* being the most aggressive. The cashew genotype BRS253 behaved as the most susceptible of all genotypes tested, followed by CCP76, BRS189 and BRS226, which did not present any significant difference among them. All the other genotype were considered as moderately resistant, especially BRS274 and Embrapa 51, upon which the fungal isolates showed no pathogenicity differences. Both fungicides tested were able to inhibit the fungal growth *in vitro* conditions, despite carbendazin had been a little more efficient than tebuconazole.

Key-words: Taxonomy, Phylogeny; *Lasiodiplodia*; *Fusicoccum*; Anacardiaceae.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
3 REVISÃO DE LITERATURA	8
3.1 Importância das fruteiras tropicais para o Nordeste brasileiro	8
3.2 Aspectos gerais da família Botryosphaeriaceae	11
3.3 Diversidade de Botryosphaeriaceae no Brasil	14
3.4 Caracterização de Botryosphaeriaceae	19
3.4.1 Caracterização molecular de Botryosphaeriaceae	21
3.5 Controle de Botryosphaeriaceae	24
4 REFERÊNCIAS	26
CAPÍTULO I.....	33
1 Introduction	35
2 Materials and methods.....	37
2.1 Sampling and fungal isolation	37
2.2 DNA extraction and sequence amplification.....	38
2.3 Phylogenetic analyses.....	39
2.4 Morphological and cultural characterization.....	46
2.5 Pathogenic characterization.....	47
2.5.1 Pathogenicity on fruits.....	47
2.5.2 Pathogenicity on tropical fruit plants.....	47
3 Results	48
3.1 Phylogenetic analyses and DNA sequencing	48
3.3 Taxonomy.....	53
3.4 Pathogenic characterization.....	57
3.4.1 Pathogenicity on mango fruits.....	57
3.4.2 Pathogenicity on cashew, soursop and yellow mombin plants	57
4 Discussion.....	58
5 References	63
CAPÍTULO II.....	68
RESUMO	69
ABSTRACT	71
1 INTRODUÇÃO.....	72
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	74
2.1 Coleta de amostras e obtenção dos isolados.....	74
2.2 Caracterização molecular	75
2.2.1 Extração, amplificação e sequenciamento de DNA	75
2.2.2 Análises filogenéticas	76
2.5 Caracterização patogênica	82
3 RESULTADOS	82
3.1 Caracterização molecular	83
3.3 Caracterização morfofisiológica.....	85
3.4 Patogenicidade e virulência em frutos de manga e plantas jovens de Spondias sp. e cajueiro	88
4 DISCUSSÃO.....	92
5 CONCLUSÕES.....	96

6 REFERÊNCIAS	96
CAPÍTULO III	100
RESUMO	101
ABSTRACT	103
1 INTRODUÇÃO.....	105
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	107
2.1 Obtenção dos isolados	107
2.2 Controle genético <i>in vivo</i>	110
2.3 Controle químico <i>in vitro</i>	111
3 RESULTADOS	113
3.1 Controle genético <i>in vivo</i>	113
3.2 Controle químico <i>in vitro</i>	116
4 DISCUSSÃO.....	121
5 CONCLUSÕES	125
6 REFERÊNCIAS	126
CONSIDERAÇÕES FINAIS	130

1 INTRODUÇÃO

A fruticultura se encontra dentre as principais atividades a movimentar o agronegócio do Brasil. Detentor de um clima estável, grande diversidade de fruteiras tropicais e localização geográfica favorável a exportação, o Nordeste brasileiro se destaca como uma região emergente no cenário frutícola atual.

Fungos da família *Botryosphaeriaceae* são importantes patógenos de plantas lenhosas, que apresentam hábitos parasíticos, saprofíticos e endofíticos, grande diversidade ecológica, morfológica e genética (SLIPPERS & WINGFIELD, 2007; PHILLIPS *et al.*, 2013). São capazes de causar vários sintomas em seus hospedeiros, como a morte descendente de ramos, canchros em caules, exsudação de resinosidade, podridões pedunculares em frutos, podridões do colo, dentre outros, os quais são agravados quando submetidas a condições adversas de estresse hídrico e ferimentos (SLIPPERS & WINGFIELD, 2007).

Com o advento da biologia molecular, a taxonomia dessa família de fungos passou por diversas mudanças sendo atualmente composta por 17 gêneros e uma média de 222 espécies, devidamente caracterizadas tanto morfológicamente, através das dimensões de seus conídios, como molecularmente, com base em sequências de DNA (PHILLIPS *et al.*, 2013). No entanto, devido ao uso frequente do sequenciamento gênico desses fungos e levantamentos nos mais diversos biomas, o número de espécies presentes nessa família se encontra em constante atualização, o que vêm possibilitando aos poucos o real conhecimento de sua diversidade.

Dentre os gêneros que se destacam estão *Botryosphaeria*, *Lasiodiplodia* Ellis & Everh., *Neocyttidium* Crous & Slippers, *Neofusicoccum* Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *Pseudofusicoccum* Mohali, Slippers & M.J. Wingf., típicos de regiões tropicais, com algumas de suas espécies já relatadas em associação com hospedeiros em território brasileiro (Marques *et al.*, 2013a; Marques *et al.*, 2013b; Netto *et al.*, 2014; Machado *et al.*, 2014a; Machado *et al.*, 2014b; Rosado *et al.*, 2016; Correia *et al.*, 2016; Gonçalves *et al.*, 2016). Dentre os motivos que levam ao destaque desses gêneros estão seus frequentes relatos nas mais diversas regiões geográficas e plantas, fazendo-se inexistindo em regiões polares, e por constituírem complexos de espécies crípticas (SLIPPERS & WINGFIELD, 2007; PHILLIPS *et al.*, 2013).

Considerando a diversidade de espécies frutícolas que o Brasil possui e a importância fitossanitária dos fungos Botryosphaeriaceae, o número de pesquisas envolvendo este patossistema ainda é considerado pequeno, com muitas espécies a serem identificadas e relações taxonômicas a serem redefinidas.

Quanto aos relatos brasileiros sobre a associação de Botryosphaeriaceae com frutíferas de importância econômica no Brasil é relevante destacar os estudos já realizados envolvendo a cultura da mangueira (MARQUES *et al.*, 2013a,b), do mamoeiro (NETTO *et al.*, 2014), do coqueiro (ROSADO *et al.*, 2016) e da videira (CORREIA *et al.*, 2016). Tais estudos, além de chamar a atenção para as perdas em produtividade provocadas por esses patógenos evidenciaram, mediante o uso da filogenética molecular, uma grande diversidade genética entre os fungos dessa família e a descrição de novas espécies presentes no Brasil (MARQUES *et al.*, 2013a,b; NETTO *et al.*, 2014).

Portanto, os constantes relatos de *L. theobromae* (Pat.) Griff & Maubl. sensu lato em associação a plantas de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) e de outras frutíferas de menor expressão econômica para o Nordeste (FREIRE *et al.*, 1991; FREIRE *et al.*, 1998; FREIRE *et al.*, 2004; CARDOSO *et al.*, 2006) e mediante a escassez de estudos filogenéticos em tronco destes patossistemas constituíram as hipóteses que subsidiaram a execução e o direcionamento dos objetivos deste trabalho.

Diante do exposto, objetivou-se neste trabalho: i) Realizar um levantamento de fungos da família Botryosphaeriaceae associados a tecidos sintomáticos das principais frutíferas cultivadas na região Nordeste, ii) caracterizar os isolados fúngicos com base em dados moleculares, morfológicos, fisiológicos e patogênicos; iii) testar os métodos de controle genético e químico nas espécies identificadas.

Nota¹

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Importância das fruteiras tropicais para o Nordeste brasileiro

¹Esta tese segue as normas da revista Plant Pathology (2016) apenas para o capítulo I, e do guia de normalização de trabalhos acadêmicos da Universidade Federal do Ceará (UFC) para as demais partes.

São consideradas fruteiras tropicais aquelas plantas cujos centros de origem e desenvolvimento estão localizados nas zonas tropicais do planeta, ou seja, entre os trópicos de capricórnio e câncer (PEREIRA & KAVATI, 2011).

Norteadas pela crescente demanda da humanidade por uma alimentação mais saudável e nutritiva a base de frutas frescas ou processadas, investimentos em avanços tecnológicos visam, sobretudo, a condução de pomares mais produtivos, com o aprimoramento de práticas de processamento, armazenamento e transporte, bem como a criação de programas de melhoramento genético que possibilitem os produtores a criação de estratégias e condições favoráveis. Devido a estes avanços foi possível o cultivo de diversas espécies frutíferas antes exclusivamente de clima temperados e exóticas, em regiões de climas tropicais ou subtropicais (CRISÓSTOMO & NAUMOV, 2009; PEREIRA & KAVATI, 2011).

Em nível mundial, são produzidas em média 800 milhões de toneladas de frutas anuais e o Brasil contribui com 5,7% dessa produção (FAO, 2014), estando entre os oito maiores países produtores de frutíferas tropicais do mundo (CRISÓSTOMO & NAUMOV, 2009). Devido ao clima diversificado e favorável do Brasil, a fruticultura está entre umas das atividades que contribui significativamente para o desenvolvimento rural e para o agronegócio do país, podendo ser praticada em todas as regiões, ser rentável e de grande importância socioeconômica, gerando em torno de cinco milhões de empregos no campo com um valor bruto de produção superior a R\$ 23 bilhões (REETZ *et al.*, 2015; FACHINELLO *et al.*, 2011).

Levantamentos específicos sobre a produção de hortifrutícolas no Brasil relatam que regiões brasileiras tidas como tradicionais na produção de frutas tropicais, como o Sul e Sudeste, nas últimas duas décadas enfrentam desafios e hoje dividem o cenário frutícola nacional com regiões em ascensão, como o Nordeste. Dentre esses desafios estão à falta de mão de obra, terras com preços elevados e problemas fitossanitários ocasionados pelo manejo inadequado; esse último, ainda pouco frequente aos fruticultores nordestinos (ZAGATI & BRAGA, 2013).

Mediante aplicações de novas tecnologias o Nordeste brasileiro, além de possuir condições edafoclimáticas favoráveis a produção de diversas de fruteiras tropicais de qualidade, conta com uma infraestrutura de irrigação que possibilitou a região a aumentos no rendimento de suas terras e com isso um alcance regular em suas produções (FACHINELLO *et al.*, 2011). Dentre outras vantagens, a região ainda conta

com uma localização geográfica privilegiada, por estar próxima a vários portos marítimos, tornando-a acessível aos principais mercados exportadores (União Européia e Estados Unidos) (Crisóstomo & Naumov, 2009) e com um clima estável, sendo este quente e seco (BSh), com pequenas variações entre o tropical chuvoso (Aw') e mesotérmico (Cs') segundo Köppen (ARAÚJO, 2011). Tais condições climáticas, até certo ponto desfavorecem o aparecimento de pragas e doenças, proporcionando uma maior taxa fotossintética e contribuindo para o aumento do teor de sólidos solúveis nos frutos (CARDOSO *et al.*, 2009).

Em 2013, a região Nordeste chegou a produzir cerca de 10.381.583 toneladas de frutas, em uma área colhida de 2 milhões de hectares, movimentando um valor de R\$ 170.852 milhões, o que representou 25,83% da produção nacional e 31% da produção agrícola regional (IBGE, 2016). Composta por nove estados, todos possuem, em diferentes graus de produção, potencial significativo para o cultivo de frutas (IBGE, 2016).

De acordo com dados do Banco do Nordeste do Brasil (BNB) a região conta com cerca de 15 grandes grupos produtores de frutas (SANTOS *et al.*, 2007) nos quais se localizam nos pólos do Vale do São Francisco, entre o sul de Pernambuco e o norte da Bahia, e os pólos do Ceará e Rio Grande do Norte, respectivamente (ZAGATI & BRAGA, 2013). A Bahia destaca-se como o maior e mais diverso estado produtor da região, sobretudo na produção de banana (*Musa sp.*) (1.088.647 toneladas), laranja (*Citrus x sinensis*) (1.026.167 toneladas), mamão (*Carica papaya*) (794.565 t), coco (*Cocos nucifera*) (552.836 t), manga (*Mangifera indica*) (430.594 t) e maracujá (*Passiflora edulis*) (381.192 t). Em Pernambuco, prevalecem a produção de banana (396.470 toneladas), uva (*Vitis vinifera*) (236.719 toneladas) e manga (218.679 toneladas). No Rio Grande do Norte na produção de melão (*Cucumis melo*) (232.575 t), banana (171.06 t) melancia (*Citrullus lanatus*) (121.688 t) e abacaxi (*Ananas comosus*) (101.740 t). E no Ceará destacam-se a produção de banana (452.541 t), maracujá (144.024 t), estando em 2º lugar na produção de coco (246.959 t) e de melão (222.391 t), em 3º lugar na produção de mamão (98.77 t) e em 1º lugar na produção nacional de castanha de caju (*A. occidentale*), produzindo 51,21 t (IBGE, 2016). Assim, a produção de castanha de caju e de frutos de manga no Nordeste é responsável por 97,63% e de 67,43% da produção nacional, respectivamente (IBGE, 2016).

Por último, porém não menos importante, existe o cultivo de outras frutíferas típicas e endêmicas que compõem a fruticultura nordestina, mas que devido à baixa produção não são contabilizadas nas estatísticas oficiais. Dentre estas merecem destaque: as espécies de *Spondias* (*S. mombin*, *S. dulcis*, *S. purpurea*, *S. tuberosa* e *Spondias* spp.), a ateira (*Annona squamosa*), atemóia (*Annona* × *atemoya*), a gravioleira (*Annona muricata*), pitomba (*Talisia esculenta*), tamarindo (*Tamarindus indica*) e dentre outras. O cultivo dessas frutíferas ainda é realizado dentro um sistema extrativista, estando presente em quintais e pequenos pomares domésticos, e constantemente encontradas, de forma aleatória, nas imensas faixas litorâneas e na Caatinga nordestina, em beiras de estradas e nas feiras livres, sendo bastante apreciadas pelos sabores e aromas de suas polpas.

Mesmo diante de tamanha diversidade, vantagens naturais e investimentos em volta da região Nordeste, problemas fitossanitários, como o aparecimento de doenças fúngicas, tornam-se um fator limitante na produção (FREITE *et al.*, 1997, 1998; CARDOSO *et al.*, 2002). O fator estresse hídrico em plantas perenes, ocasionado por longos períodos de estiagens na região quando mal manejado, favorece a ocorrência de fungos endofíticos - patógenos latentes – aumentando a probabilidade de disseminação desses agentes durante execução das práticas agrícolas (CARDOSO *et al.*, 2006), sobretudo a do fungo *Lasiodiplodia theobromae* sensu lato.

Essa espécie fúngica se destaca, sendo identificado no Nordeste em associação com fruteiras perenes desde a década 40, infectando mangueiras no estado de Pernambuco (BATISTA, 1947). Foi relato pela primeira vez no Ceará na década de 90 associada aos sintomas de exsudação de resinosidade e cancrios em pomares de cajueiro (FREIRE, 1991) e, posteriormente, a outras fruteiras tropicais de importância para a região (FREIRE *et al.*, 1998; FREIRE *et al.*, 2004). Desde então, esta e outras espécies que compõem a família Botryosphaeriaceae se destacam no cenário frutícola do Nordeste, causando declínios em produção, em grandes e pequenos pomares (FREIRE *et al.*, 2011; MARQUES *et al.*, 2013; NETTO *et al.*, 2014; CORREIA *et al.*, 2016).

3.2 Aspectos gerais da família Botryosphaeriaceae

Taxonomicamente, a família Botryosphaeriaceae pertence ao: Domínio Eukaryota; Reino Fungi; Filo Ascomycota; Classe Dothideomycetes e Ordem

Botryosphaeriales (SCHOCH *et al.*, 2006). É composta por vários complexos de espécies crípticas, estando inseridos 17 gêneros e cerca de 110 espécies devidamente caracterizadas, tanto morfológicamente quanto molecularmente, por meio do sequenciamento gênico multilocus de DNA (PHILLIPS *et al.*, 2013). Os gêneros que a compõe, são: *Lasioidipodia* spp., *Barriopsis* spp., *Botryosphaeria* spp., *Botryobambusa* spp., *Cophinforma* spp., *Diplodia* spp., *Dothiorella* spp., *Neodeightonia* spp., *Macrophomina* spp., *Phaeobotryon* spp., *Sphaeropsis* spp., *Tiarosporella* spp., *Neoscytalidium* spp., *Neofusicoccum* spp., *Spencermartinsia* spp., *Endomelanconiopsis* spp., *Pseudofusicoccum* spp. (PHILLIPS *et al.* 2013).

No entanto, até se chegar a esta classificação, essa família passou por inúmeras mudanças desde sua introdução, no início do século XX, quando era alocada na sub-família Pseudosphaeriaceae por THEISSEN & SYDOW (1918).

Tradicionalmente, membros das Botryosphaeriaceae foram identificados com base em características morfológicas de seus estágios assexuais e, ou, sexuais quando presente. Por ser o estágio sexual raramente encontrado na natureza, e seu estágio assexual altamente variável quando cultivado em diferentes meios de cultura artificiais, condições de cultivo e durante os estágios da vida desses fungos, tal caracterização foi o principal motivo para as grandes confusões e modificações ao longo da sua história taxonômica dos fungos desta família (CROUS *et al.*, 2006; SCHOCH *et al.*, 2006; PHILLIPS *et al.*, 2013). Dentre os principais caracteres de valor taxonômico dos fungos da família estão: a largura, o comprimento, a septação, a espessura da parede e coloração de conídios, paráfises e células conidiogênicas, bem como o formato de picnídios, quando identificados com base ao estágio assexuado; e o formato e dimensões de ascos e ascósporos quando identificados com base no estágio sexuado, formaram por muitos anos o conjunto de dados que embasaram a taxonomia dos mesmos (CROUS *et al.*, 2006; SCHOCH *et al.*, 2006; PHILLIPS *et al.* 2013). Em geral, esta família foi dividida em dois grandes grupos compostos por gêneros do tipo *Diplodia* com conídios pigmentados, paredes espessas de formatos ovóides a elipsóides, e gêneros do tipo *Fusicoccum* de conídios hialinos, de paredes finas e de formato elíptico a fusiforme ou clavado (DENMAN *et al.*, 2000).

Diante da plasticidade fenotípica que os membros da Botryosphaeriaceae possuem, estudiosos afirmam, que dados morfológicos sozinhos são insuficientes para uma classificação em nível de espécie, sugerindo sempre a presença de caracterização a

nível molecular, combinada a dados morfofisiológicos e patogênicos para sustentação desses dados, marcando o início de uma nova na classificação das Botryosphaeriaceae (BERBEE, 1996; DEANM *et al.*, 2000).

Com o advento de ferramentas de sequenciamento do DNA, foram fornecidos aos taxonomistas suporte para o verdadeiro reconhecimento dos membros dessa família, que os possibilitou o realocamento de gêneros e espécies filogeneticamente relacionados. Desde então novas espécies e gêneros foram identificados em associação com os mais diferentes hospedeiros, localizações geográficas e condições ambientais (SLIPPERS & WINGFIELD, 2007; SAKALIDIS *et al.*, 2013; PHILLIPS *et al.* 2013). Devido a isto, e por serem os principais causadores de doenças em frutíferas e muitas outras culturas nativas, exóticas e de importância econômica para países tropicais e subtropicais, desde o início do século XXI, a realização de pesquisas giram em torno da ocorrência, identificação e da caracterização desses fungos (SLIPPERS & WINGFIELD, 2007; JAMI *et al.*, 2012; SAKALIDIS *et al.*, 2013; PHILLIPS *et al.*, 2013)

Os fungos pertencentes a essa família já foram detectados em todas as áreas geográficas e climáticas do mundo, com exceção as regiões polares, possuindo a capacidade de infectar uma ampla gama de hospedeiros e conviver com os mesmos de forma endofítica, se tornando patogênico ou não, com hábitos saprofíticos ou necrotróficos, associados, sobretudo as espécies vegetais lenhosas, como também em plantas herbáceas (PHILLIPS *et al.*, 2013). Variações quanto à virulência e especificidade desses fungos, quanto ao hospedeiro e ao ambiente, ainda são uma incógnita que envolve a magnitude da expressão e incidência desses fungos na natureza (SAKALIDIS *et al.*, 2013).

Quanto à infecção e colonização por Botryosphaeriaceae em seus hospedeiros, na maioria dos casos, ocorrem por meio de ferimentos em folhas, caules ou ramos, mas também por aberturas naturais como lenticelas, estômatos e hidatódios de plantas saudáveis (SLIPPERS & WINGFIELD, 2007).

Na sua forma endofítica, enquanto latentes em plantas assintomáticas, esses fungos são uma ameaça significativa à agricultura e a ecossistemas florestais por serem capazes de conviver harmoniosamente com seus hospedeiros, passando despercebidos em medidas de quarentena e demonstrando sua capacidade patogênica, apenas sob condições de estresse (SLIPPERS & WINGFIELD, 2007). Ao contrário, também são considerados fonte de uma infinidade de metabólitos secundários com elevado potencial

biotecnológico (TAN & ZON, 2001) que podem ser empregados na agricultura, como agentes inseticida, fungicida, bactericida e herbicida (DAYAN *et al.*, 2009).

Em sua fase patogênica, podem agir como biotróficos e necrotróficos, também apresentando potencial saprofítico. São responsáveis por provocarem um quadro sintomático envolvendo desde a morte descendente e seca de ramos, e a exsudação de resinose pelos hospedeiros, provocando lesões necróticas e cancos em ramos, caules e tubérculos, podendo levar a morte progressiva de plantas jovens, adultas e porta-enxertos; além de serem importantes patógenos de sementes e podridões pedunculares e de pós-colheita em frutos (CARDOSO *et al.*, 2006; MARQUES *et al.*, 2013a,b; NETTO *et al.*, 2014; ZHAI *et al.*, 2014).

3.3 Diversidade de Botryosphaeriaceae no Brasil

Dos gêneros de Botryosphaeriaceae, citados anteriormente, os de maior expressão mundial na agricultura, são: *Lasiodiplodia* Ellis & Everh, 1896; *Diplodia* Fr.; *Botryosphaeria* Ces. & De Not.1877; *Neofusicoccum* Crous Slippers & A.J.L. Phillips 2006; *Neoscytalidium* Crous & Slippers, 2006; *Pseudofusicoccum* Mohali, Slippers & Wingf; tanto pelo números de espécies crípticas, como pela constante ocorrência e disseminação nos mais diferentes patossistemas (SLIPPERS & WINGFIELD, 2007; SAKALIDIS *et al.*, 2011; SAKALIDIS *et al.*, 2013). Apenas no ano de 2016, na base de dados Scopus já foram publicados cerca de onze trabalhos envolvendo a investigação quanto à diversidade e caracterização de Botryosphaeriacea.

No Brasil, os gêneros *Botryosphaeria* sp., *Lasiodiplodia* sp., *Neofusicoccum* sp., *Neoscytalidium* sp., *Macrophomina* sp. e *Pseudofusicoccum* sp. já foram filogeneticamente identificados e associados tanto a fruteiras tropicais quanto a outras plantas cultivadas (Tabela 1). Logo, considerando a importância e diversidade que a família possui, associada a evidente predisposição climática e agrícola do Brasil, trabalhos envolvendo a caracterização molecular, biológica e epidemiológica desses fungos ainda são poucos, porém, estão em ascensão.

Descrito por Cesati & De Notaris (1863) o gênero *Botryosphaeria* Ces. & De Not, cuja espécie tipo é *B. dothidea* (Moug.: Fr.) Ces. & De Not., ao longo de sua história já passou por várias revisões taxonômicas (DANMAN *et al.*, 2000; PHILLIPS *et al.*, 2005, CROUS *et al.*, 2006). De acordo com sua última revisão filogenética, o gênero conta

com uma gama de sete espécies (*B. fabicerciana*, *B. fusispora*, *B.corticis*, *B.dothidea*, *B.scharifii*, *B.ramosa*, *B.agaves*) (PHILLIPS *et al.*, 2013) onde apenas *B. dothidea*, *B. mamane*, *B. fabicercianum* foram relatadas em mangueiras no Brasil (Marques *et al.*, 2013b) (Tabela 1). Morfológicamente semelhantes, suas espécies são dificilmente identificadas por tais caracteres, variando basicamente em diferenças entre as dimensões de seus ascósporos ou conídios. Esses se apresentam hialinos quando jovens, se tornando mais escuros com o tempo, parede fina e de formato elíptico variando entre fusiforme a clavado (PHILLIPS *et al.*, 2013; CROUS *et al.*, 2006).

Tabela 1 - Espécies de Botryosphaeriaceae isoladas de hospedeiros localizados em território brasileiro e identificadas por sequenciamento gênico.

Hospedeiro	Autores	Espécies	Região sequenciada	Localização
Abacateiro	Firmino <i>et al.</i> , (2016)	<i>N. parvum</i> , <i>B. aesculi</i>	ITS	SP
Coqueiro	Rosado <i>et al.</i> (2016)	<i>L. brasiliense</i> , <i>L. egyptiaca</i> , <i>L. pseudotheobromae</i> , <i>L. theobromae</i>	ITS; TEF1- α ; Bt	MG, BA, CE, PB
Goiabeira	Nogueira <i>et al.</i> , (2015)	<i>B. dothidea</i> , <i>N. parvum</i> , <i>N. ribis</i>	ITS; TEF1- α ; Bt	SP
Mangueira	Costa <i>et al.</i> , (2010)	<i>L. theobromae</i>	ITS	PE, BA, RN
	Marques <i>et al.</i> , (2013a)	<i>L. theobromae</i> ; <i>L. pseudotheobromae</i> , <i>L. iraniensis</i> , <i>L. hormozganensis</i> , <i>L. egyptiaca</i> , <i>L. crassispora</i>	ITS; TEF1- α	PE, BA, RN
	Marques <i>et al.</i> , (2013b)	<i>B. dothidea</i> , <i>B. mamane</i> , <i>B. fabricianum</i> , <i>N. parvum</i> , <i>N. brasiliense</i> sp. nov., <i>Ne. hyalinum</i> , <i>P. stromaticum</i> , <i>B. dothidea</i> , <i>P. stromaticum</i>	ITS; TEF1- α ; Bt	PE, BA
	Correia <i>et al.</i> (2015)	<i>L. brasiliense</i> sp.nov., <i>L. crassispora</i> , <i>L. egyptiaca</i> , <i>L. euphorbicola</i> , <i>L. hormozganensis</i> , <i>L. jatrofiphicola</i> , <i>L. pseudotheobromae</i> , <i>L. theobromae</i>	ITS; TEF1- α ;	BA, PE.
Mamoeiro	Netto <i>et al.</i> , (2014)	<i>L. theobromae</i> , <i>L. brasiliense</i> , <i>L. pseudotheobromae</i> , <i>L. marypalme</i> = <i>euphorbicola</i> , <i>L. hormozganensis</i>	ITS; TEF1- α ;	BA, CE, RN, PE, PB
Mandioca	Machado <i>et al.</i> , (2014a)	<i>L. theobromae</i> , <i>L. pseudotheobromae</i> , <i>L. euphorbicola</i> , <i>Ne. hialinum</i>	ITS; TEF1- α ; Bt	MA, PB
Pinhão manso	Machado <i>et al.</i> , (2014b)	<i>L. theobromae</i> , <i>L. pseudotheobromae</i> , <i>L. jatrofiphicola</i> sp.nov., <i>L. subglobosa</i> sp.nov., <i>L. macrospora</i> sp.nov., <i>L. egyptiaca</i> , <i>Ne. hialinum</i> , <i>Macrophomina phaseolina</i>	ITS; TEF1- α ; Bt	MG, ES
Plantas da caatinga	Gonçalves <i>et al.</i> , (2015)	<i>B. mamane</i> , <i>L. gonubiensis</i> , <i>L. theobromae</i> , espécies do complexo <i>Neofusicoccum parvum/ribis</i> , <i>P. adansoniae</i> , <i>P. stromaticum</i>	ITS	CE
Videira	Correia <i>et al.</i> , (2013)	<i>L. pseudotheobromae</i> , <i>L. theobromae</i> , <i>L. crassispora</i> , <i>L. parva</i>	TEF1- α	BA, RN, PE, PB

Abreviações: BA: Bahia; CE: Ceará; ES: Espírito Santo; MA: Maranhão; PE: Pernambuco; PB: Paraíba; RN: Rio Grande do Norte; SP: São Paulo; sp. nov.: espécie nova.

O gênero *Lasiodiplodia*, introduzido por Ellis & Everh em 1896, possui como espécie tipo *Lasiodiplodia theobromae* sensu lato (Pat.) Griffin & Maublanc, 1909, é amplamente distribuído em regiões de clima tropicais e subtropicais, sendo o gênero mais relatado (PHILLIPS *et al.*, 2013). Apresentam conídios do tipo diplóide, de formato ovóide, com coloração hialina e asseptados quando imaturo se tornando marrons, septados e com estrias longitudinais, quando maduros. Até 2004, essa era a única espécie filogeneticamente associada ao gênero, no entanto, por meio do sequenciamento multiloculos de DNA, mais 26 espécies crípticas já foram molecularmente caracterizadas e registradas no Mycobank (ROSADO *et al.*, 2016). Essas espécies apresentam, além de diferenças morfológicas quanto a dimensões de conídios, paráfises e células conidiogênicas, diferenças de nucleotídeos nas regiões gênicas do seu DNA, sendo estas características as que realmente delimitam os limites entre espécies (PHILLIPS *et al.*, 2013).

Dentre as espécies de *Lasiodiplodia* já identificadas, 14 já foram relatadas no território brasileiro, em associação com o declínio, a morte descendente de ramos e podridão peduncular, em frutos de mangueira (COSTA *et al.*, 2010; MARQUES *et al.*, 2013a), morte descendente ramos em videira (CORREIA *et al.*, 2016), cajueiro e outras frutíferas tropicais (COUTINHO *et al.*, 2016), podridão peduncular em mamoeiro (Netto *et al.*, 2014) e coqueiro (ROSADO *et al.*, 2016) e a podridão do colo e radicular em pinhão manso (MACHADO *et al.*, 2014a) e mandioca (MACHADO *et al.*, 2014b). Sete dessas espécies foram descritas no Brasil: *L. brasiliense* (NETTO *et al.*, 2014), *L. marypalme* (= *L. euphorbicola*), *L. jatrophiicola*, *L. subglobosa*, *L. macrospora* (MACHADO *et al.*, 2014a) o que nos indica a grande diversidade fúngica presente na nossa região.

Os gêneros *Neofusicoccum* spp., *Neoscytalidium* spp., e *Pseudofusicoccum* spp. foram introduzidos recentemente e delineados filogeneticamente a partir de linhagens de *Botryosphaeria* e anamorfose de *Fusicoccum* (CROUS *et al.*, 2006).

O gênero *Neofusicoccum* conta com 23 espécies, descritas a partir do ano 2009 (PAVLIC *et al.*, 2009b; BEGOUDE *et al.*, 2010; SAKALIDIS *et al.*, 2011; PHILLIPS *et al.*, 2013; BERRAF-TEBBAL *et al.* 2014). Suas espécies são amplamente distribuídas, com destaque para *N. parvum* (espécie tipo) e *N. ribis* (SAKALIDIS *et al.*, 2013). Com base em marcadores moleculares microssatélites sugere-se que há duas principais rotas de intercâmbio nessa distribuição, primeiramente entre África do Sul,

Chile e Colômbia e, em segundo lugar, entre Austrália, China, Indonésia, Hawaii e Nova Zelândia (SAKALIDIS *et al.*, 2013). Morfológicamente semelhantes *Neofusicoccum* e *Botryosphaeria* dificilmente são identificados com base em caracteres morfológicos, tornando à distinção de suas espécies uma tarefa difícil, sendo indispensável o uso de técnicas moleculares para estes fins (SAKALIDIS *et al.*, 2013). No Brasil, já foram relatadas algumas espécies de *Neofusicoccum* causando cancro, morte decente e podridão peduncular em plantas de abacateiro (FIRMINO *et al.*, 2016), videira (CORRERIA *et al.*, 2016), em diversas espécies arbóreas da caatinga cearense (GONÇALVES *et al.*, 2016), de goiabeira (NOGUEIRA *et al.*, 2016) e mangueira (MARQUES *et al.*, 2013b) (Tabela 1).

O gênero *Neoscytalidium*, possui apenas duas espécies, *Ne. hialinum* e *Ne.novaehollandiae*, em associação com hospedeiros tanto de países tropicais como de países em zonas temperadas (CROUS *et al.*, 2006; PHILLIPS *et al.*, 2013). Apenas *Ne. hialinum* (= *Ne. dimidiatum*) tem sido relatado no Brasil, já relatado em associação com mangueira (MARQUES *et al.*, 2013b) e pinhão manso (MACHADO *et al.*, 2014a). Quanto à morfologia, esse gênero apresenta conídios de coloração inicialmente hialina se tornando marrom pálido com o tempo, com parede fina e formato cilíndrico a fusiforme (PHILLIPS *et al.*, 2013). Embora as diferenças morfológicas e filogenéticas entre as espécies sejam mínimas *Ne. novaehollandiae* apresentam conídios muriformes (com paredes espessas e escuras) semelhantes à *Dichomera*, o que não deixam dúvidas quanto a sua diferenciação entre *Ne. hialinum*, o classificando como uma nova espécie (PAVILIC *et al.*, 2008).

Quanto ao gênero *Pseudofusicoccum*, esse foi circunscrito para englobar espécies morfológicamente semelhantes à *Fusicoccum* e *Neofusicoccum*, mas filogeneticamente distintos de ambos os gêneros (CROUS *et al.*, 2006). Descrito originalmente pela espécie tipo *P. stromaticum*, hoje possuem mais seis espécies descritas (*P. violaceum* *P. adansoniae* *P. kimberleyense* *P. stromaticum* *P. olivaceum* *P. ardesiacum*) que se distinguem principalmente pelas dimensões de seus conídios e pela produção de pigmentos em cultura (PHILLIPS *et al.*, 2013). Identificado pela primeira vez em plantas assintomáticas de acacia e eucalyptus, na Venezuela, espécies desse gênero são consideradas restritas a regiões tropicais e subtropicais e por ocorrer, principalmente, como endofíticas (PHILLIPS *et al.*, 2013). Corroborando com esta afirmação recentemente esse gênero foi relatado em espécies arbóreas da caatinga cearense como

endofítico, porém mostrando-se patogênico quando inoculados em frutos de manga e plantas de umbu-cajá (*Spondia* sp.) (GONÇALVES *et al.*, 2016), sendo anteriormente já relatado no Brasil associado a cancos e a morte descendente em plantas de mangueira (MARQUES *et al.*, 2013b). Tais relatos evidenciam a versatilidade epidemiológica do gênero, sendo esta uma característica típica das Botryosphaeriaceae.

3.4 Caracterização de Botryosphaeriaceae

A família Botryosphaeriaceae é constituída por complexos de espécies crípticas, ou seja, indivíduos morfológicamente idênticos ou parecidos, mas que apresentam trajetória evolutiva e reprodutiva total ou parcialmente distintas (BICKFORD *et al.*, 2006).

Por esse motivo, a caracterização morfológica desses organismos tornou-se uma tarefa subjetiva, que levou a confusões taxonômicas durante anos e a subestimação da biodiversidade em torno dos indivíduos dessa família, tornando a identificação a nível de DNA a opção mais viável para esse objetivo.

Como já mencionado anteriormente, atualmente o método de caracterização mais utilizado para delimitar a filogenia entre espécies da família Botryosphaeriaceae é o molecular, por meio do sequenciamento gênico de regiões do DNA (DEANMAN *et al.*, 2000; PHILLIPS *et al.*, 2013; SLIPPERS *et al.*, 2014). No entanto, para a delimitação de uma filogenia fidedigna desses microorganismos bem como a descrição de novas espécies, devem atender as regras do Código Internacional de Nomenclatura para algas, fungos e plantas (ICN). As regras que regem o ICN são o uso conjunto de caracteres morfológicos, biológicos, ecológicos e patogênicos, que visam o embasamento do desenvolvimento dos microorganismos e das hipóteses evolucionária pré-ditas por dados moleculares (DEANMAN *et al.*, 2000; WILL & RUBINOFF, 2004; PHILLIPS *et al.*, 2013; SLIPPERS *et al.*, 2014).

Compreender a biologia de Botryosphaeriaceas se faz uma tarefa antiga e já esmiuçada por vários autores ao longo da história desses microrganismos (THEISSEN & SYDOW, 1918; von ARX & MÜLLER 1954, 1975) e estando em constante revisão (DEANMAN *et al.*, 2000; PHILLIPS *et al.*, 2013; SLIPPERS *et al.*, 2014).

Como para a maioria de outros organismos, o conceito de espécie morfológica foi predominantemente utilizado para identificar e descrever novas espécies de

Botryosphaeriaceae, assim como o conceito de espécie ecológica, centrando-se na especialização de hospedeiro (SLIPPERS & WINGFIELD, 2007).

Tradicionalmente, desde os relatos mais remotos, a diferenciação desses fungos foi feita exclusivamente com base na morfologia de seus ascóporos (fase teleomorfa) (von ARX & MÜLLER 1954, 1975) e, posteriormente, com base em seus conídios (fase anamorfa), e pela associação com hospedeiros e distribuição geográfica (CROUS *et al.*, 2006, PHILLIPS *et al.*, 2008). No entanto, com o avanço dos estudos, percebeu-se que caracteres da fase teleomorfa mostraram-se bastante variáveis, dentro da mesma espécie, e de pouco valor para a distinção entre espécies (década de 50). Por esses motivos, a partir da década de 60, apenas os caracteres morfológicos dos anamorfos passaram a ser utilizados para este fim, por serem altamente encontrados na natureza e induzidos em meios de cultura artificiais (DENMAN *et al.*, 2000).

Dentre os caracteres observados para a caracterização biológica de Botryosphaeriaceae os mais observados são a calorimetria micelial das colônias, a taxa e crescimento e esporulação em diferentes temperaturas, meios de cultura e luminosidade, bem como a produção de pigmentos e as dimensões conidiais (SLIPPERS *et al.*, 2004a,b; PEREIRA *et al.*, 2006; SLIPPERS & WINGFIELD, 2007; LIMA *et al.*, 2013;). A patogenicidade a diversos hospedeiros também é de suma importância, uma vez que permite a caracterização de indivíduos mais ou menos agressivos e hospedeiros mais ou menos resistentes (PEREIRA *et al.*, 2006; LIMA *et al.*, 2013).

Tradicionalmente, para fins de esporulação e crescimento micelial, fungos dessa família são caracterizados respectivamente em meio ágar água (AA) contendo folhas de álamo ou de pinheiro autocladadas sob sua superfície, e em batata dextrose ágar (BDA) (PHILLIPS *et al.* 2013). No entanto, existem espécies que não alcançam a esporulação em determinados meios de cultura artificiais ou condições de crescimento, a exemplo de *N. brasiliense*, que pela ausência de esporulação foi descrito apenas por dados moleculares (MARQUES *et al.*, 2013b). Em diferentes faixas de temperatura, algumas espécies são capazes de crescer ou não, produzir ou não pigmentos, a exemplo de *L. parva* e *L. pseudotheobromae* que produziram pigmento quando exportos a 35 °C e crescimento a 10 °C se diferenciando de *L. theobromae* (ALVES *et al.*, 2008). Ao estudar diferentes isolados de *L. theobromae*, esses mostraram-se altamente variáveis quanto a suas características biológicas, variando tanto em esporulação em diferentes meios de cultura quanto em patogenicidade (PEREIRA *et al.*, 2006; LIMA *et al.*, 2013).

Assim, informações biológicas a cerca de isolados fúngicos mostram-se úteis tanto na delimitação e identificação prévia de táxons de Botryosphaeriaceae morfologicamente semelhantes, bem como para a compreensão quando a distribuição e ecologia dos fungos dessa família. Entretanto, mostram-se altamente variáveis a depender das condições estudadas, corroborando com o caráter cosmopolita e polífago que possuem (PEREIRA *et al.*, 2006; LIMA *et al.*, 2013). Devido a isto, caracteres biológicos sozinhos são considerados de valor limitado, devido à plasticidade e a sobreposição de características entre algumas espécies ou variação de características entre os isolados da mesma espécie (ABDOLLAHZADEH *et al.*, 2010; MARQUES *et al.*, 2013a), fazendo-se indispensável a combinação de dados de sequências de DNA para a inferência filogenética dos mesmos (SLIPPERS *et al.*, 2004a,b; PAVLIC *et al.*, 2009a,b, SAKALIDIS *et al.*, 2011, 2013; PHILLIPS *et al.*, 2013).

3.4.1 Caracterização molecular de Botryosphaeriaceae

Permeada por uma longa história, a descoberta da molécula de DNA, iniciada em meados do século XIX, foi envolta, desde então, por uma longa sequência de acontecimentos (ARIAS, 2004). De uma forma geral e exclusivamente voltada para o subitem em questão, dentre esses acontecimentos, destacamos a descoberta da extração de DNA purificado por Rudolf Signer, em 1950, a elucidação da estrutura do DNA por Watson e Crick em 1953 e a técnica da Reação em Cadeira da Polimerase (PCR) por Kary Mullis em 1983.

Assim, desde o desenvolvimento da PCR, diversos marcadores moleculares foram desenvolvidos em busca da caracterização genética de microorganismos e do diagnósticos fidedignos dos mesmos. Dentre esses, podemos citar: o AFLP ‘Amplified fragment length polymorphism’, ISSR ‘Inter Simple Sequence Repeats’, RAPD ‘random amplified polymorphic DNA’, destacando-se dentre estes o uso de primers específicos utilizados pela técnica de sequenciamento gênico.

A técnica de sequenciamento gênico se destaca devido ao uso de marcadores específicos para um determinado grupo de microrcanismos, possibilitando com isso a determinação precisa da ordem de seus nucleotídeos em sequências de DNA, sendo possível através de técnicas de bioinformáticas, a comparação destas seqências com outras já depositadas em banco de dados.

Nos últimos 20 anos, vários dados moleculares com base no mapeamento do DNA têm sido utilizados para distinguir taxons de Botryosphaeriaceae (SLIPPERS & WINGFIELD, 2007), estando este fato diretamente atrelado aos avanços tecnológicos na técnica de sequenciamento de DNA e no desenvolvimento de softwares que possibilitem o armazenamento, compartilhamento e a comparação de banco de dados e da redução dos custos na execução dessas técnicas (SLIPPERS *et al.*, 2014). A junção desses acontecimentos surge na fitopatologia como uma ferramenta a cada dia mais acessível, eficaz e ágil para o estabelecimento de sistemas taxonômicos uniformes e para o diagnóstico preciso de doenças (WINGFIELD *et al.*, 2012).

No sequenciamento gênico de Botryosphaeriaceae são utilizados marcadores moleculares capazes de mapear regiões específicas do DNA e por possuírem alto valor filogenético. Para este fim, genes de algumas regiões são bastante utilizadas e comprovadamente eficazes na delimitação filogenética de Botryosphaeriaceae tais como: o DNA ribossomal (rDNA), considerada como região universal na identificação de eucariotos, englobando os genes 18S, 5.8S, 28S e as regiões dos espaços internos transcritos (ITS); a segunda maior subunidade da RNA polimerase II (RPB2); e regiões codificadoras de proteínas, como o fator de alongamento da tradução 1 alfa (TEF1- α) e a região da β -tubulina (β t) (PHILLIPS *et al.*, 2013).

Estudos apontam que dependendo do complexo de espécies investigado, para a obtenção de uma análise filogenética robusta se faz necessário a combinação de sequências de pelo menos duas regiões gênicas, nas quais as regiões ITS, TEF1- α e β t são as mais indicadas para Botryosphaeriaceae (PHILLIPS *et al.*, 2013, MARQUES *et al.*, 2013; SLIPPERS *et al.*, 2014; MACHADO *et al.*, 2014; ROSADO *et al.*, 2016).

Considerada a precursora na identificação molecular de fungos, a região ITS se encontra localizada entre os genes 18S e 28S do DNA ribossomal desses organismos, sendo constituída pelas porções denominadas ITS1, ITS2, ITS3 e ITS4, todo o gene 5.8S, envolvida na transcrição e ampliação do DNA (WHITE, 1990). Em 2004, essa região sozinha foi utilizada para delimitar a nova espécie *L. gonubiensis*, a partir de isolados tidos como *L. theobromae*, os quais também se diferenciaram por possuir conídios mais largos e multiseptados (PAVILIC *et al.*, 2004). Até então, esta região era considerada suficiente para designar membros *Botryosphaeria* (DENMAN *et al.*, 2000; SMITH *et al.*, 2001; PHILLIPS *et al.*, 2002; DENMAN *et al.*, 2003), no entanto, nesse mesmo ano, em um estudo mais abrangente, a mesma foi insuficiente para a especiação

do gênero *Botryosphaeria*, sendo necessária a inclusão de sequências das regiões TEF1- α e β t para a descrição da espécie denominada *B. australis* a partir de *B. lutea* (SLIPPERS *et al.*, 2004a).

Em 2006, novas espécies de *Lasiodiplodia* (*L. venezuelensis*, *L. crassispora* e *L. rubropurpurea*) foram descritas por meio do sequenciamento combinado das regiões ITS e TEF1- α , e sustentadas por diferenciações morfológicas de conídios (BURGESS *et al.*, 2006). Nesse mesmo ano, por meio da análise combinada de quatro loci gênicos de 96 isolados da classe Dothideomycetes, sendo eles os genes da menor subunidade nuclear do rDNA (nuc SSU), da maior subunidade nuclear do rDNA (nuc LSU), do TEF-1 α e da RPB2, foi possível visualizar as diferenças gênicas entre os mesmos sendo designada a ordem Botryosphaeriales para acomodar espécies tipo de *B. dothidea*, acomodando uma única família, denominada Botryosphaeriaceae (SCHOCH *et al.*, 2006).

Em relação às regiões codificadoras de proteínas, aqui representadas pelo TEF1- α e β t, caracterizam-se por serem fortemente conservadas e abundantes que desempenham papéis cruciais no desenvolvimento dos organismos (O'DONNELL *et al.*, 1998). O TEF1- α é uma proteína envolvidas nos processos de iniciação, alongamento e tradução do DNA (KEELING & INAGAKI, 2004) e a β -tubulina a proteína envolvida na formação dos microtubulos essenciais para a divisão celular (GLASS & DONALDSON, 1995; EINAX & VOIGT, 2003).

Mesmo diante da grande confiabilidade depositada em dados moleculares para a descrição de novas espécies, poucos estudos filogenéticos trazem explícitos em seus resultados à localização exata e a quantificação das diferenças nucleotídicas existentes entre regiões gênicas das novas espécies e das espécies filogeneticamente relacionadas às mesmas. Diante disso, julgo que tais verificações se fazem necessárias, informando o real polimorfismo entre esses indivíduos dando mais consistência a hipótese taxonômica levantada.

Nesse sentido, dentro do complexo *Lasiodiplodia*, revela-se que separação filogenética desses organismos é efetivamente baseado em diferenças na região de um único gene, o TEF-1 α , e nas dimensões de seus conídios, sendo prudente, mediante aparecimento de mais espécies, incluir outras regiões genéticas as análises a fim de reforçar essa diferenciação (DAMM *et al.*, 2007; ABDOLLAHZADEH *et al.*, 2010). Dentro do gênero *Neofusicoccum*, diferenças entre cinco nucleotídeos na região ITS,

dois na região TEF1- α e dez na região β t foram suficientes para designar *N. brasiliense* como uma nova espécie (MARQUES *et al.*, 2013b); e isolados de *Dothiorella brevicollis* e *Dothiorella longicollis* foram filogeneticamente diferentes em cinco nucleotídeos das regiões ITS e TEF1- α e em dois na região β t (JAMI *et al.*, 2012).

Diante disso, percebe-se que a busca pela identificação e inferências filogenéticas de novas espécies visam, além da caracterização fidedigna à detenção de informações que subsidiem futuras investigações quanto à caracterização epidemiológica das doenças provocadas por esses microrganismos e o manejo mais adequado para as mesmas.

3.5 Controle de Botryosphaeriaceae

Diante das mudanças na taxonomia das Botryosphaeriaceae e da descrição de várias novas espécies, desde o ano de 2004, ainda são poucos os trabalhos que tem como objetivo o estudo da epidemiologia e do controle desses patógenos. No entanto, em geral sabe-se que fungos da família Botryosphaeriaceae são altamente difíceis de serem controlados em razão de seus hábitos ecológicos, por serem capazes de infectar uma ampla gama de hospedeiros e por sua capacidade endofítica (PERREIRA *et al.*, 2006; SLIPPERS & WINGFIELD, 2007; LIMA *et al.*, 2013).

Dentre os trabalhos existentes nesse sentido e nos últimos dez anos, há uma grande concentração de pesquisas voltadas, principalmente, para o controle de *L. theobromae* (FREIRE *et al.*, 2009; PERREIRA *et al.*, 2012; MARKSON *et al.*, 2012; DURGADEVI *et al.*, 2014; REHMAN *et al.*, 2015), e alguns poucos voltados para o controle de outras Botryosphaeriaceae, como *Diplodia*, *Neofusicoccum* e *Botryosphaeria* (PITT *et al.*, 2012; TORRES *et al.*, 2013). No entanto, percebe-se que os esforços nesse sentido ainda são incipientes quando comparamos com a explosão de novas espécies ultimamente identificadas.

O controle químico ainda é o método mais utilizado, porém sabe-se que diante das características biológicas e ecológicas dos fungos pertencentes a essa família, o uso de químicos se fazem ineficazes e, muitas vezes, impossíveis e invalidados pelos riscos ambientais que podem trazer (SLIPPERS & WINGFIELD, 2007). Outras limitações ao uso desse método é a inexistência de produtos registrados para a maioria das culturas acometidas (AGROFIT, 2016), a perda da eficácia, o acúmulo de resíduos na superfície de folhas e frutos, e o desenvolvimento de resistência dos patógenos com o tempo de

uso irracional ou de forma isolada (PERREIRA *et al.*, 2012). Com isso, o mais apropriado é a adoção de medidas adicionais ao uso racional de químicos sistêmicos e protetores, que visem principalmente à prevenção e a entrada desses fungos no campo, dentre essas: o uso de práticas culturais, produtos naturais, agentes biológicos e o uso de cultivares resistentes, visando o controle genético dessas doenças.

Embora sejam poucos os produtos registrados para esses patógenos, vários químicos são testados no intuito de se alcançar o controle dessas Botryosphaeriaceae. Uma população de isolados de *L. theobromae* associados a pomares de mamoeiro mostrou-se pouco sensíveis ao tratamento com fungicidas benomyl, thiabendazole, imazalil, prochloraz, tebuconazole (PERREIRA *et al.*, 2012). Já os produtos tebuconazole, miclobutanil, prochloraz e epoxiconazole apresentam atividade *in vitro* contra *D. mutila*, *D. seriata*, *N. australe* e *N. parvum* e foram capazes impedir a germinação de conídios e inibir o crescimento micelial (TORRES *et al.*, 2013).

Quanto à junção de práticas para evitar problemas fitossanitários com Botryosphaeriaceae em pomares e jardins clonais de frutíferas recomenda-se plantas vigorosas, bem nutridas e sem sintomas aparentes de ataques de pragas e outros patógenos, bem como a pulverização com o fungicida thiabendazole, com o intuito de proteger feridas de podas e práticas como a enxertia (FREIRE *et al.*, 2009). O uso de variedades resistentes visando o controle genético desses fungos surge como uma alternativa limpa, sustentável e de maior durabilidade (CARDOSO *et al.*, 2010; BATISTA *et al.*, 2012). A variabilidade quanto à reação de genótipos à doença pressupõe o uso da resistência da genética do cajueiro (CARDOSO *et al.*, 2006) e em diferentes acessos de mangueira (BATISTA *et al.*, 2012), como alternativa ao manejo de Botryosphaeriaceae.

Diante do exposto, percebe-se que, mediante a ampla diversidade biológica, genética, ecológica e patogênica que esses fungos detêm, muitas lacunas ainda estão abertas no tocante caracterização e controle desses microrganismos. Chamando atenção, principalmente para as pesquisas brasileiras, que ainda são poucas mediante a diversidade de biomas que o país possui. Tal diversidade ainda pouco explorada traz consigo fortes indícios de possíveis novas espécies e relações filogenéticas existentes dentro dessa rica família de fungos chamada Botryosphaeriaceae.

4 REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHZADEH, J., JVADI, A., MOHAMMADI-GOLTAPPEH, E., ZARE, R., PHILLIPS, A.J.L. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. **Persoonia**, v.25, p.1–10, 2010.
- AGROFIT – SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS. Disponível: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em 18 de maio de 2016.
- ALVES, A., CROUS, P.W., CORREIA, A., PHILLIPS, A.J.L. Morphological and molecular data reveal cryptic species in *Lasiodiplodia theobromae*. **Fungal Diversity**, v.28, p.1–13, 2008.
- ARIAS, G. Em 1953 foi descoberta a estrutura do DNA Etapas de um grande avanço científico. **Embrapa tripo**, Documentos on line, 2004. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do44.pdf. Acesso: 05 de junho de 2016.
- ARX, J.A VON, MÜLLER, E.D. Gattungen der amerosporen Pyrenomyceten. **Beiträge zur Kryptogamenflora der Schweiz**, v.11, n.1, p.1–434, 1954.
- ARX, J.A VON, MÜLLER, E. A re-evaluation of the bitunicate ascomycetes with keys to families and genera. **Studies in Mycology**, v.9, p.1–159, 1975.
- BATISTA, D.C., NETO, F.P.L., BARBOSA, J.S, AMORIM, C.C., BARBOSA, M.A.G. Avaliação da resistência de 47 acessos de mangueira aos fungos *Fusicoccum aesculis* e *Neofusicoccum parvum*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.34, n.3, p.823-831. 2012
- BEGOUDE, B.A.D., SLIPPERS, B., WINGFIELD, M.J., ROUX, J. Botryosphaeriaceae associated with *Terminalia catappa* in Cameroon, South Africa and Madagascar. **Mycological Progress**, v.9, p.101–23, 2010.
- BERRAF-TEBBAL, A., GUEREIRO, M.A., PHILLIPS, A.J.L. Phylogeny of *Neofusicoccum* species associated with grapevine trunk diseases in Algeria, with description of *Neofusicoccum algeriense* sp. nov. **Phytopathologia Mediterranea**, v.53, n.3, p.416–427, 2014.
- BICKFORD, D., LOHMAN, D.J., SODHI, N.S., NG, P.K.L., MEIER, R., WINKER, K, INGRAM, K.K., DAS, I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, v.22, n.3, p.148-155, 2006.
- BURGESS, T. I., BARBER, P. A., MOHALI, S., PEGG, G., BEER, W., WINGFIELD, M. J. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. **Mycologia**, New York, v. 98, n. 3, p. 423-435, 2006.
- CARDOSO, J.E., PAIVA, J.R., CAVALCANTI, J.J.V., SANTOS, A.A., VIDAL, J.C. Evaluation of resistance in dwarf cashew to gummosis in north-eastern Brazil. **Crop Protection**, v. 25, p. 855-859, 2006.

CARDOSO, J.E., BEZERRA, M.A., VIANA, F.M.P., SOUSA, T. R. M., CYSNE, A.Q., FARIAS, F.C. Ocorrência endofítica de *Lasiodiplodia theobromae* em tecidos de cajueiro e sua transmissão por propágulos. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.4, p.262-266, 2009.

CARDOSO, J.E., CYSNE, A.Q.; COSTA, J.V.T.A., VIANA, F.M.P. Método de avaliação da resistência de genótipos de cajueiro à resinose. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.4, p.329-333, 2010.

CESATI, V., NOTARIS, G. Schema di classificazione degli sferiacei italici aschigeri piu' o meno appartenenti al genere Sphaeria nell'antico significato attribuitogli da Persoon. **Commentario della Società Crittogamologica Italiana**, v.1, n.4, p.177-240, 1863.

CORREIA, K.C., SILVA, M.A., MORAIS JR, M.A., ARMENGOLD, J., PHILLIPS, A.J.L., CÂMARA, M.P.S., MICHEREFF, S.J. Phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of table grape in the main Brazilian exporting region. **Plant Pathology** 65, 92-103, 2016.

CRISÓSTOMO, L.A., NAUMOV, A. Adubando para alta produtividade e qualidade: fruteiras tropicais do Brasil. **Embrapa Agroindústria Tropical**, Fortaleza, 2009, 238 p.

COSTA, V.S.O., MICHEREFF, S.J., MARTINS, R.B., GAVA, C.AT., MIZUBUTI, E.S.G., CÂMARA, M.P.S. Species of Botryosphaeriaceae associated on mango in Brasil. **European Journal Plant Pathology**, v.127, p.509-519, 2010.

CROUS, P.W., SLIPPERS, B., WINGFIELD, M.J., RHEEDER, J., MARASAS, W.F.O., PHILLIPS, A.J.L., ALVES, A., BURGESS, T.I., BARBER, P.A., GROENEWALD, J.Z. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Studies in Mycology**, v. 55, p. 235-253, 2006.

DAMM, U., CROUS, P. W., FOURIE, P. H. Botryosphaeriaceae as potential pathogens of *Prunus* species in South Africa, with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. **Mycologia**, v. 99, n. 5, p. 664-680, 2007.

DENMAN, S., CROUS, P.W., TAYLOR, J.E., KANG, J.C., PASCOE, I., WINGFIELD, M.J. An overview of the taxonomic history of Botryosphaeria, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. **Studies in Mycology**, v.45, p.129-140, 2000.

DENMAN, S., CROUS, P.W., GROENEWALD, J.Z., SLIPPERS, B., WINGFIELD, B.D., WINGFIELD, M.J. Circumscription of Botryosphaeria species associated with Proteaceae based on morphology and DNA sequence data. **Mycologia**, v.95, n.2, p.294-307, 2003.

DURGADEVI, D., SANKARALINGAM, A., PRABHU, S. Impact of Fungicides and Biocontrol Agents in Managing Peduncle Blight of Tuberose Caused by *Lasiodiplodia*

theobromae (Pat.) Griffon and Maubl. **Plant Pathology Journal**, v.13, p.203-207, 2014.

EINAX, E., VOIGT, K. Oligonucleotide primers for the universal amplification of *B-tubulin* genes facilitate phylogenetic analyses in the regnum Fungi. *Organisms Diversity & Evolution*, n. 3, p.185–194, 2003.

FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>>. Acesso em: 10 mar. 2014.

FACHINELLO, J.C., PASA, M.S., SCHMTIZ, J.D., BETEMPS, D.L. situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, volume Especial, p. 109-120, 2011.

FREIRE, F.C.O. A resinose do cajueir. Embrapa Agroindústria Tropical, **Caju Informativo**, v.4, n.1, p:1–2, 1991.

FREIRE, F.C.O., CARDOSO, J.E. Doenças das *Spondias* – cajarana (*S. cytherea* Sonn.), cajazeira (*S. mombin* L.), ciriguela (*S. purpurea* L.), umbu (*S. tuberosa* A. Cam.) e umbuguela (*Spondias* spp.) no Brasil. **Agrotrópica**, v.9, n.2, p.75-82, 1997.

FREIRE, F.C.O., VIANA, F.M.P., CARDOSO, J.E., SANTOS, A.A. Novos Hospedeiros do Fungo *Lasiodiplodia theobromae* no Estado do Ceará. **Embrapa Agroindústria Tropical**. Comunicado técnico 91, 2004.

FREIRE, F.C.O., CAVALCANTI JR, A.T., MESQUITA, A.L.M. Problemas Fitossanitários em Mudanças Enxertadas de Cajueiro no Estado do Ceará. **Embrapa Agroindústria Tropical** Comunicado técnico, 152, 2009.

FREIRE, F.C.O., CARDOSO, J.E., VIANA, F.M.P., MARTINS, M.V.V. Status of *Lasiodiplodia theobromae* as a plant pathogen in Brasil. **Essentia**, v.12, p.53–71, 2011.

FIRMINO, A.C., FISCHER, I.H., TOZZE JÚNIOR, H.J., ROSA, D.D., FURTADO, E.L. Identification of *Fusicoccum* species causing rot in avocado fruits. **Summa Phytopathologica**, v.42, n.1, p.100-102, 2016.

IBGE – IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2016. Disponível: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp?t=2&z=t&o=11&u1=3&u2=3&u3=3&u4=1&u5=1&u6=1>. Acesso em: 20 de janeiro de 2016.

GONÇALVES, F.J.T., FREIRE, F.C.O., LIMA, J.S., MELO, J.G.M., CÂMARA, M.P.S. Patogenicidade de espécies de Botryosphaeriaceae endofíticas de plantas da Caatinga do estado do Ceará em manga e umbu-cajá. **Summa Phytopathol.**, v. 42, n. 1, p. 43-52, 2016.

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.

JAMI, F., SLIPPERS, B., WINGFIELD, M.J., GRYZENHOUT, M. Five new species of the Botryosphaeriaceae from *Acacia karroo* in South Africa. **Cryptogamie, Mycologie**, v.33, n.3, p.245-266, 2012.

LIMA, J.S., MOREIRA, R.C, CARDOSO, J.E., MARTINS, M.V.V., VIANA, F.M.P. Cultural, morphological and pathogenic characterization of *Lasiodiplodia theobromae* associated with tropical fruit plants. **Summa Phytopathologica**, v.39, p.81–8. 2013.

KEELING, P.J., INAGAKI, Y. A class of eukaryotic GTPase with a punctate distribution suggesting multiple functional replacements of translation elongation factor-1 alpha. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.101, p.15380-15385, 2004.

MARKSON, A.A., AMADIOHA, A.C., OMOSUN, G., MADUNAGU, B.E., UDO, S.E., UMANA, E J. Control of *Botryodiplodia theobromae* causing Tissue Rot of White Yam (*Dioscorea rotundata* Poir). **Scholarly Journal of Agricultural Science**, v.2, n.1, p. 1-7, 2012.

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., 2014a.

MACHADO, A.R., PINHO, D.B., OLIVEIRA, S.A.S., PEREIRA, O.L. New occurrences of Botryosphaeriaceae causing black root rot of cassava in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v.39, p.464-470, 2014b.

MARQUES, M.W., LIMA, N.B., MORAIS Jr M.A., BARBOSA, M.A.G., SOUZA, B.O., MICHEREFF, S.J., PHILLIPS, A.J.L., CAMARA, M.P.S. Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, v.61, p.181–193, 2013a.

MARQUES, M.W., LIMA, N.B., MORAIS JR, M.A., MICHEREFF, S.J., PHILLIPS, A.J.L., CÂMARA, M.P.S. *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* and *Pseudofusicoccum* species associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, v. 61, p.195- 208, 2013b.

NETTO, M.S.B., ASSUNÇÃO, I.P., LIMA, G.S.A. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brasil. **Fungal Diversity**, v.67, p.127–41, 2014.

O'DONNELL, K., KISTLER, H.C., CIGELNIK, E., PLOETZ, R.C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Applied Biological Science**, v.95, p.2044–2049, 1998.

PAVLIC, D., SLIPPERS, B., COUTINHO, T.A., GRYZENHOUT, M., WINGFIELD, M.J. *Lasiodiplodia gonubiensis* sp. nov., a new Botryosphaeria anamorph from native *Syzygium cordatum* in South Africa. **Studies in Mycology**, v.50, p.313–322, 2004.

PAVLIC, D., WINGFIELD, M.J., BARBER, P., SLIPPERS, B., HARDY, G.E.S.T.J, BURGESS, T.I. Seven new species of the *Botryosphaeriaceae* from baobab and other native trees in Western Australia. **Mycologia**, v.100, p.851–866, 2008.

PAVLIC, D., SLIPPERS B., COUTINHO, T.A., WINGFIELD, M.J. Molecular and phenotypic characterization of three phylogenetic species discovered within the *Neofusicoccum parvum/N. ribis* complex. **Mycologia**, v.101, p.636–647, 2009a.

PAVLIC, D., SLIPPERS, B., COUTINHO, T.A., WINGFIELD, M.J. Multiple gene genealogies and phenotypic data reveal cryptic species of the Botryosphaeriaceae: A case study on the *Neofusicoccum parvum/N. ribis* complex. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.51, p.259–268, 2009b.

PEREIRA, A.L., SILVA, G.S., RIBEIRO, V.Q. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.572–8, 2006.

PEREIRA, F.M., KAVATI, R. Contribuição da pesquisa científica brasileira no desenvolvimento de algumas frutíferas de clima subtropical. **Revista Brasileira de Fruticultura**, volume Especial, p.92-108, 2011.

PEREIRA, A.V.S., MARTINS, R.B., MICHEREFF, S.J., SILVA, M.B., CÂMARA, M.P.S. Sensitivity of *Lasiodiplodia theobromae* from Brazilian papaya orchards to MBC and DMI fungicides. **European Journal Plant Pathology**, v.132, p.489–498, 2012.

PITT, W. M., SOSNOWSKI, M. R., HUANG, R., QIU, Y., STEEL, C. C., AND SAVOCCHIA, S. Evaluation of fungicides for the management of Botryosphaeria canker of grapevines. **Plant Disease**. v.96, p.1303-1308. 2012

PHILLIPS, A. J. L., ALVES, A., CORREIA, A., LUQUE, J. Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. **Mycologia**, v.97, n.2, p. 513-529, 2005.

PHILLIPS, A.J.L., ALVES, A., ABDOLLAHZADEH, J., SLIPPERS, B., WINGFIELD, M.J., GROENEWALD, J.Z., CROUS, P.W. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. **Studies in Mycology**, v.76, p.51–167, 2013

REHMAN, A., UMAR, U.D., NAQVI, S.A.H., LATIF, M.R., KHAN, S.A., MALIK, M.T., FREED, S. Emerging resistance against different fungicides in *Lasiodiplodia theobromae* as the cause of mango dieback in Pakistan. **Archives of Biological Sciences**, v.67, n.1, p.241-249, 2015

ROSADO, A.W.C., MACHADO, A.R., FREIRE, F.C.O., PEREIRA, O.L. Phylogeny, identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia* associated with postharvest stem-end of coconut in Brazil. **Plant Disease**, v.100, n.3, p.561-568, 2016.

SAKALIDIS, M.L., RAY, J.D., LANOISELET, V., HARDY, G.E.S., BURGESS, T.I. Pathogenic Botryosphaeriaceae associated with *Mangifera indica* in the Kimberley Region of Western Australia. **European Journal of Plant Pathology**, v.130, p.379–91, 2011.

SAKALIDIS, M.L., SLIPPERS, B., WINGFIELD, B.D., HARDY, G.E.S., BURGESS, T.I. The challenge of understanding the origin, pathways and extent of fungal invasions: global populations of the *Neofusicoccum parvum*–*N. ribis* species Complex. **Diversity and Distributions**, v.19, p.873–883, 2013.

SCHOCH, C.L., SHOEMAKER, R.A., SEIFERT, K.A., HAMBLETON, S., SPATAFORA, J.W., CROUS, P.W. A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. **Mycologia**, v.98, p.1041–1052, 2006.

SLIPPERS, B., FOURIE, G., CROUS, P.W., COUTINHO, T.A., WINGFIELD, B.D., WINGFIELD, M.J. Multiple gene sequences delimit *Botryosphaeria australis* sp. nov. from *B. lútea*. **Mycologia**, v.96, n.5, p.1030–1041, 2004a.

SLIPPERS, B., CROUS, P. W., DENMAN, S., COUTINHO, T. A., WINGFIELD, B. D., WINGFIELD, M. J. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. **Mycologia**, New York, v. 96, n. 1, p. 83-101, 2004b.

SLIPPERS, B., WINGFIELD, M. J. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. **Fungal Biology Reviews**, v.21, n.2-3, p. 90-106, 2007.

SLIPPERS, B., ROUX, J., WINGFIELD, M.J., van DER WALT, F.J.J., JAMI, F., MEHL, J.W.M., MARAIS, G.J. Confronting the constraints of morphological taxonomy in the *Botryosphaeriales*. **Persoonia** 33, 155–168, 2014.

REETZ, E.R., KIST, B.B., SANTOS, C.E., CARVALHO, C., DRUM, M. Anuário Brasileiro de Fruticultura de 2014. Editora Gazeta, Santa Cruz, 2015, 104p.

THEISSEN F, SYDOW H. Vorentwürfe zu den Pseudosphaeriales. **Annales Mycologici** 16: 1–34, 1918.

TORRES, C., LATORRE, B. A., UNDURRAGA, P., BESOAIN, X. Evaluation of DMI fungicides against species of *Diplodia* and *Neofusicoccum* associated with Botryosphaeria canker of grapevine. **Ciencia e investigación agrarian**, v.40, n.1, p.131-138, 2013.

WINGFIELD, M.J., DE BEER, Z.W., SLIPPERS, B., WINGFIELD, B.D., GROENEWALD, J.Z., LOMBARD, L., CROUS, P.W. One fungus, one name promotes progressive plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v.13, p.604–613, 2012.

WILL, K.W., RUBINOFF, D. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. **Cladistics**, v.20, n.1, p.47–55, 2004.

ZAGATI, F.Q., BRAGA, D. O novo mapa hortifrutícola. **Hortifruti Brasil**, 2013. Disponível: <http://www.hfbrasil.org.br/br/revista/acessar/capa/o-novo-mapa-da-hortifruticultura.aspx>. Acesso em 20 de janeiro de 2016.

ZHAI, L., ZHANG, M., L.V, G., CHEN, X., JIA, N., HONG, N., WANG, G. Biological and molecular characterization of four *Botryosphaeria* species isolated from pear plants showing stem wart and stem canker in China. **Plant Disease**, v.98, p.716-726, 2014.

CAPÍTULO I

Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil²

²Artigo aceito, em junho de 2016, pela revista internacional Plant Pathology. Fator de impacto: 2.383. Qualis CAPES: A1.

Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil

I. B. L. Coutinho^{a*}, F. C. O. Freire^b, C. S. Lima^a, J. S. Lima^a, F. J. T. Gonçalves^c, A. R. Machado^d, A. M. S. Silva^e and J. E. Cardoso^b

^aDepartamento de Fitotecnia, Universidade Federal do Ceará, 60356-001 Fortaleza, Ceará; ^bEmbrapa Agroindústria Tropical, 60511-110 Fortaleza, Ceará; ^cDepartamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 50670-901 Recife, Pernambuco; ^dDepartamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-600. Recife, Pernambuco; and ^eDepartamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, Pernambuco, Brazil

*E-mail: ibernardodelima@gmail.com

Until now, only *Lasiodiplodia theobromae* has been reported in association with gummosis and dieback of cashew plants and other tropical fruit plants in northeastern Brazil. This study aims to identify and characterize species of *Lasiodiplodia* associated with gummosis and dieback on tropical fruit plants grown in Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí and Rio Grande do Norte States in northeastern Brazil with a description of two new species: *Lasiodiplodia caatinguensis* sp. nov. and *Lasiodiplodia pontae* sp. nov. Fungal identification was accomplished using a combination of morphophysiological and pathogenic characteristics, together with phylogenetic analyses based on partial translation elongation factor 1-a sequence (TEF1-a), internal transcribed spacer (ITS) and b-tubulin (b-tub). Six species of *Lasiodiplodia* were identified as being associated with several tropical fruit species: *Lasiodiplodia brasiliense* (*Manilkara zapota*, *Mangifera indica* and *Spondias purpurea*), *L. caatinguensis* sp. nov. (*Anacardium occidentale*, *Citrus sinensis*, *S. purpurea* and *S. lutea*), *L. euphorbicola* (*Annona muricata* and *Cocos nucifera*), *L. pontae* sp. nov. (*A. occidentale* and *S. purpurea*), *L. pseudotheobromae* (*A. occidentale*, *S. purpurea* and *Tamarindus indica*) and *L. theobromae* (*A. occidentale*, *S. purpurea* and *Talisia esculenta*). This is the first study to use molecular data of *Lasiodiplodia* taken from the stems and branches of *Annona* spp., *A. occidentale*, *M. zapota*, *T. indica*, *T. esculenta* and *Spondias* spp. After *L. caatinguensis* sp. nov., the species *L. pseudotheobromae* and *L. theobromae* were the second most frequent species. All identified species were able to cause necrotic lesions at different levels of severity when inoculated on mango fruits and young plants of *Annona* spp., cashew and *Spondias* spp.

Keywords: *Anacardium occidentale*, Botryosphaeriaceae, phylogeny, taxonomy

1 Introduction

An average of 800 million tonnes of fruit per year is produced around the world, and Brazil accounts for 5.7% of that production (FAO, 2014). Northeastern Brazil stands out in the international fruit industry due to its strategic geographic proximity to import markets, as well as extremely favourable soil and weather conditions for the production of fresh fruit (Cardoso & Sousa, 2000).

Among a variety of tropical fruit plants grown in northeastern Brazil, species of Anacardiaceae are very important for the regional economy, including Spondias spp. (*S. mombin*, *S. dulcis*, *S. purpurea* and *S. tuberosa*), cashew (*Anacardium occidentale*) and mango (*Mangifera indica*). The cashew nut and mango fruit production in the northeast region of Brazil represents 97.63% and 67.43% of national production (IBGE, 2015), respectively. Other fruits, such as sweetsop (*Annona squamosa*), atemoia (*Annona atemoya*) and soursop (*Annona muricata*), are also produced in this region in home backyards or in smallholder orchards; therefore, they do not officially appear in the statistics, but are of great socioeconomic importance for the region (Santos-Serejo *et al.*, 2009).

The native fruit crops of the northeast were initially cultivated in restricted and intercropped populations on the coast, the mountains and the Caatinga biome; over time, these crops gained economic and social interest and began to be grown in monocultures and on smallholder scales. Upon cropping, these plants have been subject to selection, which rendered them more susceptible to diseases and other pests that were previously regarded as having secondary importance in the region (Freire *et al.*, 2002). Among these diseases are those caused by the fungus *Lasiodiplodia theobromae* sensu lato, which was once considered a weak pathogen impacting stressed plants, but became one of the major pathogens affecting the survival and yield of tropical fruit plants in Brazil by causing symptoms such as stem cankers, gummosis, dieback, and postharvest fruit decay (Cardoso *et al.*, 2002; Freire *et al.*, 2011).

Lasiodiplodia theobromae has been described as a causal agent of cashew gummosis, which has become the most important disease impacting cashew orchards in the semi-arid conditions of northeastern Brazil. This disease causes damage of up to 30% stand losses in localized orchards in the states of Cear a and Piau ı (Cardoso *et al.*, 2002), infecting commercial genotypes of cashew trees (Mor-eira *et al.*, 2013) and causing nut decay (Freire, 2014). In Spondias, this

fungus has been reported affecting all cultivated species at different levels of disease severity, depending on host susceptibility (Lima *et al.*, 2013), and it is a seedborne pathogen of soursop (Cardoso *et al.*, 2006). In general, infection of *Lasiodiplodia* spp. is characterized by symptoms such as branch dieback, stem cankers, gum exudation, necrotic lesions, neck rot, seed and fruit decay, and foliage yellowing, which result from the obstruction of vascular tissues and ultimately lead to plant death (Burgess *et al.*, 2006; Damm *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2010; Freire *et al.*, 2011; Lima *et al.*, 2013; Marques *et al.*, 2013; Machado *et al.*, 2014a; Netto *et al.*, 2014).

Lasiodiplodia belongs to the Fungi kingdom, Ascomycota phylum, Dothideomycetes class, Botryosphaerales order and Botryosphaeriaceae family, which comprises 17 genera of fungi and 110 species that have been described based on cultural characteristics and phylogenetic data (Phillips *et al.*, 2013; Slippers *et al.*, 2013). Members of this family, such as the *Lasiodiplodia* spp., may either infect a broad range of host plants or survive as saprophytes or endophytes within seeds and other living tissues (Crous *et al.*, 2006; Sakalidis *et al.*, 2011; Phillips *et al.*, 2013).

For many years, the identification of *L. theobromae* relied solely on the plant symptoms, host pathogenicity and morphological characteristics of asexual reproductive structures, such as the size of conidia and pycnidia, growth rate and production of diffusible pigments in culture. A wide host range and morphological variability of *L. theobromae* suggested that it could be a complex of species. These characteristics usually overlap and vary depending on environmental factors, resulting in inaccurate identification. Accurate identification based on phylogenetic data have revealed that *L. theobromae* is indeed a species complex (Crous *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2013; Slippers *et al.*, 2013).

Recently, molecular tools, especially DNA sequencing, have been widely used to identify species of *Lasiodiplodia* (Crous *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2013; Slippers *et al.*, 2013). The distinction between Botryosphaeriaceae species and cryptic species of *Lasiodiplodia* using gene sequencing relies on the construction of multigene phylogenies. DNA sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of genomic rDNA (White *et al.*, 1990; Pavlic *et al.*, 2004;

Alves *et al.*, 2008), together with protein-coding genes such as translation elongation factor 1-alpha (TEF1- α) and β -tubulin (β -tub) have been used to reliably distinguish species of *Lasiodiplodia* (Marques *et al.*, 2013; Phillips *et al.*, 2013; Slippers *et al.*, 2013; Netto *et al.*, 2014). Phylogenetic studies of Botryosphaeriaceae emphasize that the use of only one gene region is not enough to separate sibling species in this family (Slippers & Wingfield, 2007; Phillips *et al.*, 2013), and the concatenated alignment of at least two gene regions in the genome of these individuals is required (Phillips *et al.*, 2013; Machado *et al.*, 2014a).

Currently, gene genealogies have been used to describe 26 new species of *Lasiodiplodia* (Pavlic *et al.*, 2004, 2008; Burgess *et al.*, 2006; Damm *et al.*, 2007; Alves *et al.*, 2008; Abdollahzadeh *et al.*, 2010; Begoude *et al.*, 2010; Ismail *et al.*, 2012; Urbez-Torres *et al.*, 2012; Phillips *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2015; Linaldeddu *et al.*, 2015); 13 of these species have been reported in association with Brazilian hosts and six have been described in Brazil (Correia *et al.*, 2013; Marques *et al.*, 2013; Machado *et al.*, 2014a,b; Netto *et al.*, 2014). Based on the aforementioned data, it is clear that the phylogenetic diversity of *Lasiodiplodia* is underestimated in Brazil, because most of the data was generated based on the morphological species recognition concept (Pereira *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2013). Until now, there has been a lack of phylogenetic studies involving multilocus sequencing from isolates associated with gummosis and dieback of the cashew tree, *Spondias* spp. and other tropical fruits in northeastern Brazil. Therefore, this study aimed to analyse the diversity of the *Lasiodiplodia* genus associated with various tropical fruits in northeastern Brazil, through gene sequencing of the ITS rDNA regions, TEF1-a and b-tub, together with morphophysiological and pathogenic characterization of the obtained isolates. Two new species are described herein, *L. caatinguensis* sp. nov. and *L. pontae* sp. nov.

2 Materials and methods

2.1 Sampling and fungal isolation

The samples used in this study were obtained from surveys performed in different regions throughout northeastern Brazil. Isolates used in earlier studies and maintained at the Tropical Plant Pathology Laboratory of Embrapa Agroindústria, Fortaleza, Ceará, were included in this study. Surveys were done between July and November 2013, and the samples consisted of branches, trunks, stem cankers and dead tips of branches exhibiting disease symptoms.

The sampled tissues were surface sterilized with 70% ethanol for 1 min and 1.5% sodium hypochlorite for 2 min and were then rinsed twice with sterile distilled water. Surface disinfested plant tissues had excess water removed by using sterilized filter paper, before being cut into small pieces (approximately 5 mm) from the margin of the dark necrotic region. After that, five tissue pieces were plated onto water agar medium. The plates were incubated at 25 °C with a 12 h photoperiod for 2–3 days, then the fast-growing colonies of the Botryosphaeriaceae family were subcultured onto a potato carrot agar (PCA) medium amended with sterilized pine needles (Mohali *et al.*, 2005). The plates were incubated at 25 °C with a 12 h photoperiod with nearblack light until conidia were produced in pycnidia (3–6 weeks). Monosporic cultures were obtained from sporulating colonies and were transferred to potato dextrose agar (PDA; Difco Laboratories) slants stored in a refrigerator at 5 °C until use. The pure cultures were also stored in sterile distilled water and in PDA slants in which the colony surface was covered by sterile mineral oil.

2.2 DNA extraction and sequence amplification

Total genomic DNA was extracted from 102 *Lasiodiplodia*-like isolates identified on the basis of conidial morphology. Isolates were grown on potato dextrose broth for 7 days in 250 mL Erlenmeyer flasks. Mycelial biomass of each isolate was dried at room temperature (25–30 °C) under a laminar flow chamber for 24 h.

Genomic DNA extraction followed the protocol of Cavalcanti & Wilkinson (2007) with modifications, where approximately 1 g mycelium was ground into a fine powder using a pestle in a mortar filled with liquid nitrogen.

Samples of extracted DNA were quantified using a NanoDrop 2000c spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). After quantification of the extracted

DNA, it was diluted to a concentration of $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ and stored at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. The PCR (50 μL) contained 62.5 μL of genomic DNA, 1x buffer, 0.2 mM dNTP, 1.5 mM MgCl_2 , 1 mM each forward and reverse primer synthesized by Invitrogen, 2.5U Flexi Taq DNA polymerase; Promega) and 19.25 μL sterile deionized water. The primers ITS1 and ITS4 (White *et al.*, 1990) were used for the amplification

and sequencing of ITS regions 1 and 2, including the 5.8S rRNA gene (ITS); primers $\beta\text{t}2\text{a}$ and $\beta\text{t}2\text{b}$ were used to sequence a fragment of β -tub (Glass & Donaldson, 1995); and primers TEF1-688F and TEF1-1251R (Alves *et al.*, 2008) were used to amplify a fragment of TEF1-a (Carbone *et al.*, 1999).

The thermal cycle of PCR consisted of an initial denaturation step at $96 \text{ }^\circ\text{C}$ for 1 min; 35 cycles of 30 s at $94 \text{ }^\circ\text{C}$ (denaturation), 1 min at $58 \text{ }^\circ\text{C}$ (TEF1- α and ITS) or $68 \text{ }^\circ\text{C}$ (β -tub), 1.5 min at $72 \text{ }^\circ\text{C}$ (annealing); and 10 min at $72 \text{ }^\circ\text{C}$ (final extension).

The PCR products were separated by electrophoresis in 1.5% agarose gels in Tris Borate EDTA 1X (TBE; 89 mM de Tris, 89 mM de boric acid, 2 mM EDTA), stained with ethidium bromide (5 mg mL^{-1}) and visualized under a UV transilluminator. After verification of the amplified bands, 40 μL aliquots of the PCR product from each sample were purified and sequenced in forward and reverse directions by Macrogen Inc., South Korea (<http://www.macrogen.com>).

Thus, 102 isolates were sequenced for the TEF1 a-region; after phylogenetic analysis of TEF1- α , 23 isolates were then selected to represent the genetic variation for each identified species in this study. ITS and β -tub regions were also sequenced in order to resolve all species used to reconstruct the phylogeny of *Lasiodiplodia*.

2.3 Phylogenetic analyses

Sequences were edited using BIOEDIT software (Hall, 2012) and were manually aligned before the construction of contigs using forward and reverse sequences.

The ITS sequences, TEF1-a and b-tub were used in the phylogenetic analyses and were the same as those used by Machado *et al.* (2014a), but including sequences of a new species of *Lasiodiplodia* described in the literature. New sequences were deposited in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and sequences of ITS, TEF1-a and b-tub of additional species were retrieved from GenBank (Table 1). Sequences were manually aligned based on either the ITS, TEF1-a or b-tub order using BIOEDIT. Adjustments

were made whenever necessary for indels and missing data. Initially the phylogenetic relationships were inferred using PAUP v. 4.0b10 (Swofford, 2000). The resulting alignment was deposited in TreeBASE (<http://www.treebase.org/>) under accession number S18482.

Then, Bayesian inference analyses (BI) were conducted using the Markov chain Monte Carlo method based on the sequences (ITS, TEF1-a and b-tub). The best nucleotide substitution model was determined using the MRMODELTEST v. 2.3 program (Posada & Buckley, 2004), and models were selected according to the Bayesian information criterion (BIC) before their inclusion into the BI for each gene separately. The K80+G model of evolution was used for ITS, HKY+G was used for TEF1-a and TrN+G was used for b-tub. A phylogenetic analysis based on concatenated alignment was performed using MRBAYES v. 3.1.1 (Ronquist & Heulsbeck, 2003) with 100 million generations by having each phylogenetic tree of the sample space from each run every 500 generations, discarding 25% of the first samples of the cold chain, which were thus subjected to burn-in. The trees were visualized in FIGTREE (Rambaut, 2009) and exported to a graphics program. The tree was rooted to *Spencermartinsia viticola* CBS117009.

Representative isolates of new *Lasiodiplodia* species described in this study were deposited in the Culture Collection of Phytopathogenic Fungi 'Prof. Maria Menezes' (CMM) at the Universidade Federal Rural de Pernambuco (Recife, Pernambuco), and pine needles containing pycnidia were also deposited at a herbarium at the Universidade Federal Rural de Viçosa (Viçosa, Minas Gerais – Herbarium VIC).

Table 1 Isolates of *Lasiodiplodia* species used in this study

Species	Isolate	Host	Origin	Collection	GenBank accession number		
					ITS	<i>EF1-α</i>	β - <i>tub</i>
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	CMW9074	Unknown	Mexico	T. Burgess	AY236952	AY236901	AY236930
<i>Lasiodiplodia americana</i>	CERC1960	<i>Pistachia vera</i>	USA	T. J. Michailides	KP217058	KP217066	KP217074
<i>L. americana</i>	CERC1961	<i>Pistachia vera</i>	USA	T. J. Michailides	KP217059	KP217067	KP217075
<i>L. brasiliense</i>	IBL415	<i>Manilkara zapota</i>	Icó/Ceará/Brazil	I. B. L. Coutinho	KT151806	KT151800	KT151803
<i>L. brasiliense</i>	IBL348	<i>Mangifera indica</i>	Itapipoca/ Ceará /Brazil	I. B. L. Coutinho	KT151807	KT151801	KT151804
<i>L. brasiliense</i>	IBL344	<i>Spondias purpurea</i>	Paracuru/ Ceará /Brazil	I. B. L. Coutinho	KT151808	KT151802	KT151805
<i>L. brasiliense</i>	CMM 2321	<i>Carica papaya</i>	Brazil	J. H. A. Monteiro	KC484797	KC481528	—
<i>L. brasiliense</i>	CMM 4015	<i>Mangifera indica</i>	Brazil	M. W. Marques	JX464063	JX464049	—
<i>L. caatinguensis</i> sp. nov.	IBL271	<i>Anacardium occidentale</i>	Pio-IX/Piauí/Brazil	J. S. Lima/J. E. Cardoso	KT154756	KT154750	KT154763
<i>L. caatinguensis</i> sp. nov.	IBL381	<i>Spondias purpurea</i>	São Gonçalo do Amarante/Ceará/Brazil	I. B. L. Coutinho/J. S. Lima	KT154757	KT154751	KT154764
<i>L. caatinguensis</i> sp. nov.	IBL40	<i>Spondias mombin</i>	Eusébio/Ceará/Brazil	J. S. Lima/J. E. Cardoso	KT154762	KT154755	KT154769
<i>L. caatinguensis</i> sp. nov. ^a	CMM1325	<i>Citrus sinensis</i>	Itarema/Ceará/Brazil	I. B. L. Coutinho/J. S. Lima	KT154760	KT008006	KT154767
<i>L. caatinguensis</i>	IBL352	<i>Anacardium occidentale</i>	Marco/Ceará/Brazil	J. S. Lima/J. E. Cardoso	KT154759	KT154753	KT154766
<i>L. caatinguensis</i>	IBL04	<i>Anacardium occidentale</i>	Aracati/Ceará/Brazil	J. S. Lima/J. E. Cardoso	KT154758	KT154752	KT154765
<i>L. caatinguensis</i>	IBL442	<i>Spondias purpurea</i>	Itapipoca/Ceará/Brazil	I. B. L. Coutinho/J. S. Lima	KT154761	KT154754	KT154768
<i>L. citricola</i>	IRAN1521C	<i>Citrus</i> sp.	Iran	A. Shekari	GU945353	GU945339	—
<i>L. citricola</i>	IRAN1522C	<i>Citrus</i> sp.	Iran	J. Abdollahzadeh/A. Javadi	GU945354	GU945340	—

Species	Isolate	Host	Origin	Collection	GenBank accession number		
					ITS	<i>EF1-α</i>	β - <i>tub</i>
<i>L. crassispora</i>	CBS110492	Unknown	Unknown	Unknown	EF622086	EF622066	EU673134
<i>L. crassispora</i>	CMW22653	<i>Pterocarpus angolensis</i>	Africa	J. Mehl/J. Roux	FJ888465	FJ888452	—
<i>L. egyptiaca</i>	CMM3648	<i>Jatropha curcas</i>	Brazil	A. R. Machado	KF234549	KF226705	KF254933
<i>L. egyptiaca</i>	CMM3611	<i>Jatropha curcas</i>	Brazil	A. R. Machado	KF234545	KF226691	KF254928
<i>L. euphorbicola</i>	IBL327	<i>Annona squamosa</i>	Brazil	I. B. L. Coutinho/ J. S. Lima	KT247491	KT247493	KT247495
<i>L. euphorbicola</i>	IBL329	<i>Cocos nucifera</i>	Brazil	I. B. L. Coutinho/J. S. Lima	KT247490	KT247492	KT247494
<i>L. euphorbicola</i>	CMM3651	<i>Jatropha curcas</i>	Brazil	A. R. Machado	KF234553	KF226711	KF254937
<i>L. euphorbicola</i>	CMM3652	<i>Jatropha curcas</i>	Brazil	A. R. Machado	KF234554	KF226715	KF254938
<i>L. euphorbicola</i>	CMM3609	<i>Jatropha curcas</i>	Brazil	A. R. Machado	KF234543	KF226689	KF254926
<i>L. exigua</i>	CBS 137785	<i>Retama raetam</i>	Tunisia	B. T. Linaldeddu	KJ638317	KJ638336	—
<i>L. exigua</i>	BL 184	<i>Retama raetam</i>	Tunisia	B. T. Linaldeddu	KJ638318	KJ638337	—
<i>L. gilanensis</i>	IRAN1523C	Unknown	Iran	J. Abdollahzadeh/A. Javadi	GU945351	GU945342	—
<i>L. gilanensis</i>	IRAN1501C	Unknown	Iran	J. Abdollahzadeh/A. Javadi	GU945352	GU945341	—
<i>L. gonubiensis</i>	CBS115812	<i>Syzygium cordatum</i>	Africa	D. Pavlic	DQ458892	DQ458877	DQ458860
<i>L. hormozganensis</i>	IRAN1500C	<i>Olea</i> sp.	Iran	J. Abdollahzadeh/A. Javadi	GU945355	GU945343	—
<i>L. hormozganensis</i>	IRAN1498C	<i>Mangifera indica</i>	Iran	J. Abdollahzadeh/A. Javadi	GU945356	GU945344	—
<i>L. iraniensis</i>	IRAN1517C	<i>Citrus</i> sp.	Iran	J. Abdollahzadeh/A. Javadi	GU945349	GU945337	—
<i>L. iraniensis</i>	IRAN1519C	<i>Mangifera indica</i>	Iran	J. Abdollahzadeh/A. Javadi	GU945350	GU945338	—
<i>L. jatrophiicola</i>	CMM3610	<i>Jatropha curcas</i>	Brazil	A. R. Machado	KF234544	KF226690	KF254927
<i>L. mahajangana</i>	CMW27801	<i>Terminalia catappa</i>	Madagascar	J. Roux	FJ900595	FJ900641	FJ900630
<i>L. mahajangana</i>	CMW27820	<i>Terminalia catappa</i>	Madagascar	J. Roux	FJ900597	FJ900643	FJ900632
<i>L. margaritacea</i>	CBS122519	<i>Adansonia gibbosa</i>	Australia	T. I. Burgess	EU144050	EU144065	—
<i>L. margaritacea</i>	CBS122065	<i>Adansonia gibbosa</i>	Australia	T. I. Burgess	EU144050	EU144065	—
<i>L. macrospora</i>	CMM3833	<i>Jatropha curcas</i>	Brazil	A. R. Machado	KF234557	KF226718	KF254941

Species	Isolate	Host	Origin	Collection	GenBank accession number		
					ITS	<i>EF1-α</i>	β - <i>tub</i>
<i>L. mediterranea</i>	CBS 137783	<i>Quercus ilex</i>	Italy	B. T. Linaldeddu	KJ638312	KJ638331	—
<i>L. mediterranea</i>	ALG 36	<i>Citrus sinensis</i>	Algeria	A. Berraf-Tebbal	KJ638314	KJ638333	—
<i>L. missouriana</i>	UCD2193MO	<i>Vitis vinifera</i>	USA	K. Striegler/G. M. Leavitt	HQ288225	HQ288267	HQ288304
<i>L. missouriana</i>	UCD2199MO	<i>Vitis vinifera</i>	USA	K. Striegler/G. M. Leavitt	HQ288226	HQ288268	HQ288305
<i>L. parva</i>	CBS456.78	Cassava-field soil	Colombia	O. Rangel	EF622083	EF622063	—
<i>L. parva</i>	CBS495.78	Cassava-field soil	Colombia	O. Rangel	EF622085	EF622065	—
<i>L. plurivora</i>	STE-U 5803	<i>Vitis vinifera</i>	Africa	F. Halleen	EF445362	EF445395	—
<i>L. pontae</i> sp. nov. ^a	CMM1277	<i>Spondias purpurea</i>	Pio-IX/Piauí/Brazil	J. S. Lima/F. C. O. Freire	KT151794	KT151791	KT151797
<i>L. pontae</i> sp. nov	IBL14	<i>Anacardium occidentale</i>	Pio-IX/Piauí/Brazil	J. S. Lima/F. C. O. Freire	KT151796	KT151793	KT151799
<i>L. pontae</i> sp. nov	IBL18	<i>Anacardium occidentale</i>	Mossoró/Rio Grande do Norte/Brazil	J. S. Lima/F. C. O. Freire	KT151795	KT151792	KT151798
<i>L. pseudotheobromae</i>	CBS116459	<i>Gmelina arborea</i>	Costa Rica	J. Carranza-Velásquez	EF622077	EF622057	EU673111
<i>L. pseudotheobromae</i>	IBL201	<i>Spondias purpurea</i>	Cachoeira dos índios/Paraíba/Brazil	I. B. L. Coutinho/J. S. Lima	KT247478	KT247482	KT247488
<i>L. pseudotheobromae</i>	IBL241	<i>Tamarindus indica</i>	Pentecoste/Ceará/Brazil	I. B. L. Coutinho/J. S. Lima	KT247479	KT247483	KT247489
<i>L. pseudotheobromae</i>	IBL266	<i>Anacardium occidentale</i>	Pentecoste/Ceará/Brazil	I. B. L. Coutinho/J. S. Lima	KT247480	KT247484	KT247486
<i>L. pseudotheobromae</i>	IBL 134	<i>Annona × atemoya</i>	Beberibe/Ceará/Brazil	I. B. L. Coutinho/J. S. Lima	KT247481	KT247485	KT247487
<i>L. pseudotheobromae</i>	CMM3887	<i>Jatropha curcas</i>	Brazil	A. R. Machado	KF234559	KF226722	KF254943
<i>L. rubropurpurea</i>	WAC12536	<i>Eucalyptus grandis</i>	Australia	T. Burgess/G. Pegg	DQ103554	DQ103572	—
<i>L. subglobosa</i>	CMM3872 ^a	<i>Jatropha curcas</i>	Brazil	A. R. Machado	KF234558	KF226721	KF254942
<i>L. subglobosa</i>	CMM4046	<i>Jatropha curcas</i>	Brazil	A. R. Machado	KF234560	KF226723	KF254944
<i>L. theobromae</i>	IBL340	<i>Spondias purpurea</i>	Catuana/Ceará/Brazil	I. B. L. Coutinho/J. S. Lima	KT247466	KT247472	KT247475

Species	Isolate	Host	Origin	Collection	GenBank accession number		
					ITS	<i>EF1-α</i>	<i>β-tub</i>
<i>L. theobromae</i>	IBL375	<i>Talisia esculenta</i>	Itapipoca/Ceará/Brazil	I. B. L. Coutinho/J. S. Lima	KT247467	KT247473	KT247474
<i>L. theobromae</i>	IBL404	<i>Anacardium occidentale</i>	Buique/Piauí/Brazil	I. B. L. Coutinho/J. S. Lima	KT247468	KT247470	KT247476
<i>L. theobromae</i>	IBL405	<i>Anacardium occidentale</i>	Buique/Piauí/Brazil	I. B. L. Coutinho/J. S. Lima	KT247469	KT247471	KT247477
<i>L. theobromae</i>	CMW28571	<i>Terminalia ivorensis</i>	Cameroon	B. A. D. Begoude	GQ469924	GQ469897	—
<i>L. theobromae</i>	CBS111530	Unknown	Unknown	Unknown	EF622074	EF622054	—
<i>L. theobromae</i>	CMM3831	<i>Jatropha curcas</i>	Brazil	A. R. Machado	KF234556	KF226717	KF254940
<i>L. theobromae</i>	CMM3654	<i>Jatropha curcas</i>	Brazil	A. R. Machado	KF234555	KF226716	KF254939
<i>L. theobromae</i>	CMM3612	<i>Jatropha curcas</i>	Brazil	A. R. Machado	KF234546	KF226692	KF254929
<i>L. theobromae</i>	CMM3647	<i>Jatropha curcas</i>	Brazil	A. R. Machado	KF234548	KF226704	KF254932
<i>L. viticola</i>	UCD2553AR	<i>Vitis vinifera</i>	USA	K. Striegler/G. M. Leavitt	HQ288227	HQ288269	HQ288306
<i>L. viticola</i>	UCD2604MO	<i>Vitis vinifera</i>	USA	K. Striegler/G. M. Leavitt	HQ288228	HQ288270	HQ288307
<i>L. venezuelensis</i>	WAC12539	<i>Acacia mangium</i>	Venezuela	A. R. Machado	DQ103547	DQ103568	—
<i>L. venezuelensis</i>	CMW13513	<i>Acacia mangium</i>	Venezuela	S. Mohali	DQ103549	DQ103570	—
<i>Macrophomina phaseolina</i>	PD112	<i>Prunus dulcis</i>	USA	T.J. Michailides/P. Inderbitzin	GU251105	GU251237	GU251765
<i>M. phaseolina</i>	MUCC531	<i>Sesbania formosa</i>	Australia	D. Pavlic	EF585505	EF585560	—
<i>M. phaseolina</i>	CMM3615	<i>Jatropha curcas</i>	Brazil	A. R. Machado	KF234547	KF226693	KF254930
<i>M. phaseolina</i>	CMM3650	<i>Jatropha curcas</i>	Brazil	A. R. Machado	KF234552	KF226710	KF254936
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	CBS 499.66	<i>Mangifera indica</i>	Mali	J. Brun	AY819727	EU144063	FM211167
<i>N. dimidiatum</i>	PD104	<i>Ficus carica</i>	USA	T.J. Michailides/P. Inderbitzin	GU251107	GU251239	GU251767
<i>Neoscytalidium hyalinum</i>	CMM3566	<i>Jatropha curcas</i>	Brazil	A. R. Machado	KF234551	KF226709	KF254935
<i>N. hyalinum</i>	CMM3649	<i>Jatropha curcas</i>	Brazil	A. R. Machado	KF234550	KF226707	KF254934
<i>N. hyalinum</i>	CMM3616	<i>Jatropha curcas</i>	Brazil	A. R. Machado	JQ927342	KF226699	KF254931

Species	Isolate	Host	Origin	Collection	GenBank accession number		
					ITS	<i>EF1-α</i>	β - <i>tub</i>
<i>N. hyalinum</i>	CMM3607	<i>Jatropha curcas</i>	Brazil	A. R. Machado	KF234542	KF226688	KF254925
<i>Neoscytalidium novaehollandiae</i>	CBS122072	<i>Adansonia gibbosa</i>	Australia	D. Pavlic	EF585535	EF585581	—
<i>Ne.novaehollandiae</i>	CBS122610	<i>Acacia synchronicia</i>	Australia	D. Pavlic	EF585536	EF585578	—
<i>Spencermartinsia viticola</i>	CBS117009	<i>Vitis vinifera</i>	Spain	J. Luque/S. Martos	AY905554	AY905559	EU673104

^aEx-type cultures obtained in this study. Sequence numbers in bold were obtained in the present study. Abbreviations:

2.4 Morphological and cultural characterization

The width and length of the conidia of all species of *Lasiodiplodia* identified in this study were measured. Ex-holotype isolates CMM1325 and CMM1277 of two new species *L. caatingensis* and *L. pontae*, respectively, were measured in terms of the paraphyses and conidial cells in the same manner as the other isolates.

Fungal isolates were grown in sterile Petri plates containing pine needles and PCA medium and were incubated for 4 weeks at 25 °C with a 12 h photoperiod of near-black light to induce pycnidium development.

The fruiting bodies were manually removed and disrupted using scalpels, mounted on slides, stained with a drop of lactophenol and observed through a light microscope. Thirty measurements were taken from all possible morphological traits being displayed (conidia, paraphyses and conidial cells). The images were obtained with a digital camera, ICc5 131 Axiocam, coupled to a microscope (Carl Zeiss AG Imager.A2 Ltd) and an imaging device, Motic Image Plus 2.0 (Motic Group Co.).

Twenty-three *Lasiodiplodia* isolates that had been sequenced were used in this study (Table 1). The incubation temperatures tested were 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40 °C, with 12 h of exposure to a fluorescent white light. An agar plug of 3 mm diameter mycelium + PDA of each isolate taken from the edge of a 5-day-old colony was transferred into the centre of a 90 mm Petri plate containing PDA. The experiment was conducted in a completely randomized design with five replications of isolate and temperature treatments. Each plate was used as an experimental unit. The data were the diameter of a colony measured in two perpendicular directions on a daily basis for three consecutive days.

The data obtained from the colony diameters at 25 °C were used to estimate the mycelium growth rate (mm day^{-1}), and the maximum growth was reached on the third day. The mean values were analysed through analysis of variance (ANOVA), comparing the means using the Scott–Knott test at $\alpha = 0.05$ confidence level in the statistical program SISVAR v. 5.3 (Analytical Software). To measure the optimal growth temperature for each isolate, the average growths were plotted on a curve fitted to asquare polynomial regression ($y = a + bx + cx^2$) using SISVAR v. 5.3.

2.5 Pathogenic characterization

2.5.1 Pathogenicity on fruits

The 23 *Lasiodiplodia* isolates that had been sequenced were inoculated into mango fruit cultivar Tommy Atkins. The fruits were surface sterilized by immersion in 1.2% sodium hypochlorite for 5 min and rinsed in sterile distilled water prior to inoculation.

The method of inoculation and incubation was from Marques et al. (2013). After drying, the fruits were placed into sterile plastic trays, with the bottom covered with four layers of sterile moistened paper towels. To avoid direct contact of the fruits with moist towels, each fruit was placed in one side of a Petri plate. The fruits were softly wounded in the middle region with the tip of three sterile pins to a 3 mm depth prior to placing a 3 mm agar plug containing mycelium grown on PDA of the isolate to be tested. Noncolonized agar discs were used as control treatments.

The plastic trays were arranged side by side and kept sealed for 48 h to maintain humidity near saturation, at 25 ± 2 °C, with a 12 h photoperiod using white fluorescent light. After this period, the moist chamber was removed from the trays, the paper towels were not dampened, and the fruits remained in the incubation room under the conditions mentioned above for 10 days.

The isolates were considered to be pathogenic when the injured area reached >5 mm in diameter. The virulence of the isolates was assessed daily by measuring the length of the lesion in two perpendicular directions on each fruit until the seventh day. These data were used for calculating the lesion size (mm) and the growth rate (mm day⁻¹) of each isolate.

The experiment was conducted in a completely randomized design with six replications per isolate and one fruit per replication. The mean values were analysed using analysis of variance, comparing the means using the Scott–Knott test at $\alpha = 0.05$ confidence level in SISVAR v. 5.3.

2.5.2 Pathogenicity on tropical fruit plants

The pathogenicity of all 23 sequenced *Lasiodiplodia* isolates to cashew trees, yellow mombin (*Spondias mombin*) and soursop were evaluated. Six-month-old cashew

seedlings (genotypes CCP 76), soursop and yellow mombin were used in the trials. These were grown in polyethylene bags with a substrate of sand base:manure (3:1), maintained in a greenhouse, and watered daily.

All tested isolates were grown for 5 days on PDA in plates incubated at 25 ± 2 °C under a 12 h photoperiod using white fluorescent light. The inoculation method used (Lima *et al.*, 2013) consisted of making a 2 mm diameter hole in the stem of the plant at approximately 15 cm from the bottom with an electric drill. Then, a 2 mm diameter agar plug containing mycelium grown on PDA was introduced into the hole, placing it in contact with the vascular system of the plant. The hole was covered with petroleum jelly and sealed with Parafilm. In the control treatment, the plants were drilled and inoculated with PDA medium agar plugs only. The inoculated plants were evaluated 15 days after inoculation. The evaluation consisted of cutting a longitudinal section using a switchblade and measuring the tissue vascular injury using a digital caliper calibrated for mm.

The presence of gum exudates at the inoculation site was also evaluated. Infected pieces of the lesion area were transferred to PDA plates to reisolate the pathogen. The experiment was conducted in a completely randomized design with six replications per isolate and one fruit per replication. The mean values were analysed through analysis of variance (ANOVA), comparing the means using the Scott–Knott test at $\alpha = 0.05$ confidence level in SISVAR v. 5.3.

3 Results

3.1 Phylogenetic analyses and DNA sequencing

A total 102 isolates of *Lasiodiplodia* spp. were obtained from perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil, which were identified on the basis of conidial morphology and DNA sequencing, followed by phylogenetic analysis. All 102 isolates were sequenced for the TEF1-a gene region for an indication of possible identity of each isolate. The TEF1-a sequences obtained were compared through Bayesian analyses prior to sequencing of other regions (data not shown). Subsequently, isolates of each putative species were selected (23 isolates in total) for the sequencing of ITS and b-tub regions.

PCR amplifications for ITS, TEF1- α and β -tub were approximately 580, 307 and 414 bp, respectively. Sequences of ex-type isolates of various *Lasiodiplodia* species from GenBank were included in the analysis, together with isolates obtained in this study (Table 1). The combined analyses of the ITS, TEF1- α and β -tub dataset included 87 taxa and contained 1251 characters, of which 218 were parsimony-informative, 323 were variable and 899 were conserved.

From the phylogenetic analysis, it was possible to identify two clades of *Neoscytalidium*, one clade of *Macrophomina phaseolina*, one clade consisting of *Spencemartinsia viticola* and 27 well-supported clades representing species of *Lasiodiplodia*. The consensus tree generated with Bayesian analyses is shown in Figure 1.

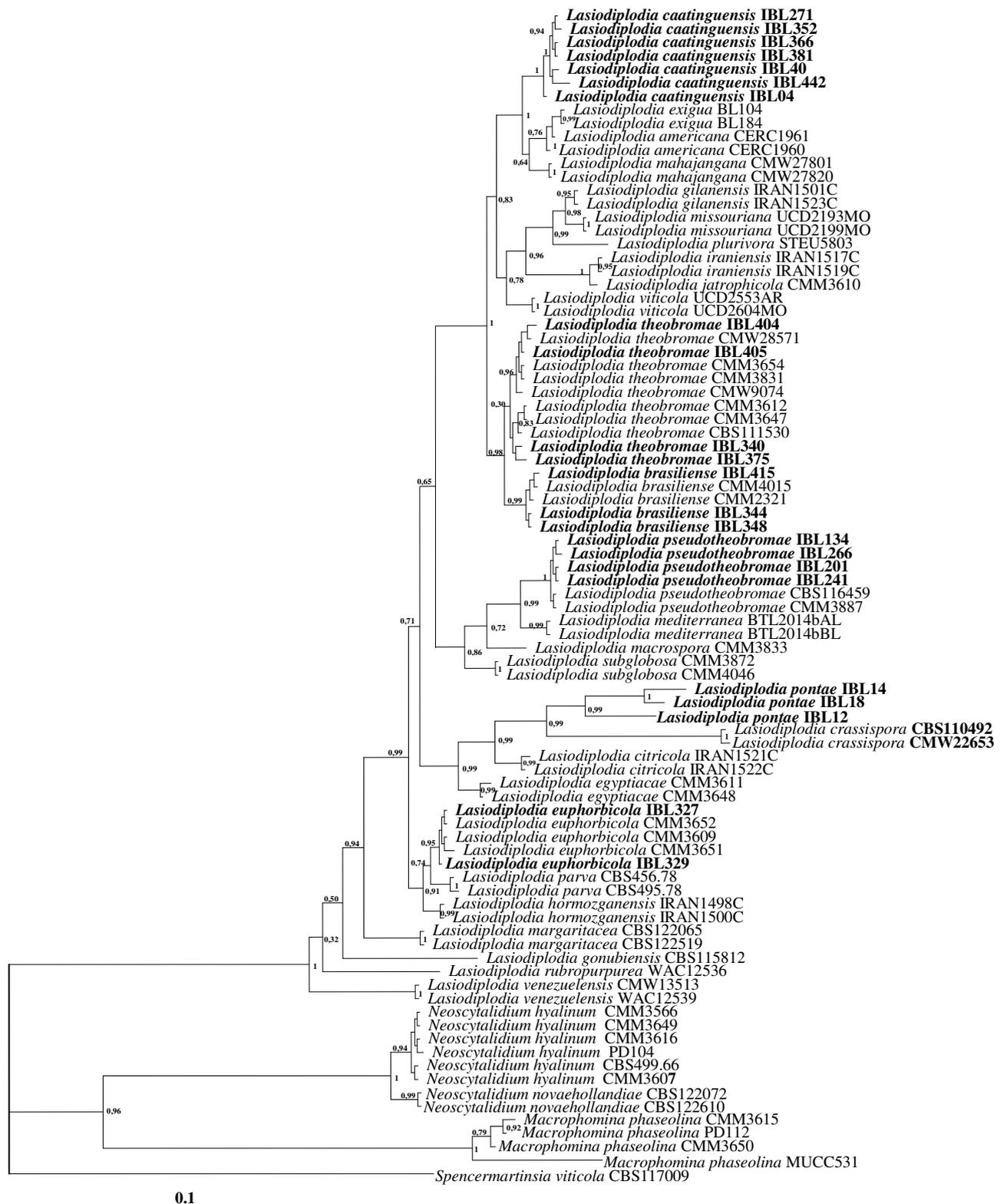


Figure 1 Multilocus phylogenetic tree inferred from Bayesian analysis based on the combined sequences of the ITS, TEF-1 α and β -tub gene regions. Bayesian posterior probabilities are indicated above the nodes. The tree was rooted to *Spencermartinsia viticola* CBS117009. The species in this study are highlighted in bold.

The *Lasiodiplodia* isolates reported in this study and associated with tropical fruits were grouped into six different clades supported by Bayesian inference analyses as follows: *L. brasiliense* (IBL344, IBL348, IBL415), *L. euphorbicola* (IBL327, IBL329), *L. theobromae* sensu stricto (IBL340, IBL375, IBL404, IBL405), *L. pseudotheobromae* (IBL134, IBL201, IBL241, IBL266) and the two newly named clades *L. pontae* (CMM1277, IBL14, IBL18) and *L. caatinguensis* (CMM1325, IBL04, IBL40, IBL271, IBL352, IBL381, IBL442), herein described as two new species of *Lasiodiplodia*. The spatial distribution of these isolates is reported in Figure 2.

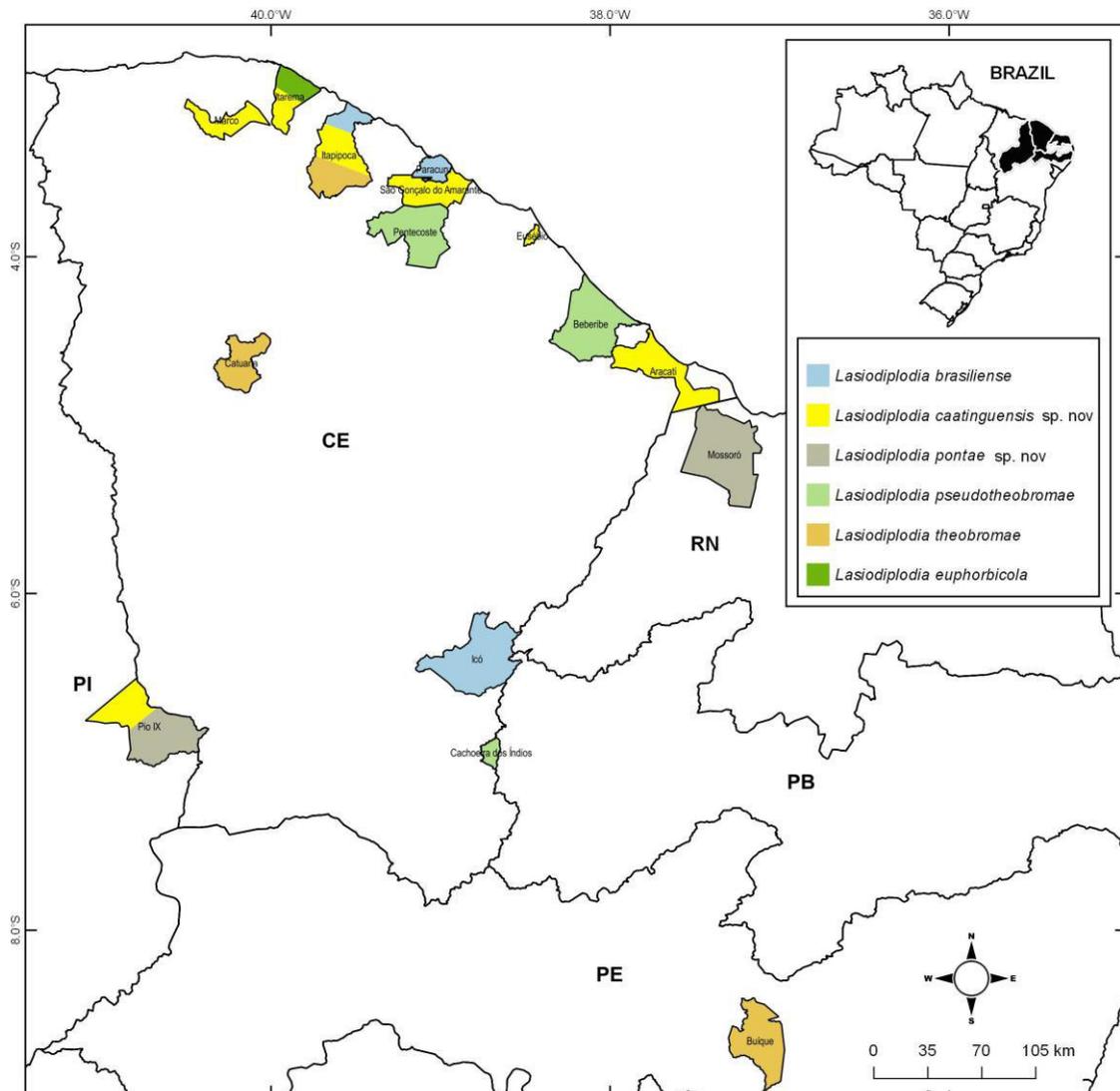


Figure 2 Geographical origin of *Lasiodiplodia* species identified by sequencing and alignment of three gene regions (ITS, TEF1- α and β -tub) associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil.

3.2 Morphological and cultural characterization

None of the isolates of *Lasiodiplodia* identified in this study through morphological and phylogenetic analyses had developed their sexual stage in the observations in the field and in laboratory conditions. As for the asexual stage, all species produced conidia in stromatic pycnidia in a PCA medium amended with pine needles upon exposure to direct near-black light with a photoperiod of 12 h for 4 weeks of incubation. All species exhibited the typical features of the genus, such as hyaline conidia when immature, and brown with 1-septum thick walls and longitudinal striations when mature. The characterization of conidial structures compared to holotypes of each species reported in the literature is shown in Table 2.

Table 2 Comparison of morphological characteristics of *Lasiodiplodia* species examined in this study with previous studies

Species	Conidia length (L) × width (W)		Paraphyses (µm)	Conidiogenous cells (µm)	Reference
	Size (µm)	L:W			
<i>L. brasiliense</i>	22.7–29.2 × 11.7–17.0	1.8	—	—	Netto <i>et al.</i> (2014)
	20.3–27.4 × 10.4–14.7	1.85	—	—	This study
<i>L. caatinguensis</i> sp. nov.	13–20.2 × 10.1–12.6	1.75	31.1–60.2 × 2.1–5.0	7.2–14.6 × 2.2–5.8	This study
<i>L. euphorbicola</i>	15–23 × 9–12	—	76 × 2–4	5–15 × 3–4	Machado <i>et al.</i> (2014a)
	15.1–22.5 × 8.6–13.7	1.70	—	—	This study
<i>L. pseudotheobromae</i>	26–31 × 13–16	1.7	58 × 3–4	—	Alves <i>et al.</i> (2008)
	20.8–32.5 × 11.1–18.5	1.79	—	—	This study
<i>L. pontae</i> sp. nov.	16.3–26.4 × 9.6–15	1.74	19.2–46.3 × 2.4–3.1	5.8–15.7 × 3.1–5.4	This study
<i>L. theobromae</i>	19.7–26.7 × 10.9–15.3	1.69	—	—	This study
	23–31 × 13–15.5	—	45 × 2	5–11 × 2–4	Machado <i>et al.</i> (2014a)
	21–31 × 13–15.5	—	58 × 3–4	—	Alves <i>et al.</i> (2008)

As to mycelial growth under different temperatures (Table 3), except for *L. euphorbicola* and *L. caatinguensis*, which only grew above 15 °C, all others grew at 10 °C and above. Only *L. caatinguensis* showed low mycelium development at 40 °C (2.94 mm). The ideal temperature for the maximum growth of species *L. theobromae*,

L. pseudotheobromae, *L. pontae* and *L. euphorbicola* was approximately 24 °C, with a growth rate of 30.41, 27.93, 31.96 and 26.86 mm day⁻¹, respectively, while *L. caatinguensis* and *L. brasiliense* reached maximum growth at approximately 26 °C, with growth rates of 27.48 and 29.52 mm day⁻¹, respectively, by the third day of incubation.

Table 3 Optimum temperature for mycelial growth and mycelia growth rate at 25 °C of *Lasiodiplodia* species associated with dieback and stem-end rot in several tropical fruit from the northeast of Brazil

Isolate	Optimum temp. ^a (°C)	Maximum growth at optimum temp. (mm) ^b	Growth rate (mm/day) ^c
<i>L. brasiliense</i>	26.2	90.0 a ^d	29.5 a
<i>L. caatinguensis</i> sp. nov.	26.2	90.0 a	27.4 a
<i>L. euphorbicola</i>	23.8	62.2 b	26.8 a
<i>L. pontae</i> sp. nov.	23.9	74.1 a	31.9 a
<i>L. pseudotheobromae</i>	23.8	86.7 a	27.9 a
<i>L. theobromae</i>	24.2	85.9 a	30.4 a

^aTemperature in which the pathogen reached maximum growth.

^bMaximum mycelial growth on the third day of incubation at optimum temperature.

^cGrowth rate at 25 °C.

^dValues within columns followed by the same letter do not differ significantly according to Scott–Knott test at $\alpha = 0.05$.

3.3 Taxonomy

L. caatinguensis I. B. L. Coutinho, F. C. O Freire, C. S. Lima & J. E. Cardoso, sp. nov. (Fig. 3).

MycoBank – MB815122

Etymology: This designation refers to the predominant Caatinga biome in northeastern Brazil where this fungus was first reported.

Sexual morph: not observed. *Asexual morph*: Conidiomata pycnidial, stromatic produced in pine needles embedded in BCA grown for 4 weeks and covered by greyish brown mycelium. *Paraphyses* branched, hyaline, smooth, long, seemingly coenocytic with a rounded apex, with dimensions of length and width 31.1–60.2 × 2.1–5.0 µm. *Conidiophore* absent. *Conidiogenous cells* hyaline, short, discrete, smooth thin-walled, with dimensions of length and width 7.2–14.6 × 2.2–5.8 µm. *Conidia* hyaline at a young stage are thick-walled and ovoid to ellipsoids with a round and slightly tapered apex, continuing with the same form when mature, with a dark brown colour with

longitudinal striations and one single septum. Dimensions: 13–20.2 × 10.1–12.5 μm (mean = 18.15 × 11.78 ± 1.38 ± 0.59; L:W = 1.54, *n* = 50).

Cultural characteristics: Produces an abundant aerial cottony mycelium mat when grown on PDA for 3 days, reaching 90 mm diameter. Its colour is initially greyish to whitish, becoming completely grey. It produces a reddish pigment at 35 °C, has a minimal temperature of 15 °C, and an optimal temperature of 26.2 °C, reaching a maximum growth rate of 27.4 mm/day at 25 °C. It was the only species able to continue growing at 40 °C. In other culture media at 25 °C, the growth rate is 23.3 mm/day, the mycelium measuring 63.1 mm diameter (in a 90 mm plate) after 3 days' incubation.

Habitat: On trunk canker of *Citrus sinensis* with necrotic lesions that were apparently dry.

Known geographic distribution: Ceará and Piauí States, Brazil.

Specimens examined: Brazil, Itarema, Ceará., trunk canker of *C. sinensis*, October of 2013, I. B. L. Coutinho & J. S. Lima, holotype VIC42498, dried on pine needles, culture ex-holotype CMM1325, NCBI GenBank access codes KT008006 (*TEF1-α*), KT154760 (ITS), KT154767 (*β-tub*).

Other specimens examined: Branches and trunks of *Anacardium occidentale* collected in Pio IX (IBL271) 6°50'52"S, 40°35'01"W in the State of Piauí; Marco (IBL352) 3°07'28"S, 40°08'56"W and Aracati (IBL04) 4°33'46"S, 37°46'09"W in the State of Ceará collected by J. S. Lima and J. E. Cardoso. Branches and trunks of *Spondias purpurea* in São Gonçalo do Amarante (IBL381) 3°36'26"S, 38°58'14"W; *S. lutea* in Itapipoca (IBL442) in Eusébio (IBL40) 3°29'38"S, 39°34'37"W located in the State of Ceará, Brazil, and collected by I. B. L. Coutinho and J. S. Lima.

Notes: *Lasiodiplodia caatingensis* form a clade supported by posterior probability score of 0.1 (Fig. 1). *Lasiodiplodia caatingensis* is phylogenetically close to *L. exigua*, differentiating by 5 nucleotides in the ITS at positions 106 to 110, and 11 nucleotides in the *TEF1-α* region at positions 589, 605, 606 and 607–614 in the concatenated alignment. *Lasiodiplodia caatingensis* morphologically resembles *L. exigua* (19.6–24.3 × 10.8–13.3), but differs in its shorter conidia (13–2 × 10–1 μm). This species can reliably be differentiated from *L. exigua* and other closest species by using *TEF1-α* phylogenetic analysis.

***Lasiodiplodia pontae* F. C. O Freire, I. B. L Coutinho, C. S. Lima & J. E. Cardoso, sp. nov. (Fig. 3)**

MycoBank – MB815121

Etymology: Named in memoriam of Professor José Julio da Ponte Filho for the important role he played in Brazilian plant pathology.

Sexual morph: not observed. *Asexual morph*: Conidiomata pycnidial, stromatic produced in pine needles embedded in BCA grown for 4 weeks, covered with a very dark mycelial mat. When grown on PDA medium, they form within 8 weeks, initially immersed in the medium, isolated or aggregated; by the time they develop, they become superficial to the medium as a means to produce soft mucilage that later becomes hard and black. Internally, the pycnidia are multiloculated with a thick, dark granular wall. *Paraphyses* branched, hyaline, smooth, long, seemingly coenocytic with rounded apex, and dimensions of length and width of 19.2–46.3 × 2.4–3.1 μm. *Conidiophores* absent. *Conidiogenous cells* hyaline, short, wrinkled, cylindrical, slightly swollen at the apex of their tips where holoblastic conidia are formed, with dimensions of length and width of 5.8–15.7 × 3.1–5.4 μm. *Conidia* aseptate when young, hyaline, ellipsoid to ovoid; when ripe they remain the same size, brown, with a septum, the presence of longitudinal striations with dark, thick walls. Size: 16.4–26.46 × 9.6–15 μm (mean 21±1.8 × 12.1±0.9 μm., L:W = 1.74, n = 50).

Cultural characteristics: flattened mycelial mat, cottony, initially white brownish, later becoming dark brown. In PDA, they produce a reddish pink pigment at a temperature of 35 °C with an optimal growth temperature of 23.9 °C, 74.10 mm maximum mycelial growth on the third day, and a growth rate of 31.9 mm/day.

Habitat: Necrotic cankers in branches and trunks of *Spondias purpurea*.

Known geographic distribution: Piauí and Rio Grande do Norte States, Brazil.

Specimens examined: Brazil, Pio IX (6°50'52"S, 40°35'01"W), Piauí, Necrotic canker on *S. purpurea*, October 2009, J. S. Lima & F. C. O. Freire, holotype VIC42947, dried on pine needles, culture ex-holotype CMM1277, NCBI GenBank access codes KT151791 (TEF1-α), KT151794 (ITS), KT151797 (β-tub).

Other specimens examined: Necrotic cankers in branches and trunks of cashew in the village Pio-IX (IBL14) 6°50'52"S, 40°35'01"W in the state of Piauí and in the city of Mossoró (IBL18) 5°11'17"S, 37°20'39"W in the state of Rio Grande do Norte in commercial orchards, collected by J. S. Lima and F. C. O. Freire.

Notes: *L. pontae* form a clade supported by posterior probability score of 0.99 (Fig. 1). The closest species phylogenetically was the species *L. crassispora*, differing by 89 nucleotides in concatenated alignment, in which 40 were distinct in the ITS region, 19 in the *TEF1- α* region and 21 in the *β -tub* region. Morphologically, *L. pontae* has smaller conidia (16–26 \times 9.6–15) compared to *L. crassispora* (27–30 \times 14–17) and resembles *L. parva* (16–23.5 \times 10.5–13) and *L. euphorbicola* (15–2 \times 9–12), but with slightly longer conidia. This species can reliably be differentiated from *L. crassispora* and other closest species by using *TEF1- α* and *β -tub* phylogenetic analysis.

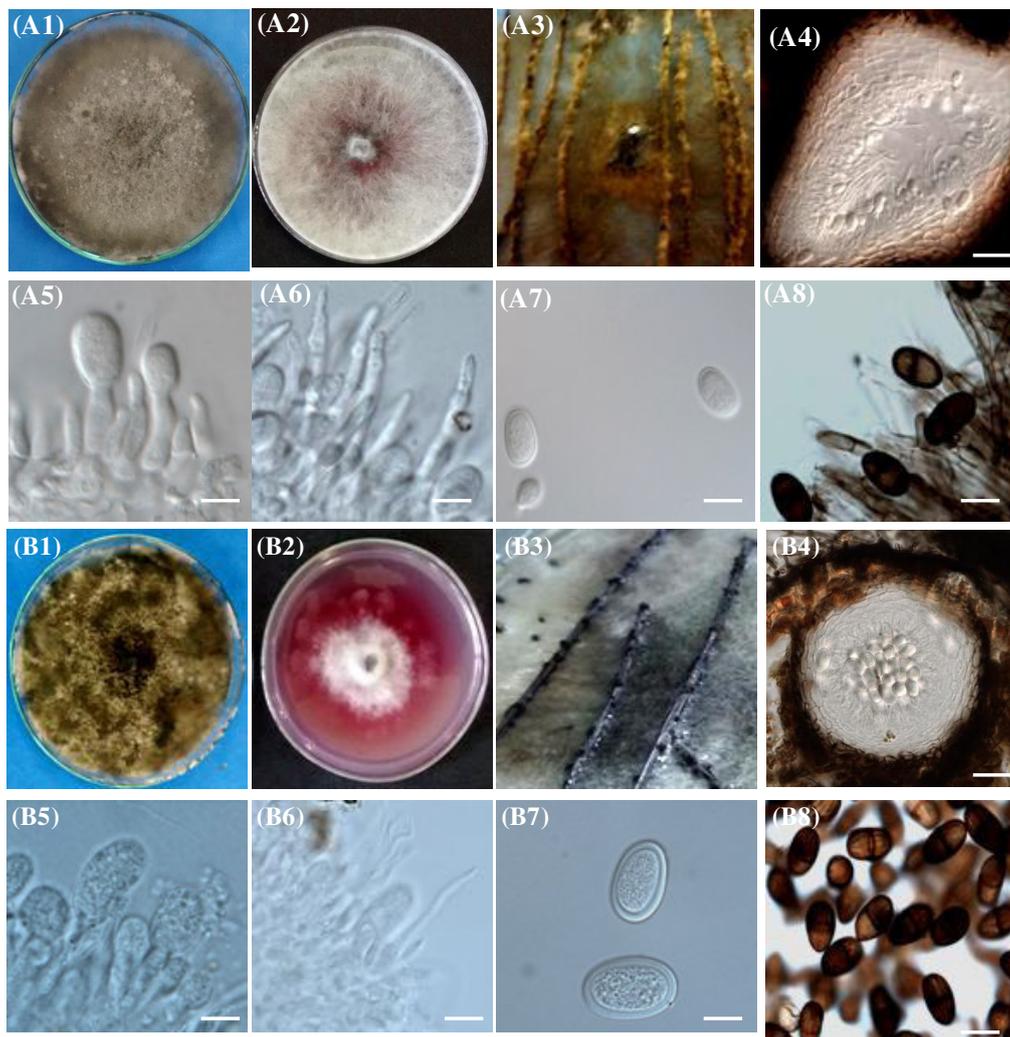


Figure 3 (a) *Lasiodiplodia caatinguensis* sp. nov. strain CMM1325. (b) *Lasiodiplodia pontae* sp. nov. strain CMM1277. A1, B1, colony morphology after 15 days of growth at 25 °C in PDA. A2, B2, reddish pink pigment produced at 35 °C. A3, B3, pycnidia formed in PDA under *Pinus* needles after 4 weeks. A4, B4, section of conidioma. A5, B5, conidia developing on conidiogenous cells. A6, B6, branched paraphyses. A7, B7, immature conidia. A8, B8, mature conidia. Scale bars A4, B4 = 20 μ m; A5, B5 = 5 μ m; A6–A8, B6–B8 = 10 μ m.

3.4 Pathogenic characterization

3.4.1 Pathogenicity on mango fruits

All 23 isolates of *Lasiodiplodia* inoculated into mango fruits developed an abundant dark grey mycelial mat after 4 days, causing necrotic round lesions on the epidermis that evolved to soft rot after the seventh day of incubation. *Lasiodiplodia pontae* caused the largest necrotic lesions (30.3 mm), though not significantly different from *L. brasiliense*, *L. caatinguensis* and *L. theobromae*, which caused injuries with an average diameter of 26.33 mm (Fig. 4). *Lasiodiplodia euphorbicola* and *L. pseudotheobromae* were less harmful to mango fruits and did not differ from each other, causing minor injuries, with an average diameter of 15.55 mm. However, *L. pseudotheobromae* showed the slowest growth rate (14.1 mm/day), differing from all other species that showed 18.7 mm/day growth rate on average.

3.4.2 Pathogenicity on cashew, soursop and yellow mombin plants

In cashew seedlings, all of the *Lasiodiplodia* species produced necrotic lesions, cankers, and gum exudations 15 days after inoculation. The species *L. brasiliense* (50.3 mm), *L. caatinguensis* (46 mm) and *L. theobromae* (45 mm) caused the largest necrotic lesions. The other species produced injuries with an average length of 37.5 mm, which were not significantly different from each other (Fig. 4). During this period, isolates of *L. brasiliense*, *L. pseudotheobromae* and *L. theobromae* developed gum exudation in 80% of the inoculated plants (data not shown).

Similar to cashew, all of the isolates inoculated into soursop produced necrotic cankers, gum exudation and plant death, with *L. brasiliensis* (62.5 mm), *L. euphorbicola* (56.6 mm) and *L. pontae* (57 mm) causing the largest lesion sizes, although not significantly different from each other. In comparison, *L. caatinguensis* produced smaller lesions (36.8 mm). *Lasiodiplodia pseudotheobromae* and *L. theobromae* caused minor injuries, with an average of 23.8 mm, and were not significantly different from each other (Fig. 4).

All of the isolates were able to cause disease in the seedlings of yellow mombin 45 days after inoculation, presenting gum exudation on necrotic lesions and cankers,

and some became dry and dead. *Lasiodiplodia brasiliense* (32.1 mm), *L. caatinguensis* (32.6 mm), *L. pontae* (19 mm) and *L. theobromae* (20.7 mm) led to larger lesions, but were not significantly different from one another, followed by *L. pseudotheobromae* and *L. euphorbicola*, which caused minor injuries but were not significantly different from one another (Fig. 4).

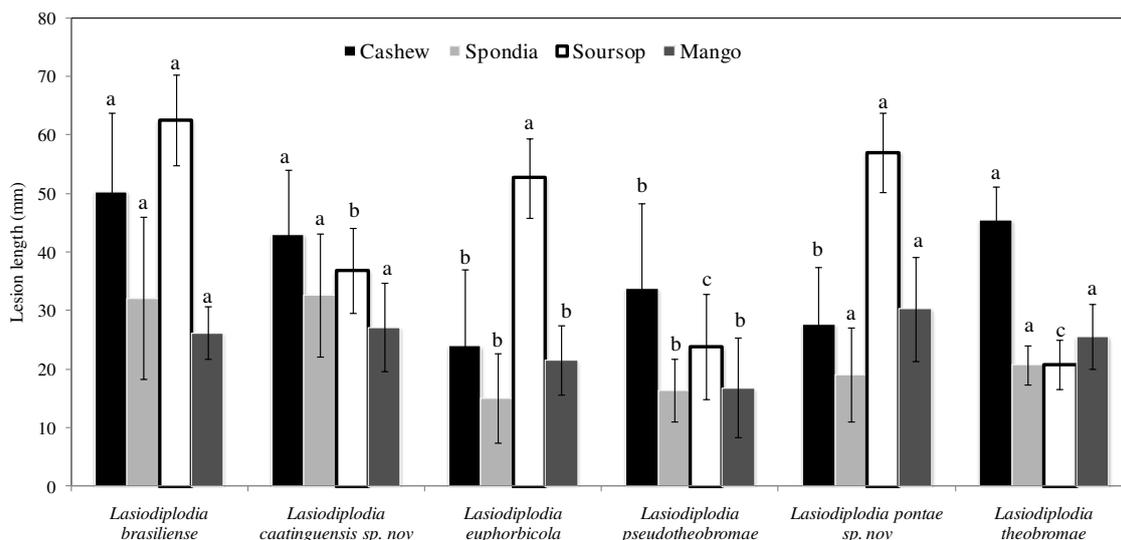


Figure 4 Mean lesion length (mm) caused by six *Lasiodiplodia* species associated with dieback and stem-end rot in several tropical fruit from the northeast of Brazil: 4 days after inoculation with mycelium-colonized agar plugs onto wounded fruits of mango cultivar Tommy Atkins, and 15 days after inoculation with mycelium-colonized agar plugs onto wounded seedlings of cashew, soursop and *Spondias* sp. Bars above columns are the standard error of the mean. For each host, columns with the same letter do not differ significantly according to Scott–Knott test at $\alpha = 0.05$.

4 Discussion

This is the first study of *Lasiodiplodia* species associated with the plants cashew, hog plum (*Spondias purpurea* and *S. lutea*), tamarind (*Tamarindus indica*), coconut (*Cocos nucifera*), orange (*Citrus sinensis*) and *Annona* sp. from northeastern Brazil. It was supported by data based on morphological characterizations, pathogenicity and phylogenetic analysis based on three gene regions (ITS, *TEF1-a* and *β -tub*). Survey searching for plants showing gummosis and/or dieback most frequently identified diseased cashew plants, indicating the impact of *Lasiodiplodia* on this crop. *Spondias* species, with a lower frequency of disease, were commonly grown in areas surrounding orchards and the backyards of houses, thus acting as alternative host plants and a reservoir for *Lasiodiplodia* species.

Based on phylogeny, 27 *Lasiodiplodia* clades were formed, two of which were not grouped into species previously reported in the literature; therefore, they are described here as new species (Fig. 1). Six species of *Lasiodiplodia* associated with various tropical fruits in northeastern Brazil were identified as follows: *Lasiodiplodia brasiliense* M. S. B. Netto, M. W. Marques & A. J. L. Phillips; *L. theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl, *L. pseudotheobromae* A. J. L. Phillips, A. Alves & Crous; *L. euphorbicola* A. R. Machado & O. L. Pereira; *L. caatinguensis* sp. nov. and *L. pontae* sp. nov. With the exception of *L. pseudotheobromae* and *L. theobromae*, all of the others that were identified in this study have only been reported in Brazilian crops (Correia *et al.*, 2013, 2016; Marques *et al.*, 2013; Machado *et al.*, 2014a,b; Netto *et al.*, 2014).

Twenty-six species of *Lasiodiplodia* have been described in the world, but only eight of them have been associated with Brazilian hosts: *L. iraniensis* in *M. indica* in the state of Pernambuco (Marques *et al.*, 2013.), *L. hormozganensis* in *C. papaya* and *Vitis vinifera* in the state of Pernambuco (Marques *et al.*, 2013; Netto *et al.*, 2014; Correia *et al.*, 2016), *L. egyptiaca* in *M. indica* and *V. vinifera* in the state of Pernambuco (Marques *et al.*, 2013; Correia *et al.*, 2016) and *J. curcas* in the state of Minas Gerais (Machado *et al.*, 2014a), *L. crassispora* in *M. indica* and *V. vinifera* in the state of Pernambuco (Marques *et al.*, 2013; Correia *et al.*, 2016), *L. parva* in *V. vinifera* (Correia *et al.*, 2013), and *L. jatrophiicola*, *L. subglobosa* and *L. macrospora* in *J. curcas* in the state of Minas Gerais (Machado *et al.*, 2014a); nevertheless, none of these species were identified in this study, which probably implies an association with geographic origin and/or host species. Additional studies are needed to investigate this group of pathogens in different unexploited biomes in Brazil.

Studies on the Botryosphaeriaceae family, dealing with the phylogenetic traits and morphology of isolates associated with various hosts, have increased in recent years, enabling the identification of taxons at the genus level and of cryptic species around the world (Phillips *et al.*, 2013; Linaldeddu *et al.*, 2015). It should be noted that to date, except for the state of Pernambuco, only *L. theobromae* has been associated with dieback, gummosis and dry rot of tropical fruits in northeastern Brazil, mostly in Ceará state (Freire *et al.*, 2002, 2011; Lima *et al.*, 2013). Although these studies were based solely on morphological and pathogenicity data, a great pathogenic variability was observed among isolates from different locations and hosts, which concurs with the

findings of higher species diversity than observed in the past. The newly described *L. caatinguensis* sp. nov. was the most frequent species in the present study, comprising 30.4% of isolates, and was associated with cashew plants, hog plum (*S. purpurea* and *S. lutea*) and orange in the states of Ceará and Piauí. This was among the most aggressive species upon inoculation in different hosts. This species was found to be phylogenetically close to *L. exigua* isolated from vine branches in North Africa, as described by Linaldeddu *et al.* (2015); however, it can easily be distinguished as having larger conidia than others and having 11 different nucleotides in the *TEF1- α* region and 5 nucleotides in the ITS. As for pathogenicity, when inoculated into mango fruits and seedlings of *Spondias* sp., it showed no difference in severity from *L. brasiliense*, *L. pontae* and *L. theobromae*; however, it exhibited more aggressiveness than *L. euphorbicola* and *L. pseudotheobromae*, which were statistically equal in severity. In cashew seedlings, *L. caatinguensis* was among the most aggressive species, equal to *L. brasiliense* and *L. theobromae*. However, in soursop seedlings, this species was not the most aggressive, causing injuries significantly less severe than *L. brasiliense*, *L. euphorbicola* and *L. pontae*.

Lasiodiplodia theobromae was the second most common species, with 17.4% of the isolates in this study, and was associated with dieback symptoms in hog plum (*S. purpurea*), pitomba (*T. esculenta*) and cashew in the states of Ceará and Piauí, indicating its polyphagous ability. In all of the studies conducted in Brazil involving gene sequencing, this species was detected as the most common, but not the most virulent (Correia *et al.*, 2013, 2016; Marques *et al.*, 2013; Machado *et al.*, 2014a,b; Netto *et al.*, 2014). Phylogenetic studies indicated that, as well as the aforementioned phenomenon, there is low posterior probability support between the internal branches of the *L. theobromae* clade, indicating a large intraspecific diversity in this species (Pavlic *et al.*, 2004; Begoude *et al.*, 2010; Ismail *et al.*, 2012; Marques *et al.*, 2013). After several phylogenetic studies of *L. theobromae sensu lato*, from 2004 to the present day, including sampled plants and areas previously unexplored, it was shown how this morphological species is complex, harbouring several cryptic species with various hosts in different geographical locations (Pavlic *et al.*, 2004, 2008; Burgess *et al.*, 2006; Damm *et al.*, 2007; Alves *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2010; Abdollahzadeh *et al.*, 2010; Ismail *et al.*, 2012; Linaldeddu *et al.*, 2015).

Lasiodiplodia pseudotheobromae occurred at the same frequency as *L. theobromae*, with 17.4% of isolates, taken from branches and stems showing dieback and necrosis in hog plum, tamarind and cashew. Described by Alves *et al.* (2008) as being associated with the *Acacia*, *Citrus*, *Coffea*, *Gmelina* and *Rosa* species, this species has been reported in Brazil to cause stalk rot of fruits of papaya and mango, dieback of *J. curcas*, *Vitis vinifera* and *Manihot esculenta* (Marques *et al.*, 2013; Machado *et al.*, 2014a,b; Netto *et al.*, 2014; Correia *et al.*, 2016). Since its description, this species has been identified around the world as being associated with numerous hosts (Abdollahzadeh *et al.*, 2010; Begoude *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2010; Sakalidis *et al.*, 2011; Ismail *et al.*, 2012), which highlights its increasing dissemination, distribution and wide host range, similar to *L. theobromae*. With respect to pathogenicity compared to other species, *L. pseudotheobromae* isolates examined in this study were less aggressive when inoculated into mango fruit, corroborating the results of Marques *et al.* (2013), Netto *et al.* (2014) and Correia *et al.* (2016) in mango fruits, papaya and young branches of grape, respectively, as well as in cashew seedlings, yellow mombin and soursop; this is the first report on these hosts. However, this species was highly virulent in mango fruits in Australia (Sakalidis *et al.*, 2011), in *M. indica* seedlings in Egypt (Ismail *et al.*, 2012) and in young trees of *Terminalia catappa* in Cameroon (Begoude *et al.*, 2010), indicating that this species has a wide variability in virulence and that Brazilian isolates obtained here probably represent a population with low virulence.

Another new species described in this study called *L. pontae* sp. nov. was isolated from *S. purpurea* and *A. occidentale* plants, forming a well-supported phylogenetic clade by Bayesian inference. This species was virulent in all of the inoculated hosts, showing less virulence only in cashew seedlings. *Lasiodiplodia euphorbicola* = *L. marypalme*, synonymized by Correia *et al.* (2016), found in this study associated with sweetsop trees and coconut, has recently been described in Brazil in *J. curcas* plants by Machado *et al.* (2014a) in the region of Minas Gerais and Espírito Santo and has already been reported in the northeast as being associated with grape plants (Correia *et al.*, 2016) and fruits of papaya (Netto *et al.*, 2014).

Lasiodiplodia brasiliense was isolated from the sapodilla tree (*M. zapota*), mango and hog plum (*S. purpurea*). It proved to be pathogenic in mango fruits, cashew seedlings, soursop and *Spondias* sp. In mango fruits and *Spondias* seedlings, there was no difference in the virulence of *L. caatinguensis*, *L. pontae* and *L. theobromae*, which

showed greater virulence than *L. euphorbicola* and *L. pseudotheobromae*. In cashew seedlings, *L. brasiliense* did not differ in virulence from *L. caatinguensis* and *L. theobromae*. In soursop seedlings they were also among the most virulent, together with *L. pontae* and *L. euphorbicola*. *Lasiodiplodia brasiliense* was described and first reported in Brazil as causing stalk rot in papaya fruit (Netto *et al.*, 2014) and was subsequently associated with dieback of grape vines (Correia *et al.*, 2016). In both studies, it was reported as being quite aggressive, and its occurrence is still restricted to the Brazilian territory. As to its pathogenicity, when inoculated into papaya fruits and young grape branches, there was no difference in virulence between *L. pseudotheobromae* and *L. theobromae* on papaya fruit (Netto *et al.*, 2014) but it was the most virulent in vine, standing out from other inoculated species (Correia *et al.*, 2016).

In recent years, many studies have been developed to establish a parallel between molecular data and cultural characteristics, such as size, shape and septation of paraphyses, conidia, and conidiogenous cell growth and pigment production in different culture media at different temperatures, for the differentiation among *Lasiodiplodia* species (Pavlic *et al.*, 2004, 2008; Burgess *et al.*, 2006; Damm *et al.*, 2007; Alves *et al.*, 2008; Abdollahzadeh *et al.*, 2010; Begoude *et al.*, 2010; Ismail *et al.*, 2012; Úrbez-Torres *et al.*, 2012; Marques *et al.*, 2013; Netto *et al.*, 2014; Linaldeddu *et al.*, 2015; Correia *et al.*, 2016). For the cultural characteristics of the *Lasiodiplodia* species in the present study, they all grew above 10 °C except for *L. caatinguensis* and *L. euphorbicola*, which only grew above 15 °C, and no species was able to grow at 40 °C. In general, the optimum temperature for growth of these species ranges from 25 to 30 °C. Except for *L. caatinguensis*, these cultural characteristics resemble some studies that have found that all of these species are able to grow at 10 °C (Abdollahzadeh *et al.*, 2010; Marques *et al.*, 2013, Netto *et al.*, 2014; Correia *et al.*, 2016); however, Alves *et al.* (2008) and Ismail *et al.* (2012) noted that only *L. pseudotheobromae* grew at this temperature. All species, except *L. euphorbicola*, produced a reddish pink pigment at temperatures of 35 °C, as reported by Alves *et al.* (2008), which showed a pigment in *L. pseudotheobromae* but not *L. theobromae*. Abdollahzadeh *et al.* (2010) reported pigment production in all species, including *L. theobromae*. There is no data in the literature on pigment production in *L. brasiliensis* and *L. euphorbicola*. Given these observations, it should be noted that data based on the morphophysiological parameters of microorganisms vary according to environmental and climatic conditions.

All of the species identified in this study were able to infect mango fruits, cashew seedlings, soursop and *Spondias* spp. to various degrees of severity, indicating that the fungus formerly known as *L. theobromae* is a complex of different cryptic species and not the only one responsible for causing dieback in tropical fruits in northeastern Brazil. The detection of these species of *Lasiodiplodia* on different hosts and in different geographical locations in Brazil as well as around the world demonstrates the polyphagous and cosmopolitan behaviour of this pathogen. Indeed it is evident that performing complementary studies based on sequencing at least three gene regions in the genome of cryptic *Lasiodiplodia* species is important in order to support reliable species identification. Such studies are essential to support more appropriate control measures for this group of pathogens.

Acknowledgements

This work is part of the first author's doctoral research project. The authors thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES) for financial support of the doctoral fellowship of the first author at the Graduate Programme in Agronomy from the Universidade Federal do Ceará. The authors would also like to thank the Embrapa Agroindústria Tropical for technical and scientific support. Finally, they are grateful to Dr Olinto Liparini Pereira for the support given to this work.

5 References

- Abdollahzadeh J, Jvadi A, Mohammadi-Goltapeh E, Zare R, Phillips AJL, 2010. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia* **25**, 1–10.
- Alves A, Crous PW, Correia A, Phillips AJL, 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic species in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity* **28**, 1–13.
- Begoude BAD, Slippers B, Wingfield MJ, Roux J, 2010. Botryosphaeriaceae associated with *Terminalia catappa* in Cameroon, South Africa and Madagascar. *Mycological Progress* **9**, 101–23.
- Burgess TI, Barber PA, Mohali S, Pegg G, de Beer W, Wingfield MJ, 2006. Three new

- Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia* **98**, 423–35.
- Carbone I, Anderson JB, Kohn LM, 1999. A method for designing primer sets for the speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* **91**, 553–6.
- Cardoso CEL, Sousa JS, 2000. Tropical fruit growing: perspectives and tendencies. *Revista Econômica do Nordeste* **31**, 84–95.
- Cardoso JE, Vidal JC, Santos AA, Freire FCO, Viana FMP, 2002. First report of black branch dieback of cashew caused by *Lasiodiplodia theobromae* in Brasil. *Plant Disease* **86**, 558.
- Cardoso JE, Viana FMP, Santos AA, Morais MH, 2006. Detection and control *Lasiodiplodia theobromae* in seeds *Annona muricata* L. *Embrapa Agroindústria Tropical Bulletin of Research and Development* **27**, 22.
- Cavalcanti JJV, Wilkinson MJ, 2007. The first genetic maps of cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Euphytica* **157**, 131–43.
- Correia KC, Câmara MPS, Barbosa MAG *et al.*, 2013. Fungal trunk pathogens associated with table grape decline in Northeastern Brasil. *Phytopathologia Mediterranea* **52**, 380–7.
- Correia KC, Silva MA, de Morais Jr MA *et al.*, 2016. Phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of table grape in the main Brazilian exporting region. *Plant Pathology* **65**, 92–103.
- Crous PW, Slippers B, Wingfield MJ *et al.*, 2006. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology* **55**, 235–53.
- Chen S, Li G, Liu F, Michailides TJ, 2015. Novel species of Botryosphaeriaceae associated with shoot blight of pistachio. *Mycologia* **107**, 780–92.
- Damm U, Crous PW, Fourie PH, 2007. Botryosphaeriaceae as potential pathogens of *Prunus* in South Africa, with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. *Mycologia* **99**, 664–80.
- FAO, 2014. *FAOSTAT*. [<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>]. Accessed 10 March 2014.
- Freire FCO, 2014. Microbiological deterioration of cashew kernels: a difficult problem to solve. *Agricultural Sciences* **15**, 37–48.
- Freire FCO, Cardoso JE, Santos AA, Viana FMP, 2002. Diseases of cashew nut plants (*Anacardium occidentale* L.) in Brasil. *Crop Protection* **21**, 489–94.

- Freire FCO, Cardoso JE, Viana FMP, Martins MVV, 2011. Status of *Lasiodiplodia theobromae* as a plant pathogen in Brasil. *Essentia* **12**, 53–71.
- Glass NL, Donaldson GC, 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 1323–30.
- Hall T, 2012. BIOEDIT v. 7.0.9: Biological sequence alignment editor for Win95/98/2K/XP/7. [<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>]. Accessed 15 November 2014.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), 2015. Banco de dados agregados. [<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp?t=2&z=t&o=11&u1=3&u3=3&u4=1&u5=1&u6=1&u2=1>]. Accessed 30 June 2015.
- Ismail AM, Cirvilleri G, Polizzi G, Crous PW, Groenewald JZ, Lombard L, 2012. *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica*) in Egypt. *Australasian Plant Pathology* **41**, 649–60.
- Lima JS, Moreira RC, Cardoso JE, Martins MVV, Viana FMP, 2013. Cultural, morphological and pathogenic characterization of *Lasiodiplodia theobromae* associated with tropical fruit plants. *Summa Phytopathologica* **39**, 81–8.
- Linaldeddu BT, Deidda A, Scanu B *et al.*, 2015. Diversity of Botryosphaeriaceae species associated with grapevine and other woody hosts in Italy, Algeria and Tunisia, with descriptions of *Lasiodiplodia exígua* and *Lasiodiplodia mediterranea* sp. nov. *Fungal Diversity* **71**, 201–14.
- Machado AR, Pinho DB, Pereira OL, 2014a. Phylogeny, identification and pathogenicity of the Botryosphaeriaceae associated with collar and root rot of the biofuel plant *Jatropha curcas* in Brasil, with a description of new species of *Lasiodiplodia*. *Fungal Diversity* **67**, 231–47.
- Machado AR, Pinho DB, Oliveira SAS, Pereira OL, 2014b. New occurrences of Botryosphaeriaceae causing black root rot of cassava in Brasil. *Tropical Plant Pathology* **39**, 464–70.
- Marques MW, Lima NB, Morais JRMA *et al.*, 2013. Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brasil. *Fungal Diversity* **61**, 181–93.
- Mohali BS, Burgess TI, Wingfield MJ, 2005. Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence

- repeat markers. *Forest Pathology* **35**, 385–96.
- Moreira RC, Lima JS, Silva LGC, Cardoso JE, 2013. Resistance to gummosis in wild cashew genotypes in northern Brasil. *Crop Protection* **52**, 10–3.
- Netto MSB, Assunção IP, Lima GSA, 2014. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brasil. *Fungal Diversity* **67**, 127–41.
- Pavlic D, Slippers B, Coutinho TA, Gryzenhout M, Wingfield MJ, 2004. *Lasiodiplodia gonubiensis* sp. nov., a new Botryosphaeria anamorph from native *Syzygium cordatum* in South Africa. *Studies in Mycology* **50**, 313–22.
- Pavlic D, Wingfield MJ, Barber P, Slippers B, Hardy GESTJ, Burgess TI, 2008. Seven new species of the Botryosphaeriaceae from baobab and other native trees in Western Australia. *Mycologia* **100**, 851–66.
- Pereira AL, Silva GS, Ribeiro VQ, 2006. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. *Fitopatologia Brasileira* **31**, 572–8.
- Phillips AJL, Alves A, Abdollahzadeh J *et al.*, 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology* **76**, 51–167.
- Posada D, Buckley TR, 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology* **53**, 793–808.
- Sakalidis ML, Ray JD, Lanoiselet V, Hardy GESTJ, Burgess TI, 2011. Pathogenic Botryosphaeriaceae associated with *Mangifera indica* in the Kimberley Region of Western Australia. *European Journal of Plant Pathology* **130**, 379–91.
- Santos-Serejo JA, Dantas JLL, Vaz Sampaio C, Coelho YS, 2009. *Fruticultura Tropical: Espécies Regionais e Exóticas*. Brasília, Brazil: Embrapa Informação Tecnológica.
- Slippers B, Wingfield MJ, 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* **21**, 90–106.
- Slippers B, Boissin E, Phillips AJL *et al.*, 2013. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriales: a systematic and evolutionary framework. *Studies in Mycology* **76**, 31–49.
- Swofford DL, 2000. *PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates.

- Rambaut A, 2009. FIGTREE v. 1.2.2. [<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>]. Accessed 30 July 2015.
- Ronquist F, Heulsenbeck JP, 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**, 1572–4.
- Úrbez-Torres JR, Peduto F, Striegler RK *et al.*, 2012. Characterization of fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Arkansas and Missouri. *Fungal Diversity* **52**, 169–89.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J, 1990. 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*. New York, NY, USA: Academic Press, 315–22.
- Zhao JP, Lu Q, Liang J, Decock C, Zhang XY, 2010. *LasioidipIodia pseudotheobromae* a new record of pathogenic fungus from some subtropical and tropical trees in southern China. *Mycologia* **31**, 431–9.

CAPÍTULO II

Ocorrência e caracterização de *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* e *Pseudofusicoccum* associados a cajueiro, mangueira e goiabeira no nordeste brasileiro

RESUMO

Anacardiáceas, como o cajueiro (*Anacardium occidentale*) e a mangueira (*Mangifera indica*) se destacam dentre as espécies frutíferas de maior distribuição e expressão econômica no Nordeste brasileiro. Com isso e pela busca por aumentos na produção e conseqüentemente com o aumento na exploração dessas culturas houve o favorecimento da disseminação de doenças fúngicas no Nordeste, sobretudo as causadas por espécies de Botryosphaeriaceae. Diante disto, objetivou-se com este trabalho realizar a caracterização molecular, morfofisiológica e patogênica de isolados dos gêneros *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* e *Pseudofusicoccum*. Plantas com sintomas de morte descendente e cancos em caules e ramos foram amostradas e fragmentos desses tecidos foram plaqueados em meio de cultura batata cenoura ágar (BCA). A caracterização molecular foi realizada através do sequenciamento gênico das regiões do espaçador interno transcrito (ITS) e do fator de alongação 1 alpha (TEF1- α) do DNA e por meios de inferências filogenéticas. A morfofisiologia dos isolados foi obtida através de mensurações de conídios e do crescimento em diferentes meios de cultura e temperaturas; e a patogenicidade dos mesmos foi averiguada através da inoculação em diferentes hospedeiros. De acordo com a análise filogenética dos isolados, suportada por inferências Bayesianas, foi possível a identificação de: *Neofusicoccum kwambonambiense*, *Neoscytalidium hyalinum* e *Pseudofusicoccum stromaticum* em cajueiro, caracterizando-se como um primeiro relato na cultura; *Neoscytalidium hyalinum* em mangueira e *N. brasiliense* em goiabeira, primeiro relato nesta cultura, e ambos considerados primeiro relato no estado do Ceará e do Piauí. Com exceção a *N. brasiliense*, que originalmente não possui caracterização morfológica em sua descrição, e do isolado *N. kwambonambiense*, que não esporulou, os demais isolados apresentaram conídios com dimensões compatíveis com as descrições originais. O isolado de *N. brasiliense* identificado apresentou conídios com 21,30 x 10,18 μm de comprimento e largura, respectivamente, evidenciando a primeira descrição morfológica da espécie na literatura. Todos os isolados mostraram-se virulentos a frutos de manga, e a plantas jovens de cajueiro e umbu-cajá, causando lesões necróticas e exsudação de resina pelos hospedeiros. Os isolados de *Neofusicoccum* mostraram-se dentre os mais agressivos aos hospedeiros inoculados.

Palavras-chave: *Anacardium occidentale*; Morte descendente; Botryosphaeriaceae
Filogenia.

ABSTRACT

Anacardiaceae family, as cashew (*Anacardium occidentale*) and mango (*Mangifera indica*) stand out among the fruit species of wider distribution and economic impact in northeastern Brazil. The search for increased production provided increases in its exploration which favored the spread of new diseases caused by species of Botryosphaeriaceae fungus family in the region. Thus, the aim of this study was to characterize species of genus *Neofusicoccum*, *Pseudofusicoccum* and *Neoscytalidium* using molecular, morphophysiological and pathogenic methods. Plants showing symptoms such as dieback and stem and branch cankers were sampled and fragments of these tissues were plated on carrot potato agar medium (CPA). Fungus identification was carried out by morphological and molecular characterization of conidia and for the later it was accomplished by using phylogenetic inference based on sequence alignment and multigenic regions of the internal transcribed spacer (ITS) and elongation factor 1- α (EF1- α) DNA in sense and antisense direction. Phylogenetic analysis of the isolated, supported by Bayesian inferences allowed the first identifications of *Neofusicoccum kwambonambiense*, *Neoscytalidium hyalinum* and *Pseudofusicoccum stromaticum* in cashew; *Neoscytalidium hyalinum* in mango; and *N. brasiliense* in guava plants. This is the first report of *N. brasiliense* in guava and all these fungus species are reported for the first time in the Brazilian states of Ceará and Piauí. Except *N. brasiliense*, which shows no morphological description in the literature, and isolated *N. kwambonambiense*, all other species showed conidia within the range of previous descriptions in the literature. The isolated *N. brasiliense* identified presented conidia with 21.30 x 10.18 μm in length and width, respectively, showing the first morphological description of the species. All isolates were virulent to mango fruit and to young cashew and yellow mombin (*Spondia mombin*) plants, causing necrotic lesions and gummosis. *Neofusicoccum* isolates were shown the most aggressive when inoculated into these hosts.

Key words: *Anacardium occidentale*; dieback; Botryosphaeriaceae; Phylogeny

1 INTRODUÇÃO

A família botânica Anarcadiaceae engloba frutíferas tropicais de grande importância socioeconômica para o Nordeste brasileiro (PICKEL, 2008). Dos 80 gêneros e 600 espécies presentes na família, cerca de 13 gêneros e 68 espécies ocorrem no Brasil (BARROSO, 1991), dentre as quais o cajueiro (*Anacardium occidentale*) e a mangueira (*Mangifera indica*) se destacam dentre como as espécies frutíferas de maior expressão, distribuídas nos mais diversos biomas nordestinos, das extensas faixas litorâneas até as áreas da Caatinga (GONÇALVES *et al.*, 2016; MARQUES *et al.*, 2013b). Diante da grande importância dessas culturas para a agricultura, houve um aumento na exploração visando proporcionar um aumento na produção, sendo inevitável o uso de mais técnicas como podas, métodos de propagação mais eficientes, o uso de reguladores de crescimento e outros, os quais promovem maiores estresses às plantas e bem como um aumento na ocorrência, frequência e estabelecimento de doenças fúngicas (FREIRE, 1991; TAVARES 2002).

Dentre essas doenças, as provocadas pelos fungos da família Botryosphaeriaceae se destacam nesses e em outros patossistemas, por serem patógenos que se aproveitam de plantas fisiologicamente enfraquecidas ou submetidas a condições de estresse. Por isso, essa interação é alvo de vários de estudos que visam à identificação e a caracterização das espécies envolvidas na problemática, com o objetivo de fomentar bases empíricas na busca de métodos específicos e eficientes para o controle dessas enfermidades (COSTA *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2013; MARQUES *et al.*, 2013a,b; ABDOLLAHZADEH *et al.* 2013; ISMAIL *et al.*, 2012).

Por muito tempo sintomas de cancos e morte descendente em Anarcadiáceas e outras famílias botânicas estavam associados apenas a espécie *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl (FREIRE *et al.*, 2011; PAVILIC *et al.*, 2004). No entanto, com o advento da filogenia molecular, estudos demonstram que este quadro sintomatológico se encontra associados a um complexo de espécies crípticas do gênero *Lasiodiplodia* e de outros gêneros da família Botryosphaeriaceae, nos quais se destacam: *Neofusicoccum* Crous Slippers & A.J.L. Phillips 2006; *Neoscytalidium* Crous & Slippers, 2006; *Pseudofusicoccum* Mohali, Slippers & Wingf (SAKALIDIS *et al.*, 2013; MARQUES *et al.*, 2013b; MACHADO *et al.*, 2014; BERRAF-TEBBAL *et al.*, 2014; GONÇALVES *et al.*, 2016).

Fungos dessa família caracterizam-se por serem cosmopolita e infectare todas as partes das plantas (DENMAN *et al.*, 2000; MACHADO *et al.*, 2014). Quanto à patogenicidade, não apresentam tanta especificidade, podendo variar dependendo do hospedeiro. Ecologicamente, eles podem ter hábitos saprofíticos, parasitários, endofíticos e de patógenos latentes (DENMAN *et al.*, 2000; SAKALIDIS *et al.* 2013; SLIPPERS & WINGFIELD, 2007).

Em sua fase anamórfica, os gêneros *Neofusicoccum*, *Pseudofusicoccum* e *Neoscytalidium*, apresentam conídios do tipo *Fusicoccum*, com formatos estreitos, de elipsóides a ligeiramente ovóides, com paredes finas, os tornando morfológicamente semelhantes (CROUS *et al.*, 2006). Nesta fase, são frequentemente encontrados na natureza, de fácil isolamento, abundante crescimento micelial em determinados meios de culturas, porém apresentam baixa esporulação (CROUS *et al.*, 2006; PHILLIPS *et al.*, 2013). Muitas vezes, tais características morfológicas são insuficientes para a identificação tanto de gêneros e sendo quase impossível a identificação em nível de espécie, sendo imprescindível a utilização de ferramentas moleculares para o alcance de um diagnóstico preciso (PHILLIPS *et al.*, 2013).

Com o uso do sequenciamento gênico, a filogenia desses gêneros passa por frequentes atualizações devido a constante descrição de novas espécies, bem como o relato de novas associações entre patógenos, hospedeiros e distribuição geográfica (PHILLIPS *et al.*, 2013; SAKADILIS *et al.*, 2013). Estudos filogenéticos indicam que o sequenciamento de pelo menos duas regiões do genoma de *Neofusicoccum*, *Pseudofusicoccum* e *Neoscytalidium* são suficientes para delimitar suas espécies, no qual a combinação de regiões do DNA ribossomal, dentre essas os Espaçadores Internos Transcritos (ITS), com regiões codificadoras de proteína, dentre essas o Fator de Elongação 1-alfa (TEF-1 α) se destacam (MARQUES *et al.*, 2013a; PHILLIPS *et al.*, 2013; MACHADO *et al.*, 2014).

Contabilizando um total de 22 espécies de *Neofusicoccum* (BERRAF-TEBBAL *et al.*, 2014), duas para *Neoscytalidium* e seis para *Pseudofusicoccum* (PHILLIPS *et al.*, 2013) no Brasil, a associação destes gêneros à patossistemas é recente, porém se tornando a cada vez mais frequente (LOPES *et al.*, 2014; GONÇALVES *et al.*, 2016). Na fase endofítica, esses fungos foram isolados em associação com várias plantas arbóreas da caatinga cearense e postulados como agentes patogênicos em potencial quando inoculados em frutos de manga e árvores de umbu-cajá (*Spondia* spp.)

(GONÇALVES *et al.*, 2016). Em sua forma patogênica foram associados à morte descendente e podridão peduncular de frutos de manga (MARQUES *et al.*, 2013b); enquanto, *Neoscytalidium hyalinum* foi associado à podridão negra radicular de tubérculos de mandioca (*Manihot esculenta*) (MACHADO *et al.*, 2014b) e em plantas de pinhão-manso (*Jatropha curcas*) (MACHADO *et al.*, 2014a).

Em cajueiro e outras frutíferas típicas da flora presente no Nordeste brasileiro, a presença de cancos e morte descendentes, eram associados a espécies de *Lasiodiplodia*, sendo então caracterizadas e descritas duas novas espécies envolvidas nesses patossistemas (COUTINHO *et al.*, 2016). Diante da presença de isolados com conídios de morfologia diferente a de *Lasiodiplodia*, objetivou-se nesse estudo realizar a caracterização molecular e patogênica dos mesmos, que foram previamente identificados, através da morfologia, como pertencente aos gêneros de conídio do tipo *Fusicoccum*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta de amostras e obtenção dos isolados

As amostras vegetais foram obtidas durante o período de julho a novembro de 2013 a partir de frutíferas tropicais que apresentavam sintomas de morte descendente e cancos em caules e ramos.

As amostras vegetais foram oriundas dos estados do presente estudo foram dos seguintes estados: Ceará (78 amostras), Paraíba (2 amostras), Pernambuco (6 amostras), Piauí (16 amostras) e Rio Grande do Norte (4 amostras). No geral, 44 amostras foram de cajueiro, 28 amostras de *Spondias* spp., oito amostras de mangueiras, quatro de coqueiros, 12 de anonáceas e outras nove amostras oriundas de fruteiras diversas (mamão, tamarindo, acerola, banana, laranja, pitomba, sapoti, murici e goiaba). Destas amostras, foram obtidos 108 isolados de Botryosphaeriaceae associados a cancro e morte descendente de caules e ramos. Destes isolados, seis deles apresentaram conídios morfológicamente diferentes a *Lasiodiplodia* spp., sendo este o principal gênero associado a esta sintomatologia em fruteiras no Nordeste brasileiro, e até então único gênero de Botryosphaeriaceae associado a cultura do cajueiro.

As amostras vegetais foram encaminhadas e examinadas no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Agroindústria, Fortaleza, Ceará. A obtenção dos isolados

fúngicos se deu através de isolamentos indiretos a partir de cortes oriundos dos tecidos vegetais de cada amostra (aproximadamente 20 pedaços de 5 mm) localizados na área de transição do tecido sadio e doente. Posteriormente, a superfície desses tecidos foram esterilizada com álcool 70% (30 s), hipoclorito de sódio (2 min) e lavados duas vezes em água esterilizada. Desses cortes, cinco pedaços foram colocados em placas de Petri (90 mm), contendo meio de cultura batata cenoura ágar (BCA), com acículas de *Pinus* esterilizadas, sob a superfície de cada meio quando solidificado. As condições de isolamento, incubação, repicagens e obtenção de culturas monospóricas foram obtidas seguindo a metodologia descrita por Coutinho *et al.*, (2016).

Após esporulação e verificações microscópicas os isolados que apresentavam conídios de morfologia do tipo *Fusicoccum* foram encaminhados para a extração e amplificação de DNA. Após estas etapas e conclusão das análises filogenéticas, os isolados foram caracterizados morfofisiologicamente e quanto a sua patogenicidade.

2.2 Caracterização molecular

2.2.1 Extração, amplificação e sequenciamento de DNA

As extrações e amplificações de DNA dos isolados foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Agroindústria Tropical.

Para a extração e amplificação do DNA dos isolados, utilizou-se a massa micelial de cada isolado, obtida a partir do cultivo dos mesmos em meio de cultura líquido batata dextrose (BD), por sete dias em erlenmeyer de 250 ml e incubados a temperatura ambiente (25 °C a 30 °C). Após esse período, a massa micelial foi retirada do meio de cultura e posta para secar por 24h a temperatura ambiente (25 °C a 30 °C).

O protocolo de extração utilizado foi o proposto por Cavalcanti & Wilkinson (2007) com modificações. A quantificação do DNA foi determinada através da utilização de um NanoDrop® 2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific), version 1.0, sendo então diluído a concentração de 10 ng μL^{-1} e armazenado a -20 °C.

A amplificação de fragmentos do DNA foi feita por Reação da Cadeia da Polimerase (PCR) com um mix para uma reação nas seguintes concentrações: 62,5 ng de DNA genômico, buffer 1X, 0,2 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl_2 , 1 μL de cada primer (seno e anti-senso) e 2,5 U de Taq DNA Polimerase. O volume de água deionizada e esterilizada utilizado foi ajustado para reações com volume final de 50 μL .

Os primers utilizados nas reações de PCR foram o ITS1 e o ITS4 (White *et al.*, 1990) e o TEF1-688F e TEF1-1251R (Alves *et al.*, 2008). Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% com Tris Borato EDTA 1X (TBE; 89 mM de Tris, 89 mM de boric acid, 2 mM EDTA), corado com brometo de etídio (5 mg mL⁻¹) e visualizado em transluminador UV.

Após a confirmação das ampliações nos géis de agarose, alíquotas de 40 µL do produto de PCR de cada amostra (isolado) foram enviadas para a empresa Macrogen Inc., Korea do Sul (<http://www.macrogen.com>) para a purificação e sequenciamento na direção senso e antisenso do produto oriundo de cadaa par de iniciadores.

2.2.2 Análises filogenéticas

Com os eletroferogramas enviados pela Macrogen, as sequências contigs de cada isolado foram visualizadas utilizando o programa Bioedit (Hall, 2012) por meio de edições na direção senso e antisenso de cada iniciador sequenciado. Para compor as análises filogenéticas, duas sequências ITS e TEF1- α de todas as espécies já descritas dos gêneros *Fusicoccum*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* e *Pseudofusicoccum* foram importadas no formato fasta do banco de dados do National Center of Biotechnological Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e uma sequência de *Macrophomina phaseolina* foram utilizadas para enraizar a árvore filogenética gerada.

Ainda no Bioedit, utilizando a ferramenta CLUSTALW, alinhamentos das sequências ITS e TEF1- α contendo as sequências a serem analisadas (Tabela 1), foram obtidos separadamente. Após esse procedimento, sequências geradas destes alinhamentos foram concatenadas em um arquivo do Bioedit, na ordem ITS seguida de TEF1- α , com o objetivo de obter um único alinhamento, chamado de alinhamento múltiplo de genes. Este alinhamento foi corrigido manualmente e gaps (-) foram utilizados sempre que necessário para dados em falta.

As relações filogenéticas foram inferidas pelo método de inferência Bayesiana (IB) utilizando o método de Cadeia de Markov de Monte Carlo, para cada gene separado, e os modelos de substituição de nucleotídeos foram determinados utilizando o programa MrMODELTEST 2.3 (Posada & Buckley, 2004) de acordo com o Critério de Informação Bayesiana (BIC). Após essa aferição, o alinhamento múltiplo (ITS+ TEF1- α) foi analisado utilizando o programa MrBayes v.3.1.1 (RONQUIST &

HEULSENBECK, 2003) com 100 milhões de gerações tendo cada árvore filogenética um espaço de amostra para executar a cada 500 gerações.

As árvores filogenéticas geradas foram visualizadas no programa FigTree (RAMBAUT, 2009) e exportadas para edição em programas gráficos. Sequências dos isolados identificados no presente estudo (Tabela 1) foram depositadas no banco de dados GenBank no site da NCBI e o alinhamento múltiplo na plataforma TreeBASE (<http://www.treebase.org/>) sob o número 19422.

Tabela 1. Isolados utilizados para a construção filogenética, com seus respectivos hospedeiros, localizações geográfica de isolamento, coletores das amostras e código de acesso as sequências ITS e TEF1- α no banco de dados do Genbank. Fortaleza, Ceará, 2016.

Espécie	Isolado	Hospedeiro	Localização	Coletor	ITS	TEF1-α
<i>Fusicoccum atrovirens</i>	CMW 22682	<i>Pterocarpus angolensis</i>	África	J. Mehl/J. Roux	FJ888476	FJ888457
<i>F. atrovirens</i>	CMW 22674	<i>Pterocarpus angolensis</i>	África	J Mehl/J. Roux	FJ888473	FJ888456
<i>F. fabicercianum</i>	CMW 24703	<i>Eucalyptus grandis</i>	China	M.J.Wingfield/X.D.Zhou	HQ332195	HQ332211
<i>F. fabicercianum</i>	CMW 27094	<i>Eucalyptus sp.</i>	China	M.J. Wingfield	HQ332197	HQ332213
<i>F. ramosum</i>	CBS122069	<i>Eucalyptuscamaldulensis</i>	Austrália	D. Pavlic	EU144055	EU144070
<i>Macrophomina phaseolina</i>	PD112	<i>Prunus dulcis</i>	Austrália	D Pavlic/MJ. Wingfield	GU251105	GU251237
<i>Neofusicoccum algeriense</i>	CBS137504	<i>Vitis vinifera</i>	Algeria	A. Berraf-Tebbal	KJ657702	KJ657715
<i>N. algeriense</i>	ALG9	<i>Vitis vinifera</i>	Algeria	A. Berraf-Tebbal	KJ657704	KJ657721
<i>N. andinum</i>	CBS 117453	<i>Eucalyptus sp.</i>	Venezuela	S. Mohali	AY693976	AY693977
<i>N. andinum</i>	CBS 117452	<i>Eucalyptus sp.</i>	Venezuela	M.J. Wingfield	DQ306263	DQ306264
<i>N. arbuti</i>	CBS 116131	<i>Arbutus menziesii</i>	UEA	M. Elliott	GU251152	GU251284
<i>N. arbuti</i>	CBS 117090	<i>Arbutus menziesii</i>	UEA	M. Elliott	GU251154	GU251286
<i>N. australe</i>	CMW 6837	<i>Acacia sp.</i>	Austrália	M.J. Wingfield	AY339262	AY339270
<i>N. australe</i>	CMW 6853	<i>Sequoiadendron</i>	Austrália	M.J. Wingfield	AY339263	AY339271
<i>N. batangarum</i>	CMW 28363	<i>Terminalia catappa</i>	África	D. Begoude/J. Roux	FJ900607	FJ900653
<i>N. batangarum</i>	CMW 283205	<i>Terminalia catappa</i>	África	D. Begoude/J. Roux	FJ900608	FJ800654
<i>N. brasiliense</i>	CMM 1269	<i>Mangifera indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX513629	JX513609
<i>N. brasiliense*</i>	IBL447	<i>Psidium guajava</i>	Cruz/CE/Brasil	IBL Coutinho/ JS Lima	KT247455	KT247457
<i>N. brasiliense</i>	CMM 1285	<i>Mangifera indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX513628	JX513608
<i>N. cordaticola</i>	CMW 13992	<i>Syzigium cordatum</i>	África	D. Pavlic	EU821898	EU821868
<i>N. cordaticola</i>	CMW 14056	<i>Syzigium cordatum</i>	África	D. Pavlic	EU821903	EU821873
<i>N. eucalyptorum</i>	CBS 115791	<i>Eucalyptus grandis</i>	Africa	H. Smith	AF283686	AY236891
<i>N. eucalyptorum</i>	CMW 10126	<i>Eucalyptus grandis</i>	Africa	H. Smith	AF283687	AY236892
<i>N. eucalypticola</i>	CMW 6217	<i>Eucalyptus rossii</i>	Austrália	M.J. Wingfield	AY 615143	AY615135
<i>N. eucalypticola</i>	CMW 6539	<i>Eucalyptus rossii</i>	Austrália	M.J. Wingfield	AY 615141	AY615133
<i>N. kwambonambiense</i>	CMW 14023	<i>Syzigium cordatum</i>	África	D. Pavlic	EU821900	EU821870

Continuação da tabela 1...

Espécie	Isolado	Hospedeiro	Localização	Coletor	Genbank	
					ITS	TEF1- α
<i>N. kwambonambiense</i>	CMW 14140	<i>Syzigium cordatum</i>	África	D. Pavlic	EU821949	EU821889
<i>N. kwambonambiense</i>	IBL220	<i>Anarcadium occidentale</i>	Pio IX/PI/Brasil	IBL Coutinho/JS Lima	KT247454	KT247456
<i>N. luteum</i>	CMW 9076	<i>Malus × domestica</i>	Nova Zelândia	S.R. Pennycook	AY 236946	AY236893
<i>N. luteum</i>	CBS 110299	<i>Vitis vinifera</i>	Portugal	A.J.L. Phillips	AY 259091	AY573217
<i>N. macroclavatum</i>	WAC 12445	<i>Eucalyptus globulus</i>	Austrália	T.I. Burgess	DQ093197	DQ093218
<i>N. macroclavatum</i>	WAC 12446	<i>Eucalyptus globulus</i>	Austrália	T.I. Burgess	DQ093198	DQ093219
<i>N. mangiferum</i>	CMW 7024	<i>Mangifera indica</i>	Austrália	G.I. Johnson	AY615185	DQ093221
<i>N. mangiferum</i>	CMW 7797	<i>Mangifera indica</i>	Austrália	G.I. Johnson	AY 615186	DQ093220
<i>N. mediterraneum</i>	PD 311	<i>Olea europea</i>	Itália	C. Lazzizera	GU251175	GU251307
<i>N. mediterraneum</i>	PD 312	<i>Eucalyptus sp.</i>	Grécia	M.J. Wingfield/A.J.L. Phillips	GU251176	GU251308
<i>N. nonquaesitum</i>	PD 484	<i>Umbellularia californica</i>	UEA	F. P. Trouillas	GU251163	GU251295
<i>N. nonquaesitum</i>	PD 301	<i>Vaccinium corymbosum</i>	Chile	J.G. Espinoza/B.A. Latorre	GU251185	GU251317
<i>N. oculatum</i>	CBS 128008	<i>Eucalyptus grandis</i>	Austrália	T.I. Burgess	EU7301030	EU339509
<i>N. oculatum</i>	MUCC 296	<i>Eucalyptus pellita</i>	Austrália	T.I. Burgess	EU301034	EU339512
<i>N. parvum</i>	PD 106	<i>Prunus dulcis</i>	UEA	T.J. Michailides	GU251139	GU251271
<i>N. parvum</i>	CMM 1291	<i>Mangifera indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX513633	JX513613
<i>N. ribis</i>	CMW7054	<i>Ribis rubrum</i>	UEA	B Slippers	AF241177	AY236879
<i>N. ribis</i>	CMW 7772	<i>Ribis sp.</i>	UEA	B. Slippers/G.Hudler	AY236925	AY236877
<i>N. ursorum</i>	CBS 122811	<i>Eucalyptus arboretum</i>	África	H.M. Maleme	FJ752746	FJ752709
<i>N. ursorum</i>	CMW 23790	<i>Eucalyptus arboretum</i>	África	H.M. Maleme	FJ752745	FJ75270
<i>N. umdonicola</i>	CMW 14058	<i>Syzigium cordatum</i>	África	D. Pavlic	EU821934	EU821874
<i>N. umdonicola</i>	CMW 14060	<i>Syzigium cordatum</i>	África	D. Pavlic	EU821935	EU821875
<i>N. viticlavatum</i>	STE-U 5044	<i>Vitis vinifera</i>	África	F. Halleen	AY343381	AY 343342
<i>N. viticlavatum</i>	STE-U 5041	<i>Vitis vinifera</i>	África	F. Halleen	AY343380	AY343341
<i>N. vitifusiforme</i>	STE-U 5050	<i>Vitis vinifera</i>	África	J.M. Van Niekerk	AY343382	AY343344
<i>N. vitifusiforme</i>	STE-U 5252	<i>Vitis vinifera</i>	África	J.M. Van Niekerk	AY343383	AY343343
<i>Neoscytalidium hyalinum</i>	PD 103	<i>Ficus carica</i>	UEA	T.J. Michailides	GU251106	GU251238
<i>Ne. hyalinum</i>	WAC 13284	<i>Mangifera indica</i>	Austrália	J. Ray	GU172382	GU172414
<i>Ne. hyalinum</i>	IBL89	<i>Mangifera indica</i>	Varjota/CE/Brasil	IBL Coutinho/JS Lima	KT247460	KT247458

Continuação da tabela1...

Espécie	Isolado	Hospedeiro	Localização	Coletor	GenBank	
					ITS	TEF1- α
<i>Ne. hyalinum</i>	IBL272	<i>Anarcadium occidentale</i>	Pio IX/PI/Brasil	IBL Coutinho/JS Lima	KT247461	KT247459
<i>Ne. novaehollandiae</i>	WAC 13275	<i>Mangifera indica</i>	Austrália	J. Ray	GU172400	GU172432
<i>Ne. novaehollandiae</i>	WAC 13303	<i>Mangifera indica</i>	Austrália	J. Ray	GU172398	GU172430
<i>Pseudofusicoccum ardesiacum</i>	WAC 13299	<i>Mangifera indica</i>	Austrália	J. Ray	GU172404	EU144075
<i>P. ardesiacum</i>	CBS 122062	<i>Adansonia gibbosa</i>	Austrália	D. Pavilic	EU144060	GU172437
<i>P. adansoniae</i>	CBS 122054	Eucalyptus sp.	Austrália	D. Pavilic	EF585532	EF585570
<i>P. adansoniae</i>	WAC 13299	M. indica	Austrália	J. Ray	GU172404	GU172436
<i>P. kimberleyense</i>	CBS 122061	<i>F. opposita</i>	Austrália	D. Pavilic	EU144059	EU144074
<i>P. kimberleyense</i>	WAC 13293	<i>Mangifera indica</i>	Austrália	J. Ray	GU172406	GU172438
<i>P. stromaticum</i>	CMW 13435	<i>Eucalyptus hybrid</i>	Venezuela	S. Mohali	DQ436935	DQ436936
<i>P. stromaticum</i>	CMM 3953	<i>Mangifera indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464102	JX464109
<i>P. stromaticum</i>	CMM 3961	<i>Mangifera indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464103	JX464110
<i>P. stromaticum</i>	IBL500	<i>Anarcadium occidentale</i>	Pio IX/PI/Brasil	IBL Coutinho/JS Lima	KT247464	KT247462
<i>P. stromaticum</i>	IBL36	<i>Anarcadium occidentale</i>	Quixadá/CE/Brasil	IBL Coutinho/JS Lima	KT247465	KT247463
<i>P. olivaceum</i>	CMW22639	<i>Pterocarpus angolensis</i>	África	J Mehl & J Roux	FJ888463	FJ888439
<i>P. olivaceum</i>	CMW20881	<i>Pterocarpus angolensis</i>	África	J Roux	FJ888459	FJ888437
<i>P. violaceum</i>	CMW22671	<i>Pterocarpus angolensis</i>	África	J Mehl & J Roux	FJ888472	FJ888441
<i>P. violaceum</i>	CMW20436	<i>Pterocarpus. angolensis</i>	África	J Roux	FJ888458	FJ888440

*Isolados destacados em negrito foram obtidos dos isolamentos fúngicos desse estudo. Abreviaturas: EUA: Estados Unidos da América. PI: Piauí; CE: Ceará; ITS: Espaçadores Internos Transcrito da região do DNA ribossomal; TEF1- α : gene da da região codificadora de proteína fator de alongação 1- α ; GenBank: banco de dados da NCBI (National Center for Biotechnology Information), disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

2.4 Caracterização morfofisiológica

Para o dimensionamento da largura e comprimento dos conídios, os isolados foram cultivados em meio BCA contendo acículas de *Pinus* esterilizadas. Placas foram incubadas, por aproximadamente de 20 a 30 dias, a 25 °C com 12 h de fotoperíodo expostas a luz negra, até o desenvolvimento dos primeiros picnídios.

Usando agulhas esterilizadas, picnídios foram manualmente removidos e rompidos para a montagem de lâminas coradas com uma gota de lactofenol e observados através de um microscópio de luz. Trinta medidas foram tomadas das principais características morfológicas descritas na literatura. As imagens foram obtidas com uma câmera digital, ICc5 131 AxioCam, acoplado a um microscópio (Carl Zeiss AG Imager.A2 Ltd) e um dispositivo de imagem, Motic Imagem mais 2,0 (Motic Group Co.).

Para a caracterização das espécies quando expostas a diferentes temperaturas, cada isolado foi cultivado em placas de Petri (90 mm) com meio BDA e mantidos incubados a temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 °C, com 12 h de fotoperíodo a uma luz branca fluorescente. Diariamente o diâmetro das colônias foi mensurado através do crescimento micelial. Com as médias dos diâmetros foram determinados o efeito das temperaturas sob crescimento micelial dos isolados. As médias foram submetidas à análise de regressão com o objetivo de determinar a temperatura ótima de crescimento para cada espécie.

Para caracterização das espécies em crescimento em vários meios de cultura, com exceção para a espécie *N. kwambonambiens*, foram utilizados os meios de cultura: batata dextrose ágar (BDA sintético, 39 g L⁻¹), BCA (20g de batata, 20 g de cenoura, 17 g de ágar, 1 L de água), suco V8 (100 mL de V8, 2 g de CaCO₃, 17 g de ágar, 900 mL de água); Aveia-ágar (75 g de aveia, 17 g de ágar, 1 L de água), Extrato de Malte-ágar (MEA, 20 g de extrato de malte, 20 g de dextrose, 1 g de peptona, 20 g de Agar, 1 L de Água) e um meio a base de ramos de cajueiro ágar e dextrose (200g de ramos verdes de cajueiro, 17g de dextrose, 17 g de Agar, 1 L de água).

As placas foram mantidas à 25 °C e fotoperíodo de 12 h. Diariamente, até o terceiro dia de incubação, o diâmetro das colônias foi mensurado em duas direções

perpendiculares. O crescimento máximo (mm) e a taxa de crescimento micelial (mm dia^{-1}) de cada espécie foram estimados com as médias das medições.

Ambos experimentos *in vitro* foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), onde cada placa representava uma unidade experimental. Os valores médios foram submetidos a análise de variância (ANOVA), comparados por meio do teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância. Para os resultados em diferentes meios de cultura, utilizou-se um esquema fatorial de 5×3 (cinco meios versus três espécies) para visualizar a interação entre os fatores.

2.5 Caracterização patogênica

Os seis isolados identificados neste estudo foram inoculados em frutos de manga cv. Tommy Atkins e em caules de plantas jovens de cajueiro e umbu-cajá. A metodologia utilizada para a inoculação dos frutos foi descrita por Marques *et al.*, (2013b) e para as plantas jovens por Lima *et al.*, (2013) ambas conduzidas nas mesmas condições experimentais propostas por Coutinho *et al.*, (2016).

Em frutos, o diâmetro das lesões foi medido diariamente por sete dias, com o auxílio de um paquímetro digital, em mm. Nas plantas, a avaliação se deu ao 15º dia após a inoculação, no qual foram feitos cortes longitudinais e paralelos ao ponto de inoculação a fim mensurar, com o auxílio de um paquímetro digital, em mm, a lesão necrótica provocada por cada isolado.

As médias dos diâmetros das lesões nos frutos no 4º dia e nos caules das plantas jovens aos 15º dia após a inoculação foram utilizadas na análise estatísticas dos dados. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), consistindo em seis repetições, onde cada repetição foi composta por um fruto ou por uma planta jovem de cada espécie vegetal.

Os valores médios de crescimento foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e comparados por meio do teste de Scott-Knott a 5% de significância. Os valores do progresso da doença em frutos de manga foram plotados em equações de regressão não lineares a fim de verificar o comportamento.

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização molecular

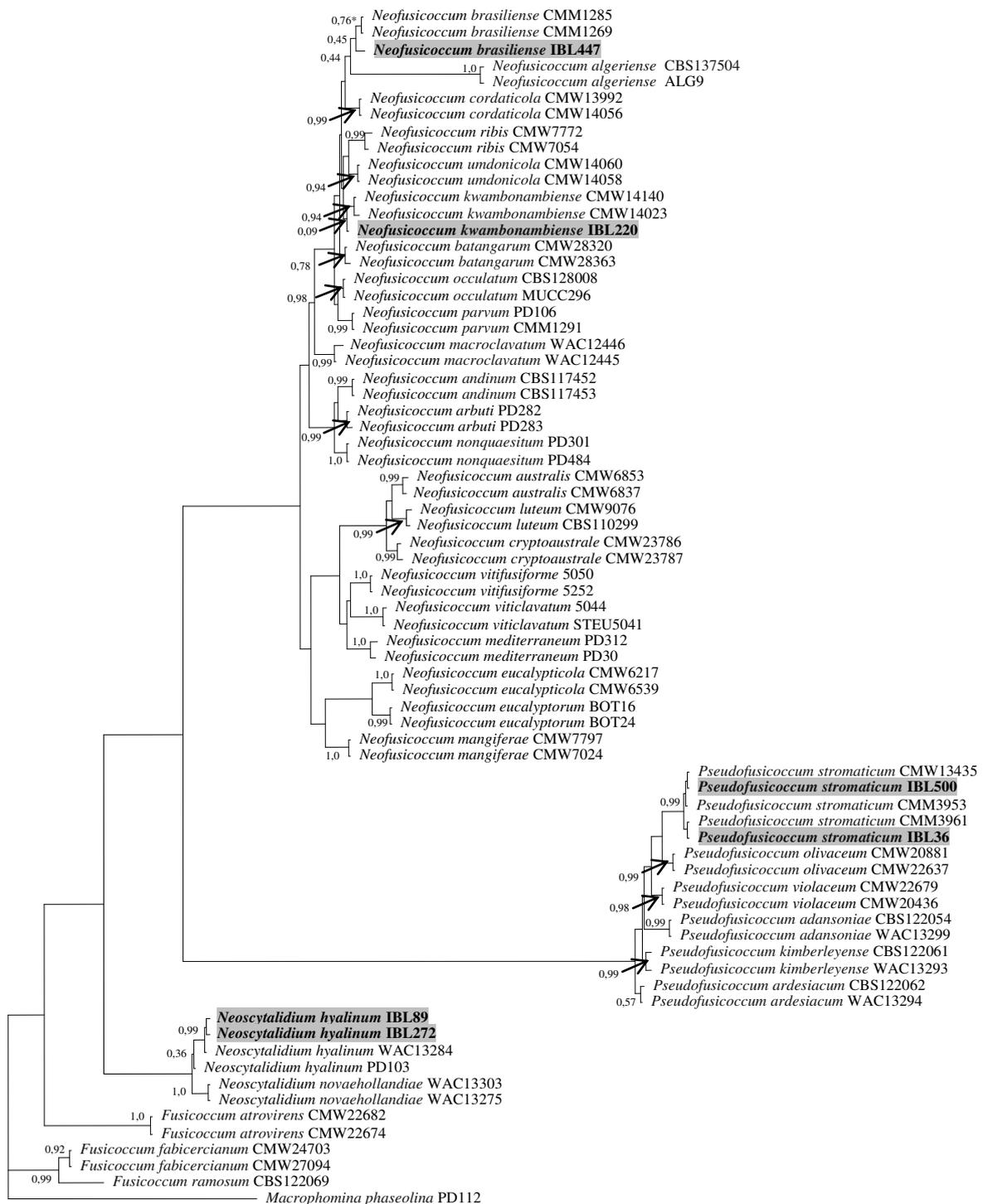
Um total de seis isolados foram sequenciados para as regiões ITS (ITS1/ITS4) e TEF-1 α (EF1-688F/EF1-1251R). O alinhamento concatenado foi obtido das sequências ITS e TEF-1 α dos isolados nesse estudo e das sequências de isolados ex-tipo de espécies de Botryosphaeriaceae retiradas do Genbank (Tabela 1). A árvore filogenética gerada (Figura 1) foi inferida por análise Bayesiana (IB) utilizando os modelos do Critério de Informação Bayesiana (BIC): TrNef+G para a região ITS e K80+G para a região TEF-1 α .

O alinhamento concatenado, que foi depositado no TreeBASE sob a numeração 19422, foi composto por 74 táxons, onde sequências ITS foram do nucleotídeo 1 ao 382 e TEF-1 α do 383 ao 674, contabilizando um total de 382 e 291 pares de base (pb) para cada gene, respectivamente. Logo, dos 674 caracteres presentes no alinhamento concatenado, 402 deles mostraram-se conservados, 258 variáveis e 234 parcimônia informativos.

A árvore filogenética (Figura 1) foi composta por 74 táxons, compondo 22 clados com espécies de *Neofusicoccum*, seis clados com espécies de *Pseudofusicoccum*, dois clados com espécies de *Neoscytalidium*, três clados com espécies de *Fusicoccum* e um clado com *Macrophomina phaseolina*. Os isolados identificados nesse estudo se agruparam: com a espécie *N. kwambonambiense* (IBL220) obtidos de plantas de goiabeira localizadas no estado do Ceará; com *N. brasiliense* (IBL447) obtidos de plantas de cajueiro localizadas do estado do Piauí; com *Ne. hyalinum* obtidos de cajueiro no estado do Piauí (IBL272) e de mangueira no estado do Ceará (IBL89); e com *P. stromaticum* obtidos de cajueiro no Ceará (IBL36) e no Piauí (IBL500) (Tabela 1).

Verificou-se que mesmo diante da formação de clados bem definidos, houveram baixos valores de suportes de inferência Bayesiana para os clados *N. brasiliense* e *N. kwambonambiens* (Figura 1). Tal evidência será melhor analisada através da análise filogenética isolada de cada gênero encontrados na caracterização. Para as demais espécies o concatenamento de sequências ITS mais TEF-1 α foram suficientes para a definição das mesmas, apresentando valores de suporte de 99% de probabilidade por IB.

Figura 1. Árvore filogenética inferida a partir da análise Bayesiana através da combinação das sequências referentes as regiões gênicas ITS e TEF-1 α .



*Valores indicados acima dos nós da árvore filogenética referem-se as probabilidades posteriores obtidas através da inferência Bayesiana. A árvore filogenética foi enraizada por um isolado da espécie *Macrophomina phaseolina* de código PD112. Os isolados das espécies identificadas nesse estudo estão na árvore filogenética destacados em negrito e com realce da cor cinza. Abreviaturas: ITS (Espaçadores Internos Transcritos), TEF-1 α (Fator de Elongação 1 alpha)

3.3 Caracterização morfofisiológica

A morfologia conidiais dos isolados de todas as espécies identificadas nesse estudo, com exceção ao isolado da espécie *N. kwambonambiense* (IBL220), foram comparadas com as descrições morfológicas de cada espécie obtidas na literatura (Tabela 2).

Com exceção ao isolado da espécie *N. kwambonambiense*, as demais produziram picnídios no meio BCA mais acículas de *Pinus* com aproximadamente quatro semanas de incubação a 25 °C e exposição a luz negra.

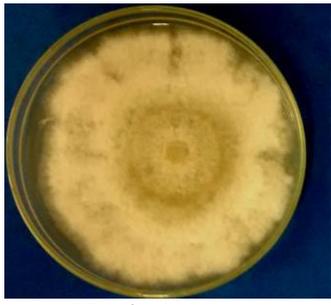
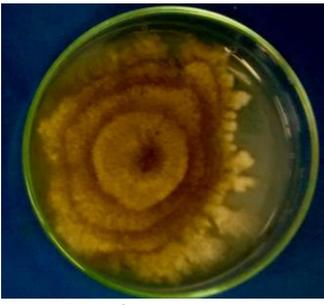
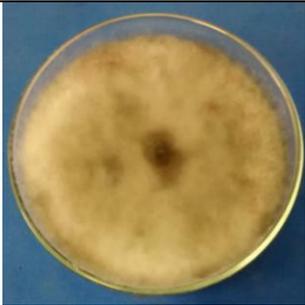
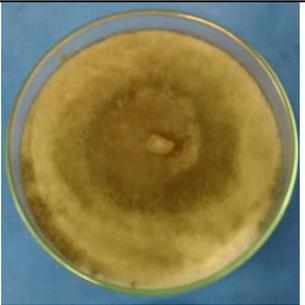
O isolado de *P. stromaticum* apresentou dimensões conidiais bem próximas as do isolado primeiramente descrito na literatura por Mohali et al. (2006) e aos isolados já relatados em território brasileiro por Marques *et al.*, (2013b). O isolado da espécie *N. kwambonambiense* (IBL220) não apresentou esporulação nas condições do presente estudo. As dimensões dos conídios do isolado *N. brasiliense* (IBL447) não foram comparadas com nenhum outro isolado da mesma espécie uma vez que sua descrição original foi baseada apenas em dados moleculares por Marques *et al.*, (2013) sendo até então não relato em outros estudos. Aspectos morfológicos das colônias dos isolados, em BDA, e de seus conídios produzidos em BCA, podem ser visualizados na Figura 2.

Tabela 2. Dimensões morfológicas conidiais dos isolados das espécies de Botryosphaeriaceae identificadas nesse estudo, com exceção ao isolado da espécie *Neofusicoccum kwambonambiense*, em comparação com as descrições morfológicas originais de cada espécie, com exceção ao isolado de *Neofusicoccum brasiliense*.

Isolados	C x L (µm)	C/L	Referência
<i>Neocytalidium hyalinum</i>	19,93 (24,83) 27,91 x 8,88 (10,46) 11,93	2,37	Neste estudo
	10–16(–21)×3.5–6.5	-	Phillips et al. 2013
<i>Neofusicoccum brasiliense</i>	10,72 (21,30) 25,57 x 8,31 (10,18) 11,94	2,09	Neste estudo
<i>Neofusicoccum kwambonambiense</i>	16 (22,3) 28 × 5 (6,3) 8	3,6	Crous et al. 2006
<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	20,05 (26,01) 31,46 x 5,18 (6,39) 7,6	4,09	Neste estudo
	(19–)20–23(–24) × 5,0 (4,0) 6,0	4,0	Mohali et al. 2006

Abreviaturas: C: Comprimento; L: Largura; C/L: relação entre o comprimento e a largura.

Figura 2. Aspectos morfológicos das colônias dos isolados de Botryophariaceae identificados nesse estudo quando cultivados em meio de cultura BDA, e de seus conídios quando produzidos em meio de cultura BCA sob acículas de *Pinus*, a 25 °C e exposição à luz negra. Fortaleza, Ceará, 2016.

Morfologia das colônias dos isolados em meio de cultura BDA		Morfologia de conídios produzidos em meio de cultura BCA + acículas de <i>Pinus</i>
		
<i>Neoscytalidium hyalinum</i> IBL89	<i>Neoscytalidium hyalinum</i> IBL272	<i>Neoscytalidium hyalinum</i> IBL89
		
<i>Neofusicoccum kwambonambiense*</i> IBL220	<i>Neofusicoccum kwambonambiense</i> IBL220	<i>Neofusicoccum brasiliense</i> IBL447
		
<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i> IBL36	<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i> IBL500	<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i> IBL500

*Colônias de coloração mais esbranquiçadas estão com quatro dias de crescimento e de coloração mais escurecidas com 15 dias de crescimento em meio de cultura BDA. O isolado *Neofusicoccum kwambonambiense* não esporulou em meio de cultura.

Verificou-se que todos os isolados apresentaram comportamento polinomial quadrático durante seu crescimento, quando submetidos às temperaturas variando de 5 a 40 °C (Tabela 3). Segundo a análise de regressão, os isolados *N.brasiliense*, *N. kwambonambiense* e *P. stromaticum* (IBL36), apresentaram temperaturas ótimas de crescimento abaixo de 26 °C. Até o terceiro dia de crescimento, nenhum isolado atingiu o diâmetro total das placas de Petri (90 mm). Espécies de *Ne. hyalinum* e *P. stromaticum* apresentaram crescimento somente a partir de 15 °C e *Neofusicoccum* spp. a 10 °C. Somente os isolados de *Ne. hyalinum* esboçou crescimento a 40 °C (20,22 mm) (dados não mostrados).

Tabela 3. Crescimento micelial (mm) das espécies de Botryosphaeriaceae em suas respectivas temperaturas ótimas de crescimento.

Espécies	Isolado	Temp. ideal ¹ (°C)	Máximo crescimento (mm) ²	Equação*	R ²
<i>N. brasiliense</i>	IBL447	24,09	86,33	$y = -0,29x^2 + 14,11x - 83,71$	0,85
<i>N. kwambonambiense</i>	IBL220	23,40	70,98	$y = -0,26x^2 + 12,29x - 72,87$	0,73
<i>Ne. hyalinum</i>	IBL89	26,43	85,03	$y = -0,23x^2 + 12,47x - 79,86$	0,78
<i>Ne. hyalinum</i>	IBL272	26,11	82,25	$y = -0,24x^2 + 12,48x - 80,77$	0,75
<i>P. stromaticum</i>	IBL500	26,05	51,24	$y = -0,16x^2 + 8,41x - 58,35$	0,52
<i>P. stromaticum</i>	IBL36	24,24	51,14	$y = -0,1634x^2 + 7,92x - 44,9$	0,82

¹Temperatura em que o patógeno alcançou o crescimento máximo. ²Crescimento micelial máximo ao terceiro dia de incubação na temperatura ideal de crescimento. *Equação de regressão e coeficiente de correlação que representam o comportamento polinomial dos isolados nas temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25,30, 35, 40 °C.

Quanto às características miceliais até o terceiro dia de incubação todos os isolados apresentaram pouca massa micelial, de coloração esbranquiçada que se tornavam escurecidas ao longo dos dias de incubação.

Quanto ao crescimento micelial (mm) em diferentes meios de cultura, verificou-se interação positiva entre os fatores (Figura 3A), porém não observando interação entre os fatores para o parâmetro taxa de crescimento (Figura 3B).

Os meios BDA, V8, MEA e AvA favoreceram 100% do crescimento de *Neocytalidium hyalinum* e *Neofusicoccum* sp. não diferindo entre si, uma vez que apenas o meio V8 conseguiu o mesmo efeito para a espécie *P. stromaticum*. Os meios de CajuDA e BCA foram os que menos favoreceram o crescimento micelial das três espécies estudadas, notando que apenas *Neofusicoccum* sp. atingiu 100% do seu crescimento em CajuDA.

Quanto as espécies, pode-se notar que *Neocytalidium hyalinum* apresentou 100% de crescimento (90 mm) nos meios de cultura BDA, V8, MEA e AvA, uma vez que nos meios a base de CajuDA e BCA seu crescimento foi paralisado atingindo

respectivamente apenas 66,66% e 38% do seu crescimento. No entanto, para esta mesma espécie, sua taxa de crescimento não apresentou diferenciação entre os meios, com exceção a ao meio BCA, que a proporcionou crescimento de 10 mm dia⁻¹, enquanto os demais proporcionaram entre 35 a 50 mm dia⁻¹ (Figura 3A,B).

Para *Neofusicoccum* sp. apenas o meio BCA não favoreceu seu crescimento micelial (Figura 2A), no entanto, quando a taxa de crescimento os meios V8 (50 mm dia⁻¹) e BDA (45 mm dia⁻¹) se destacaram entre os meios de cultura utilizados (Figura 3B).

Já *P. stromaticum* apresentou muita variação em seu crescimento frente aos meios de cultura, observando crescimento máximo apenas em meio V8, e não se diferenciando quando cultivada nos meios BDA, MEA e AvA, notando que os meios CajuDA e BCA não favoreceram seu desenvolvimento micelial (Figura 3A,B).

Figura 3. Crescimento micelial (A) e taxa de crescimento (B) *in vitro* das espécies de Botryosphaeriaceae ao terceiro dia de incubação em diferentes meios de cultura.

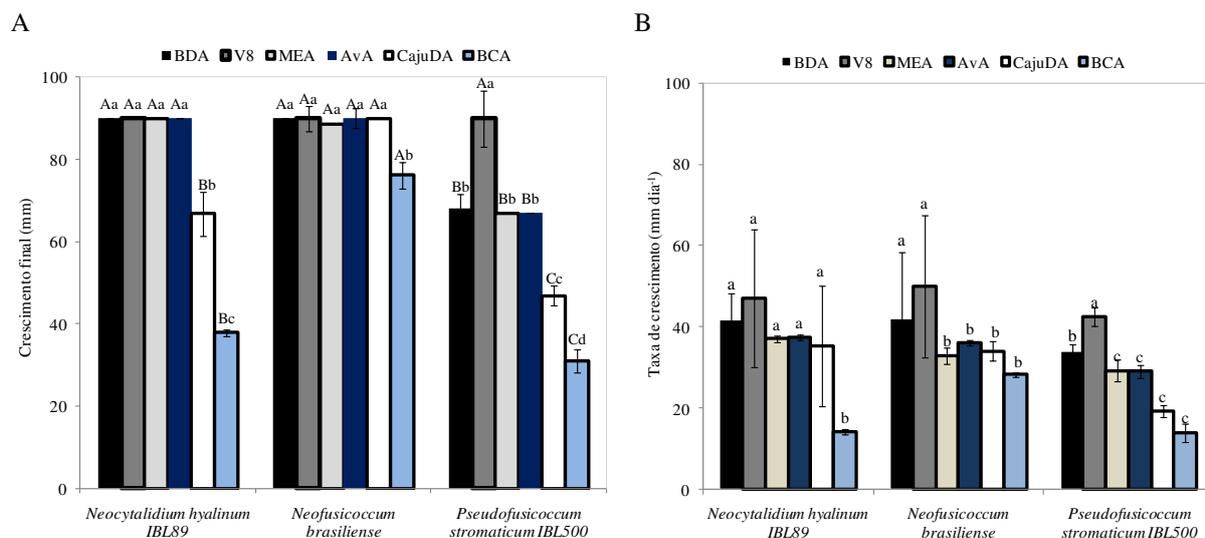


Fig.3A. Houve interação positiva entre os fatores meios de cultura *versus* espécies. Logo, letras maiúsculas iguais para cada meio de cultura dentro do fator espécie, não diferirem entre si; e letras minúsculas iguais dentro do fator espécie para cada meio de cultura não diferirem entre si; as médias foram comparadas por meio do teste de Scott-Knott a $P=0.05$.

Fig.3B. Não houve interação positiva entre os fatores meios de cultura *versus* espécies. Logo, médias seguidas das mesmas letras minúsculas dentro de cada espécie não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a $P=0.05$.

3.4 Patogenicidade e virulência em frutos de manga e plantas jovens de *Spondias* sp. e cajueiro

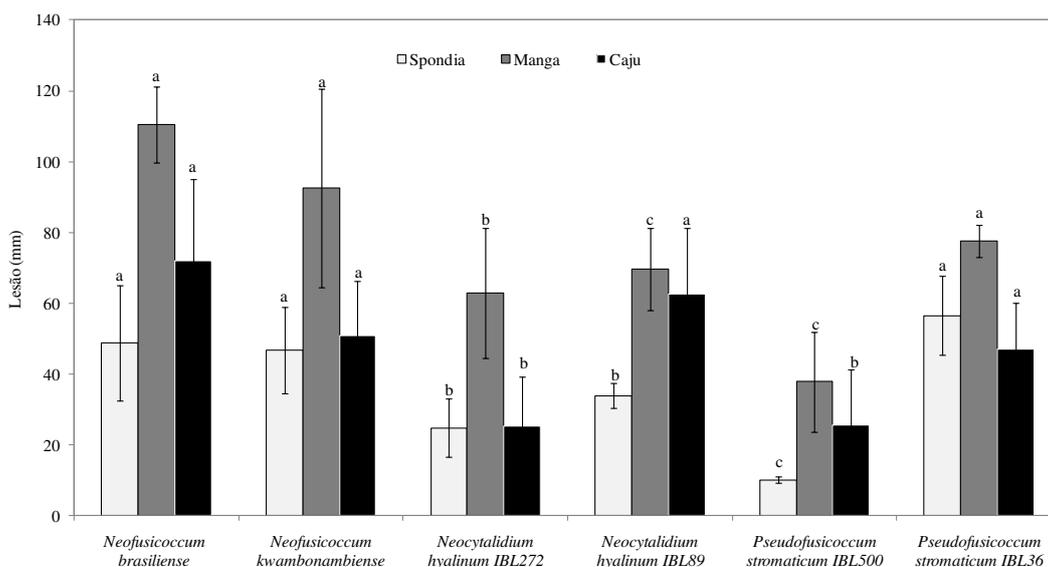
Todas as espécies apresentaram-se virulentas quando inoculadas em frutos de manga e plantas jovens de cajueiro e umbu-cajá, porém em diferentes graus dependendo do hospedeiro (Figura 4).

Tanto como em frutos de manga, como em plantas jovens de umbu-cajazeira e cajueiro as espécies *N. kwambonambiense*, *N. brasiliense* e *P. stromaticum* (IBL36) apresentaram-se como os mais agressivos por provocarem as maiores lesões, e não diferindo entre si estatisticamente ($P \leq 0.05$) dentro dos respectivos hospedeiros (Figura 4).

Em cajueiro, as espécies *Ne. hyalinum* (IBL272) e *P. stromaticum* (IBL500) foram as menos agressivas, mas não diferindo entre si. Enquanto em frutos de manga, *Ne. hyalinum* (IBL272) foi moderadamente agressivo, seguido das espécies *Ne. hyalinum* (IBL89) e *P. stromaticum* (IBL500) que mostraram-se menos agressivas, porém não diferindo entre si.

Em plantas de umbu-cajazeira, *Ne. hyalinum* (IBL272) e *Ne. hyalinum* (IBL89) foram moderadamente virulentos, não diferindo entre si; seguindo *P. stromaticum* (IBL500) considerada a espécie menos virulenta a todos os hospedeiros inoculados (Figura 4).

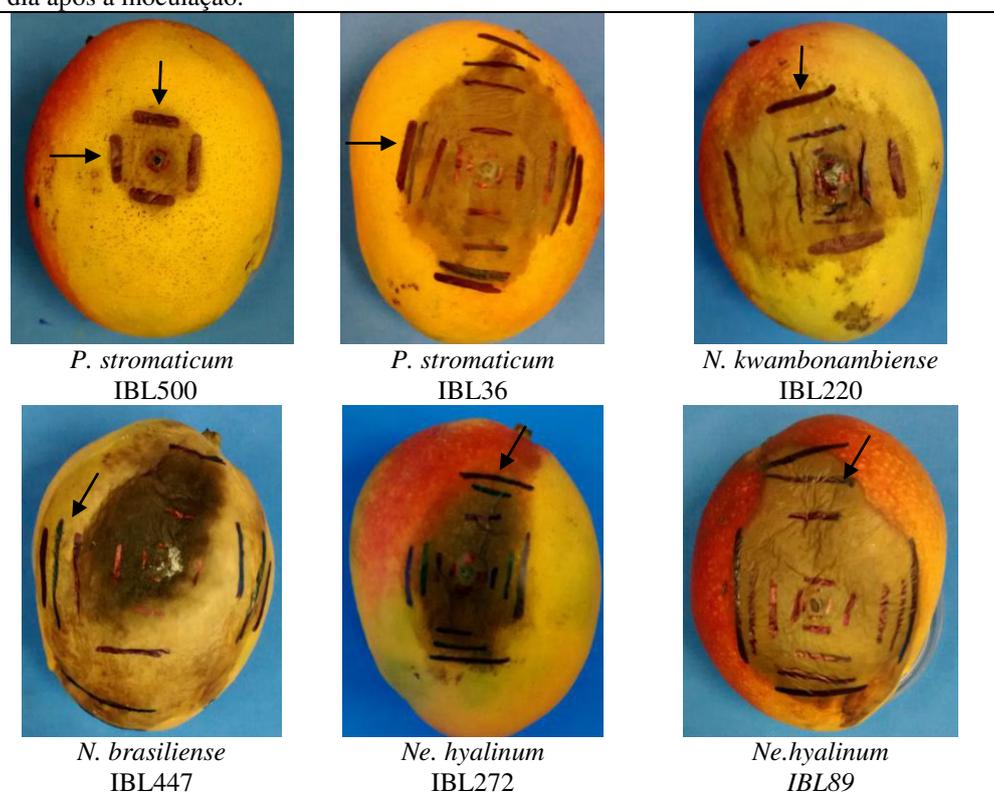
Figura 4. Comprimento da lesão (mm) causada por espécies de Botryosphaeriaceae aos 45 dias após a inoculação em caules de plantas jovens de umbu-cajá, 15 dias em caules de plantas jovens de cajueiro e quatro dias após a inoculação em frutos feridos de manga*.



*Barras acima das colunas representam o desvio padrão da média. Colunas do mesmo hospedeiro com mesma letra não diferem entre si por meio do teste de Scott-Knott a 5% de significância ($P \leq 0,05$).

Quanto ao progresso da doença em frutos de manga, observou-se para todas as espécies um período de incubação de aproximadamente três dias após a inoculação e taxa de crescimento de 18,41 mm dia⁻¹ para *N. brasiliense*, sendo este o mais virulento. Quando inoculados em frutos de manga, os isolados causaram lesões necróticas, que evoluíram em direção do pedúnculo o tornando escurecido, tornando-se aquosas e causando mumificação nos frutos (Figura 5).

Figura 5. Lesões em frutos de manga provocadas por espécies de Botryosphaeriaceae ao 7º dia após a inoculação.

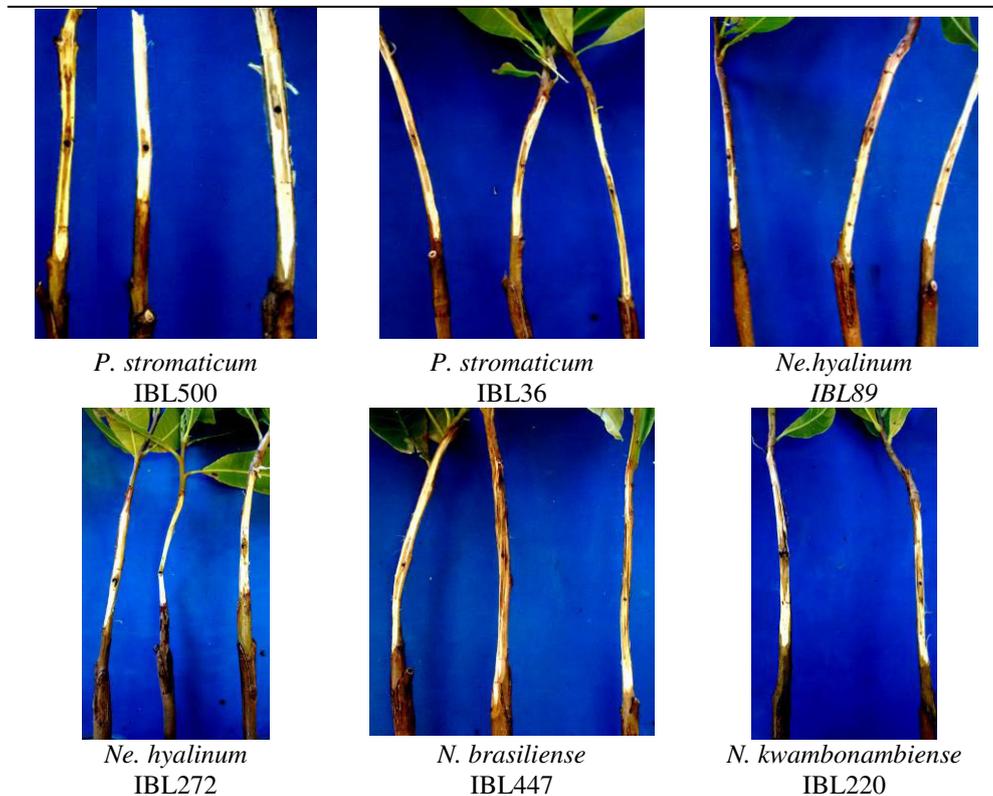


→ As setas indicam as marcações diárias, feitas com caneta esferográfica azul, no decorrer das avaliações quanto ao tamanho atual das lesões provocadas pelos isolados.

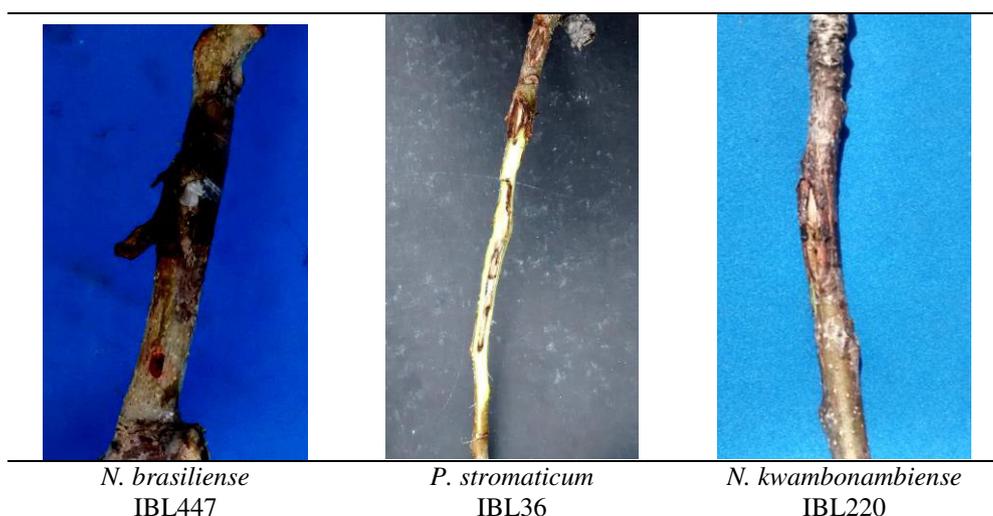
As espécies mais virulentas tanto em plantas de cajueiro como de umbu-cajá estimularam a produção de resina pelos hospedeiros, provocaram cancos superficiais em seus tecidos que evoluíram conseqüentemente para lesões necróticas de maiores comprimentos (Figura 6).

Figura 6. Lesões provocadas por espécies de Botryosphaeriaceae em caules de plantas jovens de cajueiro (A) e umbu-cajá (B).

(A) Lesões em caules de plantas jovens de cajueiro, aos 15 dias após a inoculação com espécies de Botryosphaeriaceae



(B) Lesões em caules de plantas jovens de umbu-cajá aos 45 dias após a inoculação com espécies de Botryosphaeriaceae



4 DISCUSSÃO

Quatro espécies de Botryosphaeriaceae (*Ne. hyalinum*, *N. kwambonambiense*, *N. brasiliense* e *P. stromaticum*) foram associadas à morte descendente e cancos em ramos e caules de cajueiro, mangueira e goiabeira na região Nordeste do Brasil.

Por meio da morfologia de conídios os isolados dos gêneros *Neoscytalidium* (IBL89 e IBL272) e *Pseudofusicoccum* (IBL36 e IBL500) foram facilmente identificados por apresentarem características compatíveis às chaves que os descrevem (Phillips *et al.*, 2013). No entanto, o mesmo não aconteceu para as espécies *N. kwambonambiense*, que não esporulou nas condições do presente estudo, e para *N. brasiliense*, que mesmo esporulando nas condições do presente estudo, não pode ser comparada com dados da literatura uma vez que sua descrição foi baseada apenas em dados moleculares (Marques *et al.*, 2013). Diante disto, esta informação caracteriza-se como a primeira descrição morfológica de *N. brasiliense* (Tabela 2). Em conjunto, tais evidências exaltam tanto a importância da utilização da filogenia molecular combinada (ITS, TEF1- α) como imprescindível para a identificação dos isolados em nível de espécie, como também a importância auxiliar da caracterização morfológica para este propósito.

Atualmente, inferências filogenéticas múltiplas de genes do DNA são as ferramentas mais atuais e válidas para a identificação fúngica e o estabelecimento de uma filogenia, capaz de estabelecer a descrição dos gêneros *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* e *Pseudofusicoccum* com base em sequências ITS, que anteriormente pertenciam aos gêneros *Botryosphaeria* e anamorfos de *Fusicoccum* (CROUS *et al.*, 2006).

Frequentemente, espécies de Botryosphaeriaceae são reconhecidas e separadas por diferenças nas sequências de DNA com grande ênfase em genes codificadores de proteínas como TEF1- α (ABDOLLAHZADEH *et al.*, 2010; PHILLIPS *et al.*, 2013; BERRAF-TEBBAL *et al.*, 2014). No entanto, para alguns gêneros, a exemplo de *Neofusicoccum*, para que haja definições entre espécies, genes adicionais são necessários para fornecer uma base filogenética mais robusta (ABDOLLAHZADEH *et al.*, 2010; PHILLIPS *et al.*, 2013).

No presente estudo, verificou-se que mesmo tendo a formação de clados, espécies de *Neofusicoccum* apresentaram baixos valores de inferências Bayesiana (Figura 1).

Diante disso, sugere-se que posteriormente, haja o sequenciamento de uma ou mais regiões gênicas; a exemplos de βt e/ou RPB2 (RNA polymerase subunit II) (LOPES *et al.*, 2014), a fim de verificar se haverá uma maior robustez nesta inferência. Quanto aos demais clados formados, tanto para *Neoscytalidium* e *Pseudofusicoccum* as regiões ITS e TEF1- α foram satisfatórias na separação de espécies (Figura 1). Faz-se ausente na literatura um padrão quanto à quantidade e quais regiões gênicas a serem utilizadas na análise filogenética de Botryosphaeriaceae. Percebe-se no entanto, que geralmente, esta escolha varia de acordo com o complexo fúngico estudado, notando que, em geral, para a família Botryosphaeriaceae, genes das regiões ITS, TEF1- α e βt , concatenados, nesta ordem, são os mais utilizados.

A associação de *Ne. hyalinum*, *Ne. kwambonambiense*, *N. brasiliense* e *P. stromaticum* em cajueiro e de *N. brasiliense* em goiabeira são inéditos. Estes relatos evidenciam a importância de estudos posteriores para clarificar a correlação da ocorrência, distribuição e epidemiologia desses fungos para o desenvolvimento da fruticultura tropical brasileira, em especial, a cajucultura por ser uma atividade do ponto de vista socioeconômico regional e nacional.

Em mangueira, muitas espécies de Botryosphaeriaceae já foram relacionadas, o que evidencia a grande importância desses patógenos ao declínio de produção e da qualidade pós-colheita de seus frutos (COSTA *et al.*, 2010; SAKALIDIS *et al.*, 2011; MARQUES *et al.*, 2013; ABDOLLAHZADEH *et al.*, 2013). Devido a essas inúmeras ocorrências, sugere-se como centro de origem destes patógenos em mangueira o hemisfério norte, inclusive em regiões de clima temperado, que através do transporte de materiais vegetais infectados foram disseminados para países do hemisfério Sul (MARQUES *et al.*, 2013).

Em goiabeira, poucos estudos vêm sendo realizados, mas no Brasil as espécies *N. parvum* e *N. ribis* já foram relatadas causando podridões pós-colheita em frutos (NOGUEIRA JUNIOR *et al.*, 2015). Todas as espécies caracterizadas nesse estudo apresentaram temperaturas cardiais semelhantes para o crescimento micelial *in vitro* (aproximadamente 25 °C), onde temperaturas $\leq 10^{\circ}\text{C}$ e $\geq 40^{\circ}\text{C}$ apresentaram efeito inibitório às espécies (dados não mostrados). Esta amplitude térmica corrobora com os resultados observados para a germinação dos conídios de *N. parvum* e *B. dothidea* (NOGUEIRA JUNIOR *et al.*, 2015) e para o crescimento de *N. parvum*, *N. brasiliense*, *Ne. hyalinum* e *P. stromaticum* (MARQUES *et al.*, 2013).

Com respeito ao gênero *Neofusicoccum*, suas espécies são comumente associadas com inúmeros hospedeiros lenhosos pelo mundo (von ARX, 1987) e atualmente possui 22 espécies filogeneticamente descritas (BERRAF-TEBBAL *et al.*, 2014). Dessas, *N. brasiliense* foi descrita no nordeste do Brasil associada à podridão penducular em frutos de mangueira (MARQUES *et al.*, 2013) sendo a ocorrência de *N. brasiliense* em ramos de goiabeira o segundo relato desta espécie no Brasil e o primeiro na cultura.

Quanto a espécie *N. kwambonambiense* a mesma foi descrita pela primeira vez na África do Sul em ramos e folhas assintomáticas, e em ramos e frutos de plantas mortas de *Syzygium cordatum* (PAVILIC *et al.*, 2009; PHILLIPS *et al.*, 2013) sendo relatada posteriormente como o agente causal de podridões pós-colheita em frutos de morango no Brasil (LOPES *et al.*, 2014). A ocorrência de *N. kwambonambiense* em ramos de plantas de cajueiro associada aos sintomas de morte descendente e cancro se faz inédita em território brasileiro. Tais constatações são relevantes do ponto de vista fitossanitário, pois, mesmo diante de uma baixa frequência e distribuição, mudanças podem estar acontecendo quanto ao fluxo desta espécie a partir de seu centro de origem. Tanto isolados de *N. brasiliense* quanto de *N. kwambonambiense* identificados foram capazes de causar lesões necróticas quando inoculados em frutos de manga (Figura 5) como em caules de plantas jovens de cajueiro e umbu-cajá (Figura 6).

A infecção de Botryosphaeriaceae, em associação a mangueira e a outras lenhosas, ainda não foi totalmente estabelecida, no entanto, nota-se que a poda mecânica em pomares e o uso de ferramentas não desinfectadas favorecem a quebra de ramos, tornando-os excelentes portas de entradas para estes fungos, que por possuírem caráter endofítico, se estabelecem como patógenos latentes por longos períodos, infectando e causando podridões pós-colheita (SAKALIDIS *et al.*, 2011).

Em pomares de cajueiro, além da poda mecânica, a propagação via enxertia são práticas rotineiras em escalas comerciais de produção da cultura. Estudos relatam que a disseminação de Botryosphaeriaceae na cajucultura, a exemplo o *Lasiodyplodia* spp., ocorre e se faz eficiente tanto através da interação entre propágulos vegetais infectados e pela aquisição de materiais vegetais com idoneidade sanitária duvidosa (CARDOSO *et al.*, 2009), como também através da utilização de instrumentos de poda não desinfectados (CARDOSO *et al.*, 1998). Partindo dessas evidências, pode-se aferir que

a ausência de adequadas medidas fitossanitárias favorecem a ocorrência e a disseminação de Botryosphaeriaceae em pomares de fruteiras tropicais.

Doenças causadas pelo gênero *Neoscytalidium* e suas espécies, *Ne. hyalinum* (= *Ne. dimidiatum*) e *Ne. novaehollandiae*, tendem a ser comuns em países tropicais (Phillips *et al.*, 2013). *Ne. hyalinum* já foi associado a plantas de *Citrus* spp estressadas por congelamento na Califórnia, também associado em lesões necróticas (PHILLIPS *et al.*, 2013). Na Itália, ele se fez presente ramos causando cancos e gomose em *Citrus* spp. (POLIZZI *et al.* 2009, 2011). No Brasil, esta espécie foi relatado anteriormente em pinhão manso, mandioca (*Manihot sculenta*) e mangueira (MACHADO *et al.*, 2012;. 2014a;.2014b; MARQUES *et al.*, 2013b).

Quanto a espécie *P. stromaticum*, foi originalmente descrita em plantas assintomáticas, bem como em ramos e caules de plantas mortas de *Acácia mangium*, *Eucalipto* e *Pinus* na Venezuela (MOHALI *et al.* 2006, 2007) e considerada típica de hospedeiros nativos na Austrália presentes em terras pouco exploradas (PAVILIC *et al.* 2008). Posteriormente, essa espécie foi associada a plantas de mangueiras em declínios e cultivadas em áreas intensamente agricultáveis no Brasil, sendo considerada a segunda espécie mais abundante em um levantamento, derrubando o mito que sua distribuição era restrita a hospedeiros nativos de terras inexploradas (MARQUES *et al.*, 2012, 2013). A falta de especificidade entre hospedeiros de muitos membros da Botryosphaeriaceae (SLIPPERS & WINGFIELD, 2007) sugere que a expansão em distribuição, colonização e especiação de algumas espécies dessa família são influenciadas por fatores ambientais (SAKADILIS *et al.*, 2013) como o clima e a microflora (PITT *et al.*, 2010; SAKADILIS *et al.*, 2011). Mais estudos são necessários para clarificar a relação entre as espécies de Botryosphaeriaceae e como os fatores ambientais podem contribuir para sua distribuição e expressão de doenças, quando associadas tanto a fruteiras tropicais ou temperadas quanto nos mais diferentes biomas do Brasil e do mundo. Certamente, estudos, como esse, funcionaram para fomentar a execução de pesquisas envolvendo a epidemiologia desses novos relatos de Botryosphaeriaceae recentemente descritos na literatura.

5 CONCLUSÕES

Mediante caracterizações moleculares, biológicas e patogênica dos isolados de Botryosphaeriaceae conclui-se que:

Neofusicoccum kwambonambiense, *Neoscytalidium hyalinum* e *Pseudofusicoccum stromaticum* em cajueiro caracterizando-se como um primeiro relato; *Neoscytalidium hyalinum* em mangueira; e *Neofusicoccum brasiliense* em goiabeira, primeiro relato na cultura, sendo ambos primeiros relatos de ocorrência no estado do Ceará e do Piauí.

Todos os isolados mostraram-se virulentos a frutos de manga, e a plantas jovens de cajueiro e umbu-cajá, causando lesões necróticas e exsudação de resina pelos hospedeiros. Isolados de *Neofusicoccum* mostraram-se como as mais virulentas nos hospedeiros inoculados.

6 REFERÊNCIAS

ABDOLLAHZADEH, J., JVADI, A., MOHAMMADI-GOLTAPPEH, E., ZARE, R., PHILLIPS, A.J.L. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. **Persoonia**, v.25, p.1–10, 2010.

Arx JA von. Plant Pathogenic Fungi. **J. Cramer**, Berlin, Germany. 1987.

BARROSO, G.M. Sistemática de Angiospermas do Brasil.. **Imprensa Universitária**, v.2, 1991.

BERRAF-TEBBAL, A., GUEREIRO, M.A., PHILLIPS, A.J.L. Phylogeny of *Neofusicoccum* species associated with grapevine trunk diseases in Algeria, with description of *Neofusicoccum algeriense* sp. nov. **Phytopathologia Mediterranea**, v.53, n.3, p.416–427, 2014.

CARDOSO, J.E., BEZERRA, M.A., VIANA, F.M.P., SOUSA, T.R.M., CYSNE, A.Q., FARIAS, F.C. Ocorrência endofítica de *Lasiodiplodia theobromae* em tecidos de cajueiro e sua transmissão por propágulos. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.4, p.262–266, 2009.

CARDOSO, J.E, VIDAL, J.C, SANTOS, A.A, FREIRE, F.C.O, VIANA, F.M.P. First report of black branch dieback of cashew caused by *Lasiodiplodia theobromae* in Brasil. **Plant Disease**, v.86, n.558. 2002.

CARDOSO, J.E., FREIRE, F.C.O., SÁ, F.T., SOUZA, R.N.M. Disseminação e controle da resinose em troncos de cajueiro decepados para substituição de copa. Comunicado Técnico, **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical**, n. 17, p.1-4, 1998.

COSTA, V.S.O., MICHEREFF, S.J., MARTINS, R.B., GAVA, C.AT., MIZUBUTI, E.S.G., CÂMARA, M.P.S. Species of Botryosphaeriaceae associated on mango in Brasil. **European Journal Plant Pathology**, v.127, p.509–519. 2010.

CROUS, P.W., SLIPPERS, B., WINGFIELD, M.J., RHEEDER, J., MARASAS, W.F.O., PHILLIPS, A.J.L., ALVES, A., BURGESS, T., BARBER, P., GROENEWALD, J.Z. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Studies in Mycology**, v.55, p.235–253, 2006.

COUTINHO, I.B.L., FREIRE, F.C.O., LIMA, C.S., LIMA, J.S., GONCALVES, F.J.T., MACHADO, A.R.A., SILVA, M.S., CARDOSO, J. E. Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. **Plant Pathology**, 2016. Doi: 10.1111/ppa.12565.

DENMAN, S., CROUS, P.W., TAYLOR, J.E., KANG, J.C., PASCOE, I., WINGFIELD, M.J. An overview of the taxonomic history of Botryosphaeria, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. **Studies in Mycology** v.45, p.129–140, 2000.

FREIRE, F.C.O. A resinose do cajueiro. Caju Informativo, **EMBRAPA-CNPCa** v.4, n.1, p.1–2, 1991.

FREIRE, F.C.O., CARDOSO, J.E., VIANA, F.M.P., MARTINS, M.V.V. Status of *Lasiodiplodia theobromae* as a plant pathogen in Brasil. **Essentia**, v.12, p.53-71, 2011.

GONÇALVES, F.J.T., FREIRE, F.C.O., LIMA, J.S., MELO, J.G.M., CÂMARA, M.P.S. Patogenicidade de espécies de Botryosphaeriaceae endofíticas de plantas da Caatinga do estado do Ceará em manga e umbu-cajá. **Summa Phytopathol.**, v. 42, n. 1, p. 43-52, 2016.

HIBBETT, D.S., TAYLOR, J.W. Fungal systematics: is a new age of enlightenment at hand? **Nature reviews**, v.11, 2013.

HAWKSWORTH, D.L. A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. **MycologyKeys**, v.1, p. 7–20, 2011.

ISMAIL, A.M., CIRVILLERI, G., POLIZZI, G., CROUS, P.W., GROENEWALD, J.Z., LOMBARD, L. *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica*) in Egypt. **Australasian Plant Pathology**, v.41, p.649–660. 2012.

JACOBS, K.A., REHNER, S.A. Comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of *Botryosphaeria* and related taxa. **Mycologia**, v.90, p.601–610, 1998.

LIMA, J.S., MOREIRA, R.C, CARDOSO, J.E., MARTINS, M.V.V., VIANA, F.M.P. Cultural, morphological and pathogenic characterization of *Lasiodiplodia theobromae* associated with tropical fruit plants. **Summa Phytopathologica**, v.39, p.81-88, 2013.

LOPES, U.P., ZAMBOLIM, L., PINHO, D.B., BARROS, A.V., COSTA, H., PEREIRA, O.L. Postharvest rot and mummification of strawberry fruits caused by *Neofusicoccum parvum* and *N. kwambonambiense* in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v.39, n.2, p.178-183, 2014

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 Brasil, with a description of new species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Diversity**, v.67, p.231–247, 2014a.

MACHADO, A.R., PINHO, D.B., OLIVEIRA, S.A.S., PEREIRA, O.L. New occurrences of Botryosphaeriaceae causing black root rot of cassava in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n.6, p.464-470, 2014b.

MACHADO, A.R., PINHO, D.B., DUTRA, D.C., PEREIRA, O.L. First Report of Collar and Root Rot of Physic Nut (*Jatropha curcas*) caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in Brazil. **Plant Disease** v.96, n.11, p.1697, 2012.

MARQUES, M.W., LIMA, N.B., MORAIS JR, M.A., BARBOSA, M.A.G., SOUZA, B.O, MICHEREFF, S.J, PHILLIPS, A.J.L, CAMARA, M.P.S. Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brasil. **Fungal Diversity**, v.61, p.181–193, 2013a.

MARQUES, M.W, LIMA, N.B, MORAIS, JR, M.A., MICHEREFF, S.J., PHILLIPS, A.J.L., CÂMARA, M.P.S. *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* and *Pseudofusicoccum* species associated with mango in Brasil. **Fungal Diversity**, v. 61, p.195- 208, 2013b.

PAVLIC, D., SLIPPERS, B., COUTINHO, T.A., GRYZENHOUT, M., WINGFIELD, M.J. *Lasiodiplodia gonubiensis* sp. nov. a new Botryosphaeria anamorph from native *Syzygium cordatum* in South Africa. **Studies in mycology**, v.50, p. 313–322, 2004..

PHILLIPS, A.J.L., ALVES, A., ABDOLLAHZADEH, J., SLIPPERS, B., WINGFIELD, M.J., GROENEWALD, J.Z., CROUS, P.W. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. **Studies in Mycology**, v.76, p.51–167, 2013.

PICKEL, D.B.J. Flora do Nordeste do Brasil segundo Piso e Marcgrave: no século XVII/ Argus Vasconcelos de Almeida (Editor). – Recife : **EDUFRPE**, 2008. 312 p.

PITT, W.M., HUANG, R., STEEL, C.C., SAVOCCHIA, S. Identification, distribution and current taxonomy of Botryosphaeriaceae species associated with grapevine decline in New South Wales and South Australia. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v.16, p .258–271, 2010.

POLIZZI, G., AIELLO, D., CASTELLO, I., VITALE, A., GROENEWALD, J.Z., CROUS, P.W. Occurrence, molecular characterisation, and pathogenicity of *Neoscytalidium dimidiatum* on Citrus in Italy. **ISHS Acta Horticulturae**, v.892, p.237–243. 2011.

POLIZZI, G., AIELLO, D., VITALE, A., GIUFFRIDA, F., GROENEWALD, J.Z., CROUS, P.W. First report of shoot blight, canker, and gummosis caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on citrus in Italy. **Plant Disease**, v.93, p.12-15, 2009.

TAVARES, S.C.C.H. Epidemiologia e manejo integrado de *Botryodiplodia theobromae* - situação atual no Brasil e no mundo. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p.46-52, 2002.

SAKALIDIS, M.L., RAY, J.D., LANOISELET, V., HARDY, G.E.J., BURGESS, T.I. Pathogenic Botryosphaeriaceae associated with *Mangifera indica* in the Kimberley Region of Western Australia. **European Journal Plant Pathology**, v.130, p.379-391, 2011.

SAKALIDIS, M.L., SLIPPERS, B., WINGFIELD, B.D., HARDY, G.E.ST.J., BURGESS, T.I. The challenge of understanding the origin, pathways and extent of fungal invasions: global populations of the *Neofusicoccum parvum*-*N. ribis* species Complex. **Diversity and Distributions**, v.19, p.873-883, p. 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.

SLIPPERS, P.W., CROUS, S.D., COUTINHO, T.A., WINGFIELD, B.D., WINGFIELD, M.J. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. **Mycologia**, v.96, n.1, p.83-101, 2004.

CAPÍTULO III

Uso de genótipos de cajueiro e fungicidas no controle de Botryosphaeriaceas associadas a fruteiras perenes

RESUMO

Diante da identificação de novas espécies e associações de fungos da família Botryosphaeriaceae com novos hospedeiros, a investigação de estratégias que visem à caracterização e o controle dessas novas espécies se tornam indispensáveis. O trabalho em apreço objetivou avaliar dois métodos de controle em dez espécies de fungos da família Botryosphaeriaceae. Os métodos foram: o controle genético, através da inoculação das espécies em genótipos de cajueiro e o controle químico *in vitro*, com o uso dos ingredientes ativos (i.a) carbendazin e tebuconazole. As espécies fúngicas utilizadas nos ensaios foram: *Lasiodiplodia brasiliense*, *L. caatinguensis*, *L. euphorbicola*, *L. pontae*, *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae*, *Neofusicoccum brasiliense*, *N. kwambonambiense*, *Neoscytalidium hyalinum* e *Pseudofusicoccum stromaticum*. No método genético, caules de sete plantas jovens dos genótipos de cajueiros (CCP 09, CCP 76, Embrapa 51, BRS 189, BRS 226, BRS 253 e BRS 265) foram inoculados com um disco de micélio das dez espécies de Botryosphaeriaceae. Para tanto, os caules foram perfurados com auxílio de uma furadeira elétrica e os discos de 2 mm de diâmetro foram colocados nos orifícios e protegidos com fita plástica. No controle químico, *in vitro*, foram utilizados os i.a, carbendazin e tebuconazole, nas concentrações de 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 e 5,0 mg L⁻¹. *In vivo*, cada planta correspondia a uma repetição; *in vitro*, foram utilizadas quatro repetições correspondentes a uma placa de Petri, e os ensaios conduzidos em meio de batata dextrose ágar (BDA) a 25°C e fotoperíodo de 12h. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) e as médias quanto ao tamanho das lesões (mm) e dos diâmetros das colônias (mm), foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Todas as espécies mostraram-se patogênicas aos genótipos de cajueiro, porém com diferentes níveis de agressividade. Em geral, as espécies de *Lasiodiplodia* foram mais agressivas, com destaque para *L. caatinguensis*, *L. brasiliense*, *L. euphorbicola* e *L. pontae*; dentre os genótipos, BRS253 foi o mais susceptível, seguido dos genótipos CCP76, BRS189 e BRS226 que não diferiram entre si. Os demais genótipos foram moderadamente resistentes, como o BRS274 e Embrapa 51, nos quais as espécies não diferiram em agressividade. Os dois fungicidas foram eficientes na inibição do crescimento das espécies, porém o carbendazin mostrou-se superior ao tebuconazole, necessitando de

menores CE_{50} ($\leq 0,5$ mg L⁻¹). Espécies de *Neofusicoccum*, *Neocystaldium* e *Pseudofusicoccum* que mostraram-se mais sensíveis a estes químicos.

Palavras-chave: Genótipos; *Anacardium occidentale*; *Lasiodiplodia*; Carbendazin; Tebuconazole.

ABSTRACT

The recent description of new Botryosphaeriaceous fungal species as well as their association with new host plants, have urged the necessity for development of new strategies to control these important plant pathogens. In the present work the authors aimed to test tree methods (genetic and chemical) to control the following Botryosphaeriaceous species found associated to die-back and canker of fruit plants in the Brazilian Northeastern region: *Lasiodiplodia brasiliense*, *L. caatinguensis*, *L. euphorbicola*, *L. pontae*, *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae*, *Neofusicoccum brasiliense*, *N. kwambonambiense*, *Neoscytalidum hyalinum* and *Pseudofusicoccum stromaticum*. For the genetic method seven grafted seedlings of each of the cashew dwarf genótipos CCP 09, CCP 76, Embrapa 51, BRS 189, BRS 226, BRS 253 and BRS 265 were inoculated by making a 2 mm diameter hole in the stem of the plant at approximately 15 cm from the bottom with an electric drill. Then, a 2 mm diameter agar plug containing mycelium grown on PDA was introduced into the hole, placing it in contact with the vascular system of the plant. The hole was covered with petroleum jelly and sealed with Parafilm. For the chemical method two systemic fungicides (carbendazin and tebuconazole) were used *in vitro* at the active ingredient concentrations of 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 e 5,0 mg L⁻¹. Fungicides were added to plates with melted PDA medium, and plates were kept at 25°C and light period of 12 hours. Fungal lesions (mm) and colony diameters (mm) means were compared by using the Scott-Knott test ($p \leq 0,05$). All experiments were arranged in a completely randomized design. Results revealed that all fungal species were pathogenic to the cashew genótipos, although the most aggressive had been *L. caatinguensis*, *L. brasiliense*, *L. euphorbicola* and *L. pontae*. The genótipo BRS253 was the most susceptible, followed by the genótipos CCP76, BRS189 e BRS226, which did not differ statistically among them. All the other genótipos behaved as moderately resistant, although on the genótipos BRS274 and Embrapa 51 neither fungal species had differed statistically in pathogenicity. Both fungicides were effective against all fungal species tested, although Carbendazin had been able to inhibit the fungal growth at lower EC₅₀ ($\leq 0,5$ mg L⁻¹). *Neofusicoccum brasiliense*, *N. kwambonambiense*, *Neoscytalidum hyalinum* and *Pseudofusicoccum stromaticum* were the most susceptible species to both fungicides.

Keywords: Genotypes; *Anacardium occidentale*; *Lasiodiplodia*; Carbendazin; Tebuconazole.

1 INTRODUÇÃO

Devido à grande quantidade de espécies, a diversidade genética, o caráter polífago e as diversas maneiras de infectar seus hospedeiros, os fungos da família Botryosphaeriaceae apresentam difícil controle e manejo (CYSNE *et al.*, 2010; GUAN *et al.*, 2016). Por possuírem hábito endofítico e agirem também como patógenos latentes, os fungos dessa família são importantes agentes quarentenários, por estarem presentes em propágulos vegetais assintomáticos, por serem altamente disseminados por ferramentas contaminadas e infectar seus hospedeiros, principalmente através de cortes mecânicos decorrentes de práticas agrícolas (enxertia e podas), ou por aberturas naturais (CARDOSO *et al.*, 2009; SLIPPERS & WINGFIELD, 2007; CYSNE *et al.*, 2010; GUAN *et al.*, 2016).

Dentre as Botryosphaeriaceae, espécies de *Lasiodiplodia* se sobressaem em ocorrência e frequência em associações com frutíferas de importância econômica (MARQUES *et al.*, 2013a; NETTO *et al.*, 2014; CORREIA *et al.*, 2016; COUTINHO *et al.*, 2016) seguidas, em menor expressão, por espécies dos gêneros *Neofusicoccum*, *Neocystalidium* e *Pseudofusicoccum* (COSTA *et al.*, 2010; BATISTA *et al.*, 2012; Adeniyi *et al.*, 2013; MARQUES *et al.*, 2013b; GUAN *et al.*, 2016). Em virtude de provocarem um complexo quadro sintomatológico em seus hospedeiros, variando de morte descendente de caules e ramos até a formação de cancrios e podridões de hastes, frutos e raízes, e por serem até recentemente considerados patógenos de importância secundária na agricultura, ainda não são bem esclarecidas as medidas de controle e práticas adequadas para o controle desses patógenos (CARDOSO *et al.* 2006; GUAN *et al.*, 2016), bem como a caracterização dos aspectos epidemiológicos devido às recentes associações de novas espécies e a recentes relatos que vêm ocorrendo.

O controle cultural e a adoção de estratégias preventivas são os métodos mais recomendados para o controle de Botryosphaeriaceae, porém não são os únicos e nem os mais eficazes, quando utilizados isoladamente. O conhecimento prévio de fatores tais como a suscetibilidade de cultivares, das condições ambientais favoráveis ao patógeno e do correto manejo das plantas, são extremamente necessários para a obtenção de sucesso no manejo dessas doenças (MORAES *et al.*, 2007; BATISTA *et al.*, 2012). Estudos envolvendo a utilização do método de controle genético (PAIVA *et*

al., 2008; MOREIRA *et al.*, 2013) e químico (PERREIRA *et al.*, 2012; TORRES *et al.*, 2013; PEDRAZA *et al.*, 2013; FAN *et al.*, 2016) de Botryosphaeriaceae, contabilizam o maior número de pesquisas realizadas.

A suscetibilidade ou resistência de plantas a fitopatógenos dependem, basicamente, das barreiras genéticas que as envolvem, onde a busca por variedades resistentes a doenças, atrelados a combinação de uma boa aparência comercial e ao sabor dos produtos, compõem as principais características alvos dos programas de melhoramento genético, os quais se caracterizam como um método de controle sustentável e de fácil acesso aos produtores (CARDOSO *et al.*, 2006; PAIVA *et al.*, 2008; BATISTA *et al.*, 2012; TRAVADON *et al.*, 2013). Programas de melhoramento genético envolvendo culturas de importância econômica existem e buscam a produção de acessos vegetais resistentes a Botryosphaeriaceae. Dentre esses, no Brasil, podemos citar os programas envolvendo a cultura do cajueiro desenvolvido pela Embrapa Agroindústria Tropical (CAVALCANTI & WILKINSON, 2007; PAIVA *et al.*, 2008), a cultura da videira (NETO, 1955) e da mangueira (SANTOS *et al.*, 2010; BATISTA *et al.*, 2012).

Espécies de Botryosphaeriaceae podem mostrar diferentes níveis de virulência, a depender do genótipo. Ao infectar videiras mostraram-se divididas em três diferentes rankings de virulência onde *Neofusicocum* spp. são consideradas as altamente virulentas e *Diplodia* spp. as moderadamente virulentas (URBEZ-TORRES, 2011). Em cajueiro, os dados globais mostraram que a maior parte dos germoplasmas testados quanto à infecção de *Lasiodyplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl foram suscetíveis ao patógeno, apontando características poligênicas ou de resistência horizontal (CARDOSO *et al.*, 2006). Dentro de genótipos selvagens de cajueiro comum, genótipos mais ou menos resistentes à resinose são capazes de promover um atraso no início da doença sendo esta uma característica epidemiológica importante (MOREIRA *et al.*, 2013). Estudos envolvendo o controle genético a outras espécies de Botryosphaeriaceae e sua caracterização quando inoculadas em diferentes acessos de cajueiro ainda não foram realizados.

O espectro de produtos químicos para o controle de fungos dessa família, associados a fruteiras tropicais, tanto no Brasil como em outros países é restrito, e poucos são os ingredientes ativos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o que torna irregular o uso desses no controle de Botryosphaeriaceae

(MA *et al.*, 2002; AGROFIT, 2016). Legalmente, apenas os seguintes grupos químicos estão liberados no Brasil para o controle de algumas Botryosphaeriaceae em algumas culturas: os tiabendazois para a cultura do mamoeiro e os triazóis para mangueira, ambos para o controle de *L. theobromae*; os benzimidazois e ditiocarbamatos para o controle de *Botryodiplodia dothidea* em macieira; e o óxido cuproso no controle de *Diplodia seriata* em pereira (AGROFIT, 2016).

Diante da explosiva identificação de espécies de Botryosphaeriaceae em associação a vários patossistemas houve um aumento substancial em estudos que visam à busca por produtos químicos eficientes a estes patógenos, visando averiguar tanto a sensibilidade dos patógenos a esses ingredientes ativos, como também sua eficácia em programas de manejo da resistência (MA *et al.*, 2002; PERREIRA *et al.*, 2012; BATISTA *et al.*, 2012; TORRES *et al.*, 2013; DURGADEVI *et al.*, 2014; FAN *et al.*, 2016). Estudos quanto à resistência de genótipos de cajueiro a espécies de Botryosphaeriaceae recentemente descritas, bem como o uso de fungicidas químicos e produtos naturais a novas espécies de Botryosphaeriaceae descritas nos últimos 10 anos são inexistentes.

Diante do exposto, objetivou-se com o presente trabalho avaliar a eficiência de três métodos de controle em nove espécies de fungos da família Botryosphaeriaceae. Os métodos avaliados foram: (i) o controle genético, através da inoculação das espécies em nove genótipos de cajueiro; (ii) e o controle químico *in vitro* através do uso dos ingredientes ativos (i.a) carbendazin e tebuconazole.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos isolados

Os isolados de Botryosphaeriaceae utilizados nos experimentos foram obtidos da coleção de fungos do Laboratório de Fitopatologia da unidade da Embrapa Agroindústria Tropical em Fortaleza, Ceará (Tabela 1). Todos foram oriundos de ramos e caules de fruteiras tropicais, coletadas de diferentes municípios do Nordeste brasileiro, as quais exibiam sintomas de morte descendente, resina e cancro.

A identificação dos isolados se deu por sequenciamento gênico das regiões gênicas dos espaçadores internos transcritos (ITS) do DNA ribossômico, fator de

elongação 1 alfa (TEF1- α) e beta tubulina (β t) para as espécies de *Lasiodiplodia*; e das regiões ITS e TEF1- α para os demais gêneros.

Os isolados fúngicos foram recuperados da micoteca através de repicagens para placas de Petri contendo o meio de cultura batata cenoura e ágar (BCA). Após três dias de crescimento, pontas de hifas de cada isolado foram repicadas para placas de Petri contendo meio de cultura batata dextrose e ágar (BDA) e em seguida incubadas a 25 °C e fotoperíodo de 12 h. Por ocasião de cada experimento foram utilizadas colônias de sete dias de crescimento em BDA.

Tabela 1. Isolados de Botryosphaeriaceae utilizados nos experimentos *in vivo* e *in vitro*.

Espécie	Código	Hospedeiro	Localidade	Acesso GenBank		
				ITS	TEF1- α	β t
<i>Lasiodiplodia brasiliense</i>	IBL348	<i>Mangifera indica</i>	Itapipoca/CE	KT151807	KT151801	KT151804
<i>L. caatinguensis</i>	CMM1325	<i>Citrus sinensis</i>	Itarema/CE	KT154760	KT008006	KT154767
<i>L. euphorbicola</i>	IBL327	<i>Annona squamosa</i>	Itarema/CE	KT247491	KT247493	KT247495
<i>L. pontae</i>	CMM1277	<i>Spondias purpurea</i>	Pio-IX/PI	KT151794	KT151791	KT151797
<i>L. pontae</i>	IBL18	<i>Anacardium occidentale</i>	Mossoró/RN	KT151795	KT151792	KT151798
<i>L. pseudotheobromae</i>	IBL266	<i>Anarcadium occidentale</i>	Pentecoste/CE	KT247480	KT247484	KT247486
<i>L. pseudotheobromae</i>	IBL201	<i>Spondias purpurea</i>	Cachoeira dos índios/PB	KT247478	KT247482	KT247488
<i>L. pseudotheobromae</i>	IBL 134	<i>Annona × atemoya</i>	Beberibe/CE	KT247481	KT247485	KT247487
<i>L. theobromae</i>	IBL404	<i>Anarcadium occidentale</i>	Buique/PI	KT247468	KT247470	KT247476
<i>Neofusicoccum brasiliense</i>	IBL447	<i>Psidium guajava</i>	Cruz/CE	KT247455	KT247457	-
<i>N. kwambonambiense</i>	IBL220	<i>Anarcadium occidentale</i>	Pio IX/PI	KT247454	KT247456	-
<i>Neoscytalidium hyalinum</i>	IBL89	<i>Mangifera indica</i>	Varjota/CE	KT247460	KT247458	-
<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	IBL500	<i>Anarcadium occidentale</i>	Pio IX/PI	KT247464	KT247462	-

Abreviações: CE – Ceará, RN – Rio Grande do Norte, PI – Piauí, PB- Paraíba, ITS – Espaçadores Internos Transcrito da região do DNA ribossomal; TEF1- α : gene da região codificadora de proteína fator de alongação 1- α ; β t - gene da região codificadora de proteína beta tubulina. Acesso ao GenBank: códigos para o acesso banco de dados da NCBI (National Center for Biotechnology Information), disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

2.2 Controle genético *in vivo*

O experimento foi realizado em condições de campo, no Campo Experimental de Pacajus (CEP), Ceará, Brasil (4°11'12"S, 38°30'01"W, e a 79 m de altitude). Conforme classificação de Köppen, o município apresenta tipo climático Aw, com temperatura média anual de mínima de 25 °C e máxima de 31 °C.

Foram utilizados nove genótipos de cajueiro da Embrapa e registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2016). Destes, sete são de cajueiro-anão-precoce (CCP 09, CCP 76, Embrapa 51, BRS 189, BRS 226, BRS 253 e BRS 265), um de cajueiro-comum (BRS 274) e um híbrido (BRS 275).

As mudas de cada genótipo tinham em média um ano de idade e caules com diâmetro médio de 15 mm e cultivadas em sacos plásticos de polietileno (25 × 30 cm) com substratos a base de areia:esterco (3:1).

Os isolados de Botryosphaeriaceae utilizados nesse experimento, foram: *L. brasiliense* (IBL348), *L. caatinguensis* (CMM1325), *L. euphorbicola* (IBL327), *L. pseudotheobromae* (IBL134), *L. theobromae* (IBL404), *L. pontae* (IBL18), *Neoscytalidium hyalinum* (IBL89), *Neofusicoccum brasiliense* (IBL447), *N. kwambonambiense* (IBL220) e *P. stromaticum* (IBL500) (Tabela 1).

A metodologia utilizada para a inoculação das mudas foi proposta por Lima *et al.*, (2013), que consistiu na realização de um orifício no caule de cada planta, localizado a 15 cm de seu colo e 2 mm de profundidade, no qual foi realizado com o auxílio de furadeira elétrica com um e com uma broca de 2 mm de diâmetro. Utilizando uma agulha flambada, um disco de micélio, de 2 mm de diâmetro, de cada isolado, foi introduzido no interior de cada orifício. Ao final da introdução, cada orifício foi protegido com uma porção de vaselina sólida e vedado com parafilm. Mudas do tratamento controle foram perfuradas e inoculadas apenas com meio BDA e mantidas nas mesmas condições das plantas inoculadas.

Após 15 dias da inoculação, fim de visualizar e mensurar a lesão provocada pelo patógeno, com o auxílio de utilizando um canivete, as mudas foram avaliadas através da realização de cortes longitudinais adjacentes ao tecido onde foi realizada a inoculação. As lesões foram mensuradas com o auxílio de um paquímetro digital, em milímetros

(mm), sendo também qualificadas quanto à presença ou ausência de produção de resina, de cancos, plantas murchas e mortas. Fragmentos de tecidos das plantas que apresentaram lesões necróticas foram transferidos para placas com BDA a fim de realizar o reisolamento do patógeno inoculado.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado e esquema fatorial com dois fatores (genótipos × espécies). Foram utilizadas seis repetições, onde cada repetição foi representada por muda de cada genótipo. As médias obtidas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) utilizando o programa estatístico Sisvar 5.3 e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

2.3 Controle químico *in vitro*

O experimento foi conduzido no laboratório de fitopatologia da Embrapa Agroindústria Tropical em Fortaleza, Ceará. Os isolados das espécies de Botryosphaeriaceae utilizados foram: *L. caatinguensis* (CMM1325), *L. brasiliense* (IBL348); *L. euphorbicola* (IBL327); *L. pseudotheobromae* (IBL266), *L. pontae* (CMM1277), *L. theobromae* (IBL404), *Ne. hyalinum* (IBL89), *P. stromaticum* (IBL500), *N. brasiliense* (IBL447) (Tabela 1).

Os isolados foram submetidos ao efeito *in vitro* de dois fungicidas nas concentrações: 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ dos respectivos ingredientes ativos (i.a) testados (Tabela 2).

Tabela 2: Características dos ingredientes ativos utilizados no ensaio *in vitro*. Fortaleza, Ceará, 2016.

Ingrediente ativo	Grupo químico	Nome comercial	Formulação	Modo de ação
Carbendazin	Benzimidazol	Carbomax	500 g L ⁻¹ SC	Inibição da mitose e divisão celular
Tebuconazole	Triazol	Folicur	200 g L ⁻¹ EC	Inibidor das funções da membrana celular e da biossíntese de esteróis

Abreviaturas: SC: Solução concentrada, EC: Concentrado Emulsionável

Para a preparação dos químicos, primeiramente, foram feitas uma solução inicial na concentração de 10 mg L⁻¹ de i.a do produto comercial de cada fungicida, para em

seguida, por meio do método de diluições sucessivas, as concentrações a serem testadas fossem aferidas para o volume desejado.

Alíquotas de cada concentração foram diluídas em meio de cultura BDA esterilizado para um volume final de 1L. Os meios com fungicidas foram distribuídos em placas de Petri de 90 mm de diâmetro em uma proporção média de 20 mL por placa. Depois de solidificados nas placas, o centro de cada placa de Petri com meio de cultura impregnado com concentração a ser testada, foi inoculado com um disco de micélio de 3 mm da espécie de Botryosphaeriaceae a ser testada. Como controle positivo, placas apenas com BDA foram inoculadas. As placas foram mantidas a 25 °C e fotoperíodo de 12h por quatro dias, período no qual os primeiros isolados nos tratamento controle alcançaram 100% de crescimento.

Diariamente, o crescimento micelial dos isolados foi mensurado, através da medição do diâmetro das colônias. As médias de crescimento foram utilizadas para os cálculos do percentual de inibição (%) e da concentração efetiva de i.a necessária para inibir 50% o crescimento micelial de cada espécie (CE_{50}). Para o cálculo da CE_{50} , utilizou-se a análise de Probit, realizada por meio do programa estatístico StatPlus.

O delineamento adotado foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial, com cinco repetições por tratamento, onde cada repetição correspondia a uma placa de Petri. As médias foram submetidas à análise de variância (ANOVA) da regressão a 5% de probabilidade, por meio do programa estatístico Sisvar 5.3.

Quando as curvas de regressão, para cada fungicida dentro de cada espécie, apresentaram o mesmo modelo de comportamento, comparações entre seus respectivos coeficientes foram realizadas, a fim de verificar se havia ou não diferenças significativas entre elas. Essa comparação foi realizada por meio do teste t de Student a 5% de probabilidade, para cada coeficiente. Quando as curvas eram de modelo, já foram consideradas significativamente diferentes.

O t tabelado de cada coeficiente foi, foi calculado utilizando a seguinte fórmula (1): **t calculado** = $[(ax^2_{\text{carbendazin}}) - (ax^2_{\text{tebuconazole})] / \text{SQE}$. Onde: $ax^2_{\text{carbendazin}}$ = valor do coeficiente angular do carbendazin; $ax^2_{\text{tebuconazole}}$ = valor do coeficiente angular do tebuconazole; SQE = Soma dos Quadros do Erro do coeficiente angular. Para os demais coeficientes da equação (bx, c), também foram feitos esses cálculos. Assim, quando o t calculado > t tabelado, de pelo menos de um dos coeficientes calculados,

davam significativos, as curvas entre os fungicidas para aquela espécie, foram consideradas iguais, ou seja, não diferindo entre si quanto a efeito.

3 RESULTADOS

3.1 Controle genético *in vivo*

Por meio da ANOVA, verificou-se interação significativa entre os fatores espécies *versus* genótipos. Logo, todas as espécies de Botryosphaeriaceae analisadas mostraram-se patogênicas quando inoculadas nos caules dos diferentes genótipos de cajueiros (Tabela 3). No entanto, verificou-se grandes variações quanto ao tamanho das lesões, o tipo e frequência dos sintomas provocados as plantas.

Em geral, pode-se observar que as espécies *Ne.hyalinum* e *P. stromaticum* foram menos agressivas, provocando lesões de menores comprimentos aos genótipos. O genótipo BRS253 mostrou-se como o mais susceptível às espécies de Botryosphaeriaceae, apresentando as lesões de maiores comprimentos (Tabela 3).

Estatisticamente, as espécies de Botryosphaeriaceae não apresentaram diferenças significativas entre si quando inoculados nos genótipos BRS 274 e EMBRAPA51, evidenciando certa resistência genética destes materiais frente à inoculação dessas espécies fúngicas (Tabela 3).

No genótipo BRS274 as lesões provocadas pelas espécies variaram $26,70 \pm 9,0$ mm, e no genótipo Embrapa51 as lesões variaram de $25,41 \pm 5,19$ mm. As espécies *L. brasiliense*, *L. caatinguensis*, *L. euphorbicola* e *L. pontae* se destacaram como as mais agressivas a todos os genótipos, com exceção para *L. pontae* no BRS189 e *L. caatinguensis* no BRS253 e BRS265. Importante destacar também, a agressividade do isolado de *N. kwambonambiense* quando inoculado aos genótipos CCP76, BRS226 e BRS253.

Quanto à sintomatologia, quando comparados com as espécies de *Lasiodiplodia*, as espécies dos gêneros *Pseudofusicoccum*, *Neoscytalidium* e *Neofusicoccum* causaram menos sintomas (cancros, resina, seca e morte) aos genótipos de cajueiro. Observou-se que quanto mais agressivo a espécie, maior era a quantidade de resina exsudada pelos hospedeiros e maiores as lesões internas, externas, sob e adjacentes ao tecido caulinar inoculado. E conseqüentemente, quanto maiores às lesões, maior foi a formação cancrs necróticos. Apenas *P. stromaticum* não causou lesões externas, cancrs, seca e morte

nas plantas, notando que apenas o genótipo CCP09 não produziu resina ao ser inoculado.

Tabela 3. Comprimento da lesão (mm) provocada por espécies de Botryosphaeriaceae no caule de diferentes genótipos de cajueiro. Fortaleza, Ceará, 2016.

Espécies	Genótipos*									
	CCP76	BRS189	BRS226	BRS253	BRS265	BRS274	BRS275	CCP09	Embrapa51	Média
<i>L. brasiliense</i>	42,42Aa	50,37Aa	49,81Aa	57,42Aa	36,58Ab	31,52Ab	52,40Aa	22,90Ba	26,53 Aa	41,10
<i>L. caatinguensis</i>	48,26Aa	47,40Aa	35,29Aa	35,12Ba	20,70Bb	28,70Ab	24,59Bb	26,29Bb	19,73 Ab	31,78
<i>L. euphorbicola</i>	61,49Aa	65,73Aa	43,46Ab	70,36Aa	45,40Ab	37,30Ab	41,87Ab	25,32Bb	28,95 Ab	46,65
<i>L. pontae</i>	60,81Aa	33,72Bb	40,57Ab	69,67Aa	59,37Aa	27,22Ab	44,32Ab	22,09Bb	32,87 Ab	43,40
<i>L. pseudotheobromae</i>	29,59Bc	30,62Bc	63,37Aa	43,11Bb	26,55Bc	20,28Ac	20,31Bc	36,31Bc	22,60 Ac	32,53
<i>L. theobromae</i>	19,73Bb	31,43Bb	38,89Ab	32,05Bb	24,38Bb	40,45Ab	22,32Bb	61,10Aa	23,99 Ab	32,70
<i>N. kwambonambiense</i>	45,80Aa	36,80Bb	42,95Aa	56,35Aa	29,30Bb	24,95Ab	29,23Bb	28,79Bb	21,40Ab	35,06
<i>Ne. hyalinum</i>	32,01Ba	10,64Ca	16,45Ba	29,56Ba	11,58Ba	16,47Aa	15,19Ba	12,72Ba	19,76Aa	18,26
<i>P. stromaticum</i>	32,92Ba	14,27Cb	27,79Ba	26,75Bb	17,70Bb	13,46Ab	32,72Ba	14,54Bb	32,94Aa	23,68
Média	41,45	35,66	39,84	46,71	30,17	26,70	31,44	27,78	25,42	

*Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas na coluna e mesmas letras minúsculas nas linhas não se diferenciam entre si pelo teste de Scott-Knott $P \leq 0,05$.

3.2 Controle químico *in vitro*

Por meio da análise de Probit, foi observado que o i.a carbendazin apresentou as menores CL_{50} (Tabela 4) quando comprado ao i.a tebuconazole, frente à inibição das espécies de Botryosphaeriaceae.

A espécie *L. theobromae* foi a mais sensível ao carbendazin, necessitando da menor CE_{50} , seguida das espécies *L. euphorbicola*, *N. brasiliense*, *Ne. hyalinum* e *P. stromaticum*, as quais apresetaram, entre si, o mesmo valor de DL_{50} (Tabela 4). Quanto ao tebuconazole, os valores de DL_{50} foram superiores para todas as espécies quando compradas com o carbendazin. Através da análise de probit estima-se que as *L. brasiliense*, *L. pseudotheobromae* e *L. pontae* necessitam de doses de tebuconazole superiores às testadas no presente trabalho, para que haja a inibição de pelo menos 50% de seu crescimento (Tabela 4).

Tabela 4. Concentração letal (CL_{50}) *in vitro* dos i.a carbendazin e tebuconazole para inibir 50% do crescimento das espécies de Botryosphaeriaceae. Fortaleza, Ceará, 2016.

Fungicida	Isolados	CE_{50} (mg L ⁻¹)	IC- CE_{50} (mg L ⁻¹)
Carbendazin	<i>L. brasilienses</i>	0,37	0,32 - 0,42
	<i>L. caatinguensis</i>	0,36	0,06 - 2,32
	<i>L. euphorbicola</i>	0,12	0,03 - 0,44
	<i>L. pontae</i>	0,43	0,20 - 0,90
	<i>L. pseudotheobromae</i>	0,38	0,09 - 1,62
	<i>L. theobromae</i>	0,06	0,02 - 0,17
	<i>Neofusicoccum brasiliense</i>	0,12	0,03 - 0,44
	<i>Neoscytalidium hyalinum</i>	0,12	0,03 - 0,44
	<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	0,12	0,03 - 0,44
Tebuconazole	<i>L. brasiliense</i>	4,20	3,66 - 4,75
	<i>L. caatinguensis</i>	0,75	0,68 - 0,82
	<i>L. euphorbicola</i>	0,63	0,30 - 1,67
	<i>L. pseudotheobromae</i>	5,81	5,30 - 6,32
	<i>L. pontae</i>	5,54	4,62 - 6,46
	<i>L. theobromae</i>	3,72	3,22 - 4,22
	<i>Neofusicoccum brasiliense</i>	3,58	2,85 - 4,30
	<i>Neoscytalidium hyalinum</i>	1,63	1,08 - 2,17
	<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	0,61	0,31 - 0,91

Abreviações: CE_{50} – Concentração efetiva necessária para inibir 50% do crescimento micelial da espécie. IC- intervalo de confiança.

De acordo com a ANOVA, verificou-se interação significativa entre os fatores fungicidas *versus* concentrações em todas as espécies analisadas.

O efeito percentual de inibição do crescimento micelial das espécies, em cada fungicida nas concentrações testadas, se ajustaram ao comportamento polinomial quadrático ($y=ax^2+bx+c$) de regressão, para todas as espécies, com exceção a *L. pseudotheobromae* no fungicida tebuconazole, que se ajustou ao modelo linear da regressão ($y=ax^2+b$) (Tabela 5).

Para as espécies *L. pontae*, *Ne. hyalinum* e *P. stromaticum* não houveram diferenças estatísticas significativa entre os efeitos dos fungicidas carbomax e tebuconazole (Valor de *P*, Tabela 5). Enquanto isso, para as demais espécies, foi verificado diferenças significativas entre o comportamento dos fungicidas (Valor de *P*, Tabela 5).

De acordo com as equações de regressão, a concentração capaz de causar a máxima inibição das espécies, foram de 2,98 mg L⁻¹ para a espécie *L. brasiliense* no fungicida carbomax e 10,91 mg L⁻¹ no fungicida tebuconazole. Para *L. caatinguesis* foram de 2,86 mg L⁻¹ e 3,33 mg L⁻¹ para os fungicidas carbomax e tebuconazole, respectivamente.

Para *L. euphobicola* de 2,90 mg L⁻¹ e 3,04 mg L⁻¹, respectivamente. Para a espécie *L. pseudotheobromae* no fungicida carbomax, a concentração máxima para inibir em 100% seu crescimento foi de 2,93 mg L⁻¹, enquanto que, para o tebuconazole, essa mesma concentração, causou inibição apenas de 24,53% do seu crescimento micelial. Para *L. theobromae* essas concentrações máximas foram de 2,87 mg L⁻¹ e 3,17 mg L⁻¹ para os fungicidas carbomax e tebuconazole, respectivamente. E para a espécie *N. brasiliense* foram de 2,95 e 3,23 mg L⁻¹ para os fungicidas carbomax e tebuconazole, respectivamente.

Tabela 5. Percentual de inibição *in vitro* do crescimento micelial das espécies de Botryosphaeriaceae quando submetidas a diferentes concentrações dos ingredientes ativos (i.a) carbendazin e tebuconazole. Fortaleza, Ceará, 2016.

Espécies	Fungicidas	Concentrações (mg L ⁻¹)							Equação da Regressão ¹	R ²	Valor de P
		0,0	0,01	0,05	0,1	0,5	1,0	5,0			
<i>L. brasiliense</i>	C	0,00	0,00	0,00	0,00	76,81	91,94	100,00	$y = -21,07x^2 + 125,77x - 2,20$	0,95**	s
	T	0,00	2,94	0,00	2,19	26,44	30,97	55,12	$y = -5,78x^2 + 39,82x + 0,63$	0,96**	
<i>L. caatinguensis</i>	C	0,00	0,00	1,57	0,00	90,38	86,78	80,37	$y = -22,017x^2 + 126,17x - 0,42$	0,87**	s
	T	0,00	0,00	1,62	12,32	49,28	60,21	97,66	$y = -11,53x^2 + 76,79x + 1,77$	0,97**	
<i>L. euphorbicola</i>	C	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00	100,00	100,00	$y = -24,75x^2 + 143,96x - 1,22$	0,89**	s
	T	0,00	0,00	0,00	17,13	56,29	66,52	80,31	$y = -14,21x^2 + 86,62x + 2,37$	0,95**	
<i>L. pontae</i>	C	0,00	0,00	0,00	23,57	76,53	88,75	100,00	$y = -19,41x^2 + 116,32x + 3,42$	0,94**	ns
	T	0,00	0,00	0,00	20,00	14,68	26,54	38,98	$y = -4,12x^2 + 27,74x + 3,40$	0,82**	
<i>L.pseudotheobromae</i>	C	0,00	0,00	0,00	12,42	76,70	89,92	90,57	$y = -21,102x^2 + 123,99x - 2,05$	0,94**	s
	T	0,00	0,00	0,00	0,00	13,58	20,00	37,00	$y = 6,41x + 5,75$	0,72**	
<i>L. theobromae</i>	C	0,00	3,68	10,19	100,00	100,00	100,00	100,00	$y = -19,80x^2 + 113,93x + 25,04$	0,58**	s
	T	0,00	0,60	0,00	0,00	30,42	44,35	59,43	$y = -9,00x^2 + 57,16x - 1,35$	0,98**	
<i>Ne. hyalinum</i>	C	0,00	0,00	0,00	0,00	85,91	94,93	100,00	$y = -9,98x^2 + 61,05x - 0,90$	0,94**	ns
	T	0,00	0,00	18,42	3,42	22,59	29,91	65,10	$y = -12,82x^2 + 82,915x + 0,32$	0,97**	
<i>N. brasiliense</i>	C	0,00	0,00	0,00	0,00	38,90	44,30	54,90	$y = -22,48x^2 + 132,72x - 1,80$	0,92**	s
	T	0,00	0,00	10,64	0,00	44,37	68,35	94,31	$y = -12,82x^2 + 82,915x + 0,32$	0,97**	
<i>P. stromaticum</i>	C	0,00	0,00	26,37	34,04	70,99	100,00	100,00	$y = -19,35x^2 + 114,53x + 10,97$	0,94**	ns
	T	0,00	10,87	4,87	27,39	73,90	77,03	100,00	$y = -15,48x^2 + 95,50x + 9,22$	0,91**	

Valor de P: probabilidade de t de Student a 5% significância, obtido pela comparação entre os respectivos coeficientes das equações de regressão de cada fungicida dentro de cada espécie. Os valores de t tabelado foram calculados pela Fórmula 1. (s) Pelo menos um dos coeficientes da regressão diferiu entre si pelo teste t de probabilidade a 5% de significância. Logo, os efeitos entre os fungicidas diferiram entre si dentro da espécie testada; (ns) os coeficientes da regressão não diferem entre si pelo teste t de probabilidade a 5% de significância. Logo, os efeitos entre os fungicidas não diferiram entre si, dentro da espécie testada. (**) diferiram a 5% de significância.

Figura 1. Visualização das curvas de regressão para as espécies de Botryosphaeriaceae submetidas a diferentes concentrações dos ingredientes ativos carbendazim e tebuconazole, conforme as informações contidas na tabela 1.

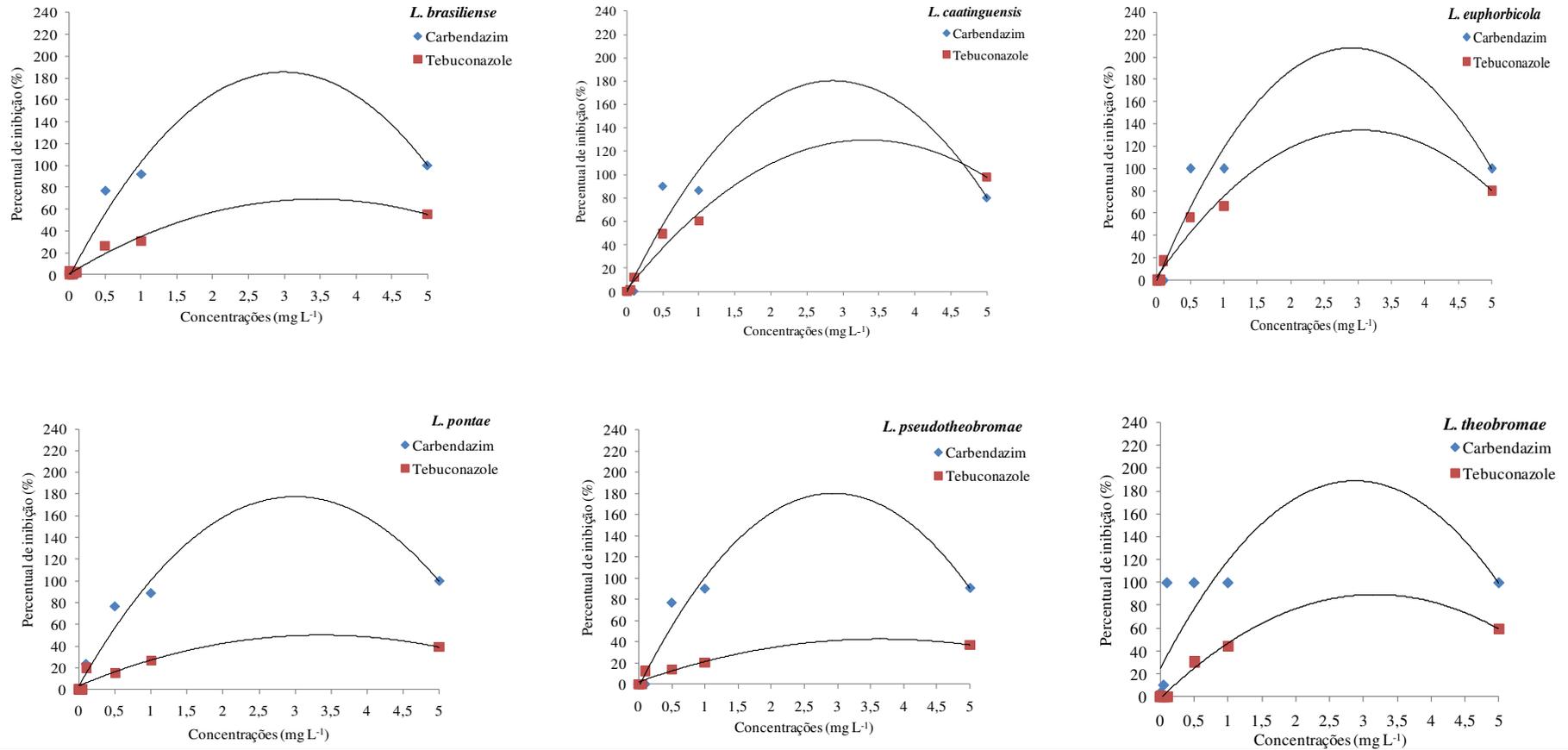
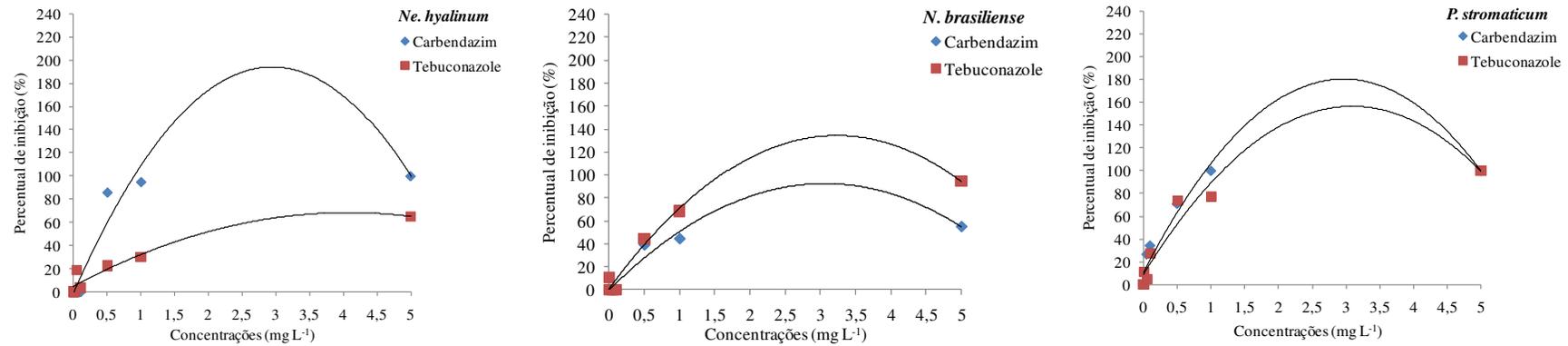


Figura 1. Visualização das curvas de regressão para as espécies de Botryosphaeriaceae submetidas a concentrações dos i.a carbendazim e tebuconazole, conforme as informações contidas na tabela 1.



4 DISCUSSÃO

Raros são os estudos que avaliam a interação entre espécies de Botryosphaeriaceae-hospedeiros-ambiente para fins de manejo, além da carência de fungicidas registrados junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para fins de controle dessas espécies. Portanto, o presente estudo se destaca como o primeiro a avaliar a virulência de várias espécies de Botryosphaeriaceae em genótipos de cajueiro desenvolvidos pela Embrapa Agroindústria Tropical, bem como a avaliação do efeito *in vitro* dos fungicidas (carbendazin e tebuconazole).

Até então *Lasiodiplodia theobromae* sensu lato era a única espécie responsável por provocar enfermidade, juntamente com a presença de cancrios e morte descendente em ramos de cajueiro (Coutinho *et al.*, 2016) sendo até então a única Botryosphaeriaceae estudada em plantas jovens de genótipos de cajueiro cultura. Ao inocularmos nove diferentes espécies de Botryosphaeriaceae, isoladas de diversas fruteiras tropicas no Nordeste brasileiro, em nove genótipos de cajueiro anão precoce, percebeu-se a incidência da doença em todas as plantas inoculadas, porém com diferentes níveis de virulência, dependendo da interação patógeno x hospedeiro. Outras espécies de *Lasiodiplodia* como: *L. brasiliense*, *L. caatinguensis*, *L. euphorbicola* e *L. pontae* mostraram-se mais virulentas que *L. theobromae* sensu stricto, por provocarem maiores lesões em seus tecidos. O tamanho da lesão ou a taxa de expansão da lesão são considerados importantes componentes, utilizados pelos melhoristas, para análise da resistência do hospedeiro bem como na distinção de fontes de resistências dentro de espécies de plantas (BERGER *et al.*, 1997).

Até o ano de 2002, CCP 76, primeiro genótipo obtido no ano de 1983, era majoritariamente o mais cultivado em larga escala no semiárido nordestino e por isso apresentando vários problemas fitossanitários, destacando-se a ocorrência da resinose (CARDOSO *et al.*, 1998), fato este que pode explicar o crescente desenvolvimento da doença na região (CARDOSO *et al.*, 2006). Em virtude desse aspecto, a Embrapa Agroindústria Tropical viu-se diante da necessidade de desenvolver estudos objetivando a elucidação dos aspectos epidemiológicos envolvendo o controle da resinose, focando principalmente na busca pela seleção e obtenção de genótipos de cajueiro comercialmente produtivos e resistentes à essa enfermidade (PAIVA *et al.*, 2002; CARDOSO *et al.*, 2006). A obtenção desses genótipos ocorreu, principalmente, devido à grande variabilidade genética presente nas

populações de cajueiro, que proporcionou a ocorrência de tipos superiores e a formação de plantas que entraram no processo de competição (PAIVA *et al.*, 2004).

O genótipo Embrapa 51, lançado no mercado em 1996, considerado um material alternativo para resistência a resinose (CARDOSO *et al.*, 2007), a antracnose e, moderadamente resistente ao mofo preto (CARDOSO *et al.*, 1999) mostrou-se também moderadamente resistente a todas as espécies de Botryosphaeriaceae inoculadas (Tabela 4). O mesmo comportamento também foi observado no genótipo BRS274 demonstrando também possuir uma resistência moderada as essas espécies, o que nos leva a recomendá-los como materiais mais resistentes a resinose.

Estudos comprovaram que os genótipos CCP76 e BRS266 mostram-se susceptível e resistente, respectivamente, a resinose provocada *Lasiodiplodia theobromae* sensu lato (PAIVA *et al.*, 2008; CARDOSO *et al.*, 2010). No entanto, no presente trabalho, os referidos genótipos, assim como o genótipo BRS189, mostraram-se igualmente susceptíveis as espécies de Botryosphaeriaceae inoculadas, compondo um grupo aqui classificado como moderadamente susceptível (Tabela 4). O genótipo BRS253 mostrou-se o acesso mais susceptível às espécies de Botryosphaeriaceae inoculadas. Uma vez que os teores de tanino do genótipo BRS226 são superiores ao do CCP76 no pseudofruto (PAIVA *et al.*, 2004) sugerem a hipótese que esses teores sejam superiormente presentes nos tecidos caulinares, o que lhes confere uma maior resistência quando infectado com *L. theobromae* lato sensu (CARDOSO *et al.*, 2010). No entanto, diante da alta virulência das espécies inoculadas nestes respectivos genótipos (Tabela 4), observamos a necessidade de mais investigações quanto à epidemiologia dos patógenos usados. Com relação aos genótipos avaliados no nosso estudo saliente-se que, a falta de manejo adequado do cajueiro, tem contribuído para o estabelecimento de várias doenças em pomares contribuindo para o aumento substancial das podridões causadas por fungos da família Botryosphaeriaceae nas principais áreas produtoras do semiárido nordestino (CARDOSO *et al.*, 2004; CARDOSO *et al.*, 2006; PAIVA *et al.*, 2008).

A falta de especificidade de muitos membros da Botryosphaeriaceae (SLIPPERS & WINGFIELD, 2007), sugere que a expansão da área e especiação dentro deste grupo é influenciada por fatores ambientais (SAKADILIS *et al.*, 2013). A suscetibilidade e a resistência das plantas às doenças podem ser controladas tanto por fatores genéticos, como também determinada por fatores não-genéticos como a idade da planta e o ambiente, os quais freqüentemente atuam antes da infecção pelo patógeno (ROUX & WINGFIELD, 1997).

Ao avaliar a virulência de *Fusicoccum aesculis* e *Neofusicoccum parvum*, a 47 acessos de mangueira, foi observado que todos os acessos foram mais ou menos susceptíveis e que as infecções provocadas por estas espécies aumentaram de tamanho com o tempo, dependendo das condições de temperatura, estágio de desenvolvimento do hospedeiro, umidade relativa e da resistência do hospedeiro (BATISTA *et al.*, 2012). Com relação ao estudo com genótipos de cajueiro, estes indicam que a susceptibilidade à resinose de grande parte do germoplasma testado é, possivelmente, devido a um tipo de resistência poligênica ou do tipo horizontal (CARDOSO *et al.*, 2006).

A incidência e a severidade de *L. theobromae* lato sensu em diferentes campos de germoplasma de cajueiro possuem alta correlação com fatores do tipo: pressões de outras doenças, genótipos envolvidos, idade das plantas e estágios da epidemia, sendo necessários estudos de duração de no mínimo de três anos em pomares, a fim de que se tenha um índice de doença confiável para se obter parâmetros de resistência e susceptibilidade (CARDOSO *et al.*, 2004).

Mesmo diante das dificuldades com a legalização de produtos químicos para o controle de espécies de Botryosphaeriaceae, a eficiência desses produtos é cada vez mais testada diante do espectro de espécies e novas associações patógeno-hospedeiro identificadas. Dentre os mais utilizados se encontram os grupos dos benzimidazóis e triázóis por serem alguns dos registrados para o controle de espécie de Botryosphaeriaceae. Os benzimidazóis atuam na divisão celular fúngica, interrompendo a divisão celular obstruindo o ciclo mitótico e a formação da placa metafásica. Os triázóis, por outro lado, inibem a formação do ergosterol, prejudicando a formação das membranas celulares, provocando o colapso das células fúngicas e a interrupção do crescimento micelial; sendo capaz de ativar uma variedade de diferentes mecanismos de resistência através de mutações em genes alvo ou ativações de enzimas alternativas (MA & MICHAELIDES, 2005).

O carbendazin mostrou-se o mais eficiente em inibir o crescimento micelial das espécies de Botryosphaeriaceae aqui testadas quando comparado ao tebuconazole, necessitando de menores CE_{50} (Tabela 5). Espécies do gênero *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* e *Pseudofusicoccum* bem como *L. euphorbicola* mostraram-se mais sensíveis que as demais espécies, sendo inibidas somente com CE_{50} de 0,12 mg L⁻¹ de carbendazin (Tabela 5). Mesmo necessitando de CE_{50} maiores *Neoscytalidium*, *Pseudofusicoccum*, *L. euphorbicola* e *L. caatinguensis* também se mostraram as mais sensíveis ao Tebuconazole. Neste caso, testes em *in vivo* em plantas jovens em casa de vegetação e em campo, bem como em plantas adultas

em pomares já instalados, são necessários para avaliar a real eficiência desses produtos nas respectivas espécies de Botryosphaeriaceae testadas, até então não estudadas no Bioma Caatinga. Propõem-se também, a seleção de outros fungicidas, tanto de contato como sistêmicos, a partir de diferentes grupos químicos, uma vez que a rotação e a combinação de produtos de modo de ação diferentes impedem populações de patógenos de desenvolver resistência (DENMAN *et al.*, 2004).

Em comparação aos dois fungicidas aqui testados, outros estudos também ressaltam a superioridade de carbendazin frente ao tebuconazole no controle de Botryosphaeriaceae. *L. theobromae* continua a ser a espécie mais investigada, porém nota-se uma crescente demanda no estudo de outras espécies da família, as quais, mediante as novas ocorrências no Brasil, nos norteia para os próximos trabalhos. Pitt *et al.*, (2012) destacam a superioridade de carbendazin quando comparado a outros fungicidas, inclusive ao tebuconazole, no controle de cancos de videiras provocados por Botryosphaeriaceae, se entretanto, descartar a eficiência dos demais produtos. Quanto a sensibilidade das espécies, esses autores mostram que *N. parvum* foi o mais sensível seguida de *B. dothidea*, *Diplodia seriata* e *L. theobromae*, sendo necessário *in vitro* CE₅₀ de 0,02 mg L⁻¹ de Carbendazim, enquanto no campo foram necessário 1 ml L⁻¹ para controlar entre 27 e 41% dessas Botryosphaeriaceae. Syed *et al.* (2014), ao testarem um espectro de fungicidas em frutos de manga no controle de *L. theobromae*, ressaltam a superioridade de Carbendazin frente aos outros princípios ativos, inibindo 100% o patógeno a partir de 10 ppm do i.a *in vitro* e 20.000 ppm *in vivo*. No Brasil, Pereira *et al.* (2012) relatam que isolados de *L. theobromae*, oriundos de pomares de mamão, mostraram-se menos sensíveis ao Tebuconazole e necessitando de maiores CE50 (0.14 a 4.05 mg L⁻¹) corroborando com os valores encontrados em nosso estudo (3,22 a 4,22 mg L⁻¹). Estes valores mostram-se bastante elevados quando comparados com outras espécies filogeneticamente próximas a *L. theobromae*, como *B. dothidea* (0.291 mg L⁻¹) (MA *et al.*, 2002) e *B. protearum* (1,32 mg L⁻¹) (DEANMAN *et al.*, 2004).

Tebuconazole também se mostrou eficaz na inibição do crescimento micelial de *B. parva*, *B. obtusa*, *B. lutea* e *B. stevensii* em videiras, com CE₅₀ em torno de 0,09 mg L⁻¹, porém sendo incapaz em inibir a germinação de seus esporos (VAZ, 2008). O uso de doses recomendadas de tebuconazole e reduz o risco de desenvolvimento de resistência mostrando-se uma boa alternativa no controle de *B. dothidea* em pomares de pistacho na Califórnia, quando integrado em um manejo de doenças (Ma *et al.*, 2002). Tebuconazole e carbendazin

foram os mais eficazes, controlando igualmente o crestamento do pedúnculo em flores de *Polianthes tuberosa*, provocado por *L. theobromae* (DURGADEVI *et al.*, 2014).

Diante da baixa especificidade frente às atuais e as novas espécies de Botryosphaeriaceae, bem como às novas associações patógeno-hospedeiro ultimamente relatadas no Nordeste brasileiro, os resultados obtidos nessa pesquisa representa o início de um processo de investigação em torno da epidemiologia, sensibilidade e virulência dessas novas espécies, e como medidas promissoras de controle que visam complementar o manejo integrada das doenças provocadas por esses fungos. As espécies de *Lasiodiplodia*, principalmente as recentemente identificadas, mostraram-se sempre mais virulentas e resistentes que as espécies dos outros gêneros de Botryosphaeriaceae quando inoculadas nos diferentes genótipos de cajueiro e submetidas ao tratamento com fungicidas.

5 CONCLUSÕES

Quanto ao controle genético, todas as espécies de Botryosphaeriaceae inoculadas mostraram-se patogênicas aos genótipos de cajueiro, porém com diferentes níveis de virulência.

Em geral, as espécies de *Lasiodiplodia* foram mais virulentas aos genótipos de cajueiro, com destaque para *L. caatinguensis*, *L. brasiliense*, *L. euphorbicola* e *L. pontae*.

O genótipo de cajueiro BRS253 foi o mais susceptível, seguido dos genótipos CCP76, BRS189 e BRS226 que não diferiram entre si. Os demais genótipos foram moderadamente resistentes, com destaque para BRS274 e Embrapa 51, sobre os quais as espécies não diferiram em virulência.

Quanto ao controle químico, os fungicidas carbendazin e tebuconazole mostraram-se eficientes na inibição do crescimento das espécies testadas, porém carbendazin mostrou-se superior ao tebuconazole, necessitando de menores CE_{50} ($\leq 0,5$ mg L⁻¹). As espécies de *Neofusicoccum*, *Neocystaldium* e *Pseudofusicoccum* foram mais sensíveis a estes químicos.

6 REFERÊNCIAS

- AGROFIT – SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS. Disponível: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em 18 de maio de 2016.
- ADENIYI, D.O., ADEDEJI, A.R., ODUWAYE, O.F., KOLAWOLE, O.O. Evaluation of Biocontrol agents against *Lasiodiplodia theobromae* causing Inflorescence blight of Cashew in Nigeria. **Journal of Agriculture and Veterinary Science**, v.5. n.3, p.46-48, 2013.
- BATISTA, D.C., NETO, F.P.L., BARBOSA, J.S, AMORIM, C.C., BARBOSA, M.A.G. Avaliação da resistência de 47 acessos de mangueira aos fungos *Fusicoccum aesculis* e *Neofusicoccum parvum*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.34, n.3, p.823-831. 2012.
- BERGER, R.D., BERGAMIN FILHO, A., AMORIM, L. Lesion expansion as an epidemic component. **Phytopathology**, v.87, p.1005-1013, 1997.
- CARDOSO, J.E., FREIRE, F.C.O., SÁ, F.T., SOUZA, R.N.M. Disseminação e controle da resinose em troncos de cajueiro decepados para substituição de copa. Embrapa Agroindústria Tropical, **Comunicado Técnico**, 17, 1998. 4p.
- CARDOSO, J.E., CAVALCANTI, J.J.V., CAVALCANTE, M.J.B., ARAGÃO, M.L., FELIPE, E.M. Genetic resistance of dwarf cashew (*Anacardium occidentale* L.) to anthracnose, black mold, and angular leaf spot. **Crop Protection**, v.18, n.1, p.23-27, 1999.
- CARDOSO, J.E., SANTOS, A.A., ROSSETTI, A.G., VIDAL, J.C. Relationship between incidence and severity of cashew gummosis in the semi-arid Brazilian. **Plant Pathology**. v.53, p.363-367. 2004.
- CARDOSO, J.E., PAIVA, J.R., CAVALCANTI, J.J.V., SANTOS, A.A., VIDAL, J.C. Evaluation of resistance in dwarf cashew to gummosis in north-eastern Brasil. **Crop Protection**, v.25, p.855-859, 2006.
- CARDOSO, J.E., VIANA, F.M.P., CYSNE, A.Q., FARIAS, F.C., SOUSA, R.N.M. Genótipo Embrapa 51: uma Alternativa para Resistência à Resinose-do-Cajueiro. Embrapa Agroindústria Tropical. **Comunicado técnico**, 130. 2007. 3p.
- CARDOSO, J.E., BEZERRA, M.A., VIANA, F.M.P., SOUSA, T.R.M., CYSNE, A.Q., FARIAS, F.C. Ocorrência endofítica de *Lasiodiplodia theobromae* em tecidos de cajueiro e sua transmissão por propágulos. **Summa Phytopathol**, v.35, p.262-266, 2009.
- CARDOSO, J.E., CYSNE, A.Q., COSTA, J.V.T.A., VIANA, F.M.P. Método de avaliação da resistência de genótipos de cajueiro à resinose. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.4, p.329-333, 2010.
- CAVALCANTI, J.J.V., WILKINSON, M.J. The first genetic maps of cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Euphytica**, v.157, p.131-143. 2007.

CYSNE, A.Q., CARDOSO, J.E., MAIA, A.H.N., FARIAS, F.C. Spatial-temporal analysis of gummosis in three cashew genótipos at northeastern Brasil. **Journal of Phytopathology**, v.158, p.676-682. 2010.

CORREIA, K.C., SILVA, M.A, MORAIS J.R.M.A., ARMENGOLD, J., PHILLIPS, A.J.L., CÂMARA, M.P.S., MICHEREFF, S.J. 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, V.S.O., MICHEREFF, S.J., MARTINS, R.B., GAVA, C.AT., MIZUBUTI, E.S.G., CÂMARA, M.P.S. Species of Botryosphaeriaceae associated on mango in Brasil. **European Journal Plant Pathology**, v.127, p.509–519. 2010.

COUTINHO, I.B.L., FREIRE, F.C.O., LIMA, C.S., LIMA, J.S., GONCALVES, F.J.T., MACHADO, A.R.A., SILVA, M.S., CARDOSO, J. E. Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. **Plant Pathology**, 2016. Doi: 10.1111/ppa.12565

DENMAN, S., CROUS, P.W., SADIE, A., WINGFIELD, M.J. Evaluation of fungicides for the control of *Botryosphaeria protearum* on *Protea magnifica* in the Wester Cape Province of South Africa. **Australasian Plant Pathology**, v.33, p.97-102, 2004.

DURGADEVI, D., SANKARALINGAM, A., PRABHU, S. Impact of fungicides and biocontrol agents in managing peduncle blight of tuberose caudes by *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon and Maubl. **Plant Pathology Journal**, v.13, n.3, p.203-207, 2014.

FAN, K. WANG, J., FU, L., LI, X., ZHANG, Y., ZHANG, X., ZHAI, H., QU, J, Sensitivity of *Botryosphaeria dothidea* from apple to tebuconazole e in China. **Crop Protection**, v.87, 2016.

GUAN, X., ESSAKHI, S., LALOUE, H., NICK, P., BERTSCH, C., CHONG, J. Mining new resources for grape resistance against Botryosphaeriaceae: a focus on *Vitis vinifera* subsp. **Plant Pathology**, v.65, p.273–284, 2016.

MA, Z., MORGAN, D.P., FELTS, D., MICHAILEDIS, T.J. Sensitivity of *Botryosphaeria dothidea* from California pistachio to tebuconazole. **Crop Protection**, v.21, p.829–835. 2002.

MA, A., T.J. MICHAILEDIS. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, v.24, p.853-863. 2005.

MARQUES M.W., LIMA N.B., MORAIS J.R.M.A., BARBOSA, M.A.G., SOUZA, B.O, MICHEREFF, S.J, PHILLIPS A.J.L., CAMARA, M.P.S. Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brasil. **Fungal Diversity**, 61, 181–193. 2013a.

MARQUES, M.W., LIMA, N.B., MORAIS J.M.A, MICHEREFF, S.J., PHILLIPS, A.J.L., CÂMARA, M.P.S. *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* and *Pseudofusicoccum* species associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, v. 61, p.195- 208, 2013b.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO.
Disponível em:
http://extranet.agricultura.gov.br/php/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php.
Acesso em: 19 de maio de 2016.

MORAES, W.S, CASTRO, H.A., LIMA, J.D., LEITE, E.A.G., SOUZA, M. Suscetibilidade de três espécies cítricas à *Dothiorella gregaria* Sacc. em função do estado nutricional. **Ciência Rural**, v.37, n.1, 2007.

MOREIRA, R.C., LIMA, J.S., SILVA, L.G.C., CARDOSO, J.E. Resistance to gummosis in wild cashew genotypes in northern Brazil. **Crop Protection**, v.52, p.10-13, 2013.

NETO, J.R.A.S. Melhoramento da videira. **Bragantia**, v.14, n.23, 1955.

NETTO, M.S.B., ASSUNÇÃO, I.P., LIMA, G.S.A. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. **Fungal Diversity**, v.67, p.127–41, 2014.

PAIVA, J.R., CARDOSO, J.E., BARROS, L.M., CRISÓSTOMO, J.R., CAVALCANTI, J.J.V., ALENCAR, E.S. Genótipo de cajueiro-anão precoce BRS 226 ou Planalto: nova alternativa para o plantio na Região Semi-Árida do Nordeste. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, **Comunicado Técnico**, 78, 2002. 4p.

PAIVA, J.R., BARROS, L.M. Genótipos de cajueiro: obtenção, características e perspectivas. Embrapa Agroindústria Tropical, **Documentos**, 82, 2004, 26p.

PAIVA, J.R., CARDOSO, J.E., MESQUITA, A.L.M., CAVALCANTI, J.J.V., SANTOS, A.A. Desempenho de genótipos de cajueiro-anão precoce no semiárido do Estado do Piauí. **Ciência Agronômica**, v.39, p.295-300, 2008.

PEDRAZA, J.M.T., AGUILERA, J.A.M., DÍAZ, C.N., ORTIZ, D.T., MONTER, Á.V., MIR, S.G.L. Control of *Lasiodiplodia theobromae*, the causal agent of dieback of sapote mamey [*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore and Stearn] grafts in México. **Revista Fitotecnia Mexicana**. v.36, n.3, p.233-238, 2013.

PEREIRA, A.V.S, MARTINS, R.B, MICHEREFF, S.J, SILVA, M.B, CÂMARA, M.P.S. Sensitivity of *Lasiodiplodia theobromae* from Brazilian papaya orchards to MBC and DMI fungicides. **European Journal Plant Pathology**, v.132, p.489–498, 2012.

PERUMAL, A.B., SELLAMUTHU, P.S, NAMBIAR R.B., SADIKU E.R. Antifungal activity of five different essential oils in vapour phase for the control of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Lasiodiplodia theobromae* *in vitro* and on mango. **International Journal of Food Science and Technology**, v.51, p.411–418.

PITT, W. M., SOSNOWSKI, M. R., HUANG, R., QIU, Y., STEEL, C. C., AND SAVOCCHIA, S. Evaluation of fungicides for the management of *Botryosphaeria* canker of grapevines. **Plant Disease**. v.96, p.1303-1308. 2012.

ROUX, J., WINGFIELD, M.J. Survey and virulence of fungi occurring on diseased *Acacia mearnsii* in South-Africa. **Forest Ecology and Management**. v.99, p.327-336. 1997.

SAKALIDIS, M.L., SLIPPERS, B., WINGFIELD, B.D., HARDY, G.E.ST.J., BURGESS, T.I. The challenge of understanding the origin, pathways and extent of fungal invasions: global populations of the *Neofusicoccum parvum*–*N. ribis* species Complex. **Diversity and Distributions**. v.19, p.873–883. 2013.

SANTOS, C.A.F., LIMA FILHO, J.M.P., NETO, F.P.L. Estratégias para o desenvolvimento de novas cultivares de mangueira para o Semiárido brasileiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 32, n.2, p.493-497. 2010.

SIPPERS B, WINGFIELD MJ. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. **Fungal Biology Reviews**. v.21, p.90–106. 2007.

SYED R.N., MANSHA N., KHASKHELI, M.A., KHANZADA, M.A., LODHI, A.M. Chemical control of stem end rot of mango caused by *Lasiodiplodia theobromae*. **Pakistan Journal Phytopathological**. v.26, n.02, p.201-206. 2014.

TORRES, C., LATORRE, B.A., UNDURRAGA, P., BESOAIN, X. Evaluation of DMI fungicides against species of *Diplodia* and *Neofusicoccum* associated with Botryosphaeria canker of grapevine. **Ciencia Investigación Agrarias**, v.40, n.1. p.131-138. 2013.

TRAVADON, R., ROLSHAUSEN, P.E, GUBLER, W.D., DAVIDSON, L.C., BAUMGARTNER, K. Susceptibility of cultivated and wild *Vitis* spp. to wood infection by fungal trunk pathogens. **Plant Disease**, v.97 n.12, 2013.

TREMACOLDI, C.R., LUNZ, A.M., DIAS, D.P., COELHO, I.L., ALMEIDA, C.M.B., ISHIDA, A.K.N. Indutores de resistência no controle de *Lasiodiplodia theobromae* do mogno africano *in vitro*. **Tropical Plant Pathology**. v.35. 2010.

URBEZ-TORRES J. The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. **Phytopathologia Mediterranea** v.50, p.S5–45. 2011.

VAZ, A.T.A. Doenças causadas por fungos Botryosphaeriaceae em videira: Caracterização fenotípica e molecular de isolados e sensibilidade a fungicidas. Dissertação apresentada no Programa de Pós-graduação em Engenharia agrônômica. Universidade técnica de Lisboa. 93p. 2008.

XIANG, L., GONG, S., YANG, L., HAO, J., XUE, M., ZENG, F., ZHANG, X., SHI, W., WANG, H., YU, D. Biocontrol potential of endophytic fungi in medicinal plants from Wuhan Botanical Garden in China. **Biological Control**, v.94, p.47–55. 2016.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que o quadro sintomatológico envolvendo os sintomas de morte descendente, canchros e exudação de goma em caules e ramos de frutíferas lenhosas tropicais no Nordeste brasileiro, está diretamente associado a um complexo de espécies fúngicas pertencente à família Botryosphaeriaceae. Essa confirmação foi possível por meio da combinação de dados moleculares, através do sequenciamento gênico de três regiões do DNA e análise filogenética dos mesmos, e de dados morfofisiológicos e patogênicos dos isolados fúngicos obtidos.

Por meio do alinhamento das sequências e uso de programas de bioinformática, as análises filogenéticas foram estabelecidas, sendo então confirmada a presença de duas novas espécies do gênero *Lasiodiplodia*. Na descrição taxonômica dessas espécies, as mesmas foram denominadas: *Lasiodiplodia caatinguensis* sp. nov e *Lasiodiplodia pontae* sp. nov, em homenagem ao bioma Caatinga predominante no Nordeste, e *in memoriam* ao fitopatologista nordestino José Júlio da Ponte, respectivamente.

Além da descrição de novas espécies, outras espécies de *Lasiodiplodia* também foram identificadas (*Lasiodiplodia brasiliense*, *L. euphorbicola*, *L. pseudotheobromae*). Tais relatos foram objeto de um artigo já publicado em um periódico de impacto internacional (Plant Pathology, 2016, Doi: 10.1111/ppa.12565), que já se encontra disponível á comunidade científica.

Espécies de outros gêneros pertencentes à Botryosphaeriaceae também foram associadas aos sintomas supracitados, dentre elas: *Neofusicoccum brasiliense*, *Neofusicoccum kwambonambiense*, *Neoscytalidium hyalinum* e *Pseudofusicoccum stromaticum*. Esses relatos caracterizaram-se como inéditos em associação com frutíferas da família Anacardiaceae no estado do Ceará e do Piauí.

A presente tese revela-se, na literatura fitopatológica, como o primeiro estudo realizado no Ceará envolvendo a caracterização molecular de fungos da família Botryosphaeriaceae e a contribuir com a descrição de duas novas espécies. Os impactos dos resultados alcançados desempenham uma grande contribuição para a elucidação da diversidade taxonômica em volta desses fungos, bem como, para o avanço da micologia molecular mundial. Os demais resultados apresentados na tese irão gerar publicações em periódicos com Qualis Capes, no mínimo B1, e indexados com fator de impacto JCR (Journal Citation Reports).

Com isso, ressalta-se, que o sucesso na execução dos objetivos propostos na presente tese, foram frutos de parcerias estabelecidas entre o corpo discente e docente do Programa de

Pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará com pesquisadores da Embrapa Agroindústria Tropical, que forneceram toda a infraestrutura física, técnica e científica para a realização do mesmo. Ressalta-se também, que o desempenho e o compromisso dos profissionais que colaboraram para a execução desse trabalho, foram primordiais para o cumprimento da principal meta desse projeto: Gerar ciência de qualidade.