



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

REGIMARA FRANCISCA BERNARDO DA SILVA VIEIRA

**FUNGOS ENDOFÍTICOS DAS FAMÍLIAS *Botryosphaeriaceae* e
Pseudofusicoccumaceae ASSOCIADOS AO CAJUEIRO**

FORTALEZA

2020

REGIMARA FRANCISCA BERNARDO DA SILVA VIEIRA

FUNGOS ENDOFÍTICOS DAS FAMÍLIAS Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae
ASSOCIADOS AO CAJUEIRO

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

Orientador: Prof. PhD. José Emilson Cardoso

FORTALEZA

2020

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

V718f Vieira, Regimara Francisca Bernardo da Silva.
 Fungos endofíticos das famílias Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae associados ao cajueiro /
Regimara Francisca Bernardo da Silva Vieira. – 2020.
 75 f. : il. color.

 Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia), Fortaleza, 2020.
 Orientação: Prof. Dr. José Emilson Cardoso.

 1. Anacardium occidentale. 2. Fungos endofíticos. 3. Diversidade. 4. Filogenia. I. Título.

CDD 630

REGIMARA FRANCISCA BERNARDO DA SILVA VIEIRA

FUNGOS ENDOFÍTICOS DAS FAMÍLIAS Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae
ASSOCIADOS AO CAJUEIRO

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

Aprovada em: 28/02/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. PhD. José Emilson Cardoso (Orientador)
Embrapa Agroindústria Tropical (EMBRAPA)

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

Dr. Marlon Vagner Valentim Martins
Embrapa Agroindústria Tropical (EMBRAPA)

A Deus.

Aos meus pais Raimundo Nonato e Maria José.

Aos meus irmãos,

Ao meu esposo, Ricardo Vieira.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças no momento mais difícil e por todo o seu amor para comigo sempre ao meu lado me guiando e me iluminando para que meus sonhos se tornem realidade.

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

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pela bolsa concedida, através de convênio com o Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia.

A empresa Embrapa Agroindústria Tropical, por todo o apoio fornecido e todas as condições para que este trabalho pudesse ser realizado.

Ao meu orientador, PhD. José Emilson Cardoso, por ter aceitado me orientar pela paciência, profissionalismo, pelo incentivo, amizade e dedicação durante todo o mestrado.

Ao meu grande amigo, Dr. Weverson Lima Fonseca, por todo o apoio e ajuda no decorrer deste trabalho, pela amizade, paciência e por todos os conhecimentos compartilhados e por todas as sugestões para uma melhor execução desta dissertação.

Aos amigos e profissionais do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa (Suane, Maria, Thayanne, Wallysson, Samara, Dr. Marto Viana, Dr. Marlon Valentim, e ao Dr. Freire); aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa (Dra. Patrícia Bordallo e Myrella); aos amigos do Laboratório de Micologia da UFC (Prof. Cristiano Lima, Diene, Mirla, Janylle e Israel): a todos meu muito obrigado pela amizade, companheirismo e por toda a colaboração técnica e científica durante a execução deste trabalho e da minha vida acadêmica.

A todos os professores que fazem parte do Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia da UFC, em especial aqueles que contribuíram diretamente para minha qualificação profissional e formação acadêmica.

Aos meu esposo Ricardo Sousa Vieira, por todo apoio, amor, respeito, incentivo e ajuda que foram essenciais para conquistarmos mais um objetivo traçado.

Aos meus pais Raimundo Nonato Bernardo e Maria José Bernardo pela dádiva do meu nascimento e pela amizade e apoio necessário durante todas as fases da minha vida. Aos meus irmãos e a todos meu muito obrigado pela força, pelo carinho, pelo amor, pelos ensinamentos e apoio proporcionados.

E a todos que direta ou indiretamente colaboraram.

MEU MUITO OBRIGADA!

RESUMO

As famílias Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae (Ascomycota, Botryosphaeriales) são complexos de espécies, que engloba fungos ecologicamente adaptados a uma diversidade de plantas, onde são descritos como endofíticos ou patógenos latentes. São fungos conhecidos por causar doenças como cancro, morte descendente de ramos, podridão preta da haste em diversas frutíferas, sobretudo no cajueiro. Este estudo teve como objetivo de detectar a presença de fungos das famílias Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae em associação com o cajueiro, sua natureza endofítica e o seu padrão de disseminação entre as plantas. O estudo teve início com a coleta de plantas de cajueiro assintomáticas e castanhas de três clones específicos: CCP 76 (altamente suscetível), BRS 265 (suscetível) e BRS 226 (resistente). Em seguida, foram realizadas análises que resultaram na identificação de espécies de fungos pertencentes às famílias Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae nos diferentes tecidos avaliados. Posteriormente foi realizado teste de patogenicidade dos isolados em estudo, seguido de análise morfológica e filogenéticas. De acordo com as análises, morfológica e filogenética, percebeu-se grandes semelhanças entre os isolados endofíticos estudado com as espécies patogênicas já relatadas na literatura. A transmissão desses fungos ocorre tanto de forma horizontal quanto vertical, uma vez que foi comprovada a presença de fungos dessas famílias em sementes de cajueiro, evidenciando sua interação com a planta. Este estudo demonstra que os fungos das famílias Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae atuam como endofíticos, convivendo de maneira harmônica com a planta. Sua ação patogênica, no entanto, pode estar associada a condições de estresse sofrida pela planta, seja de origem fisiológica ou ambiental. Este é o primeiro estudo a identificar e caracterizar fungos endofíticos dessas famílias na cultura do cajueiro.

Palavras-chave: *Anacardium occidentale*; fungos endofíticos; diversidade; filogenia.

ABSTRACT

The families Botryosphaeriaceae and Pseudofusicoccumaceae (Ascomycota, Botryosphaeriales) comprise species complexes that include fungi ecologically adapted to a wide range of plants, where they are described as either endophytic or latent pathogens. These fungi are known to cause diseases such as cankers, dieback, and black stem rot in various fruit crops, particularly in cashew trees. This study aimed to detect the presence of fungi from the families Botryosphaeriaceae and Pseudofusicoccumaceae associated with cashew trees, their endophytic nature, and their dissemination patterns among plants. The study began with the collection of asymptomatic cashew plants and nuts from three specific clones: CCP 76 (highly susceptible), BRS 265 (susceptible), and BRS 226 (resistant). Subsequent analyses led to the identification of fungal species belonging to the families Botryosphaeriaceae and Pseudofusicoccumaceae in the different tissues evaluated. Pathogenicity tests were then conducted on the isolates, followed by morphological and phylogenetic analyses. Morphological and phylogenetic analyses revealed significant similarities between the endophytic isolates studied and the pathogenic species previously reported in the literature. The transmission of these fungi occurs both horizontally and vertically, as the presence of fungi from these families was confirmed in cashew seeds, highlighting their interaction with the plant. This study demonstrates that fungi from the families Botryosphaeriaceae and Pseudofusicoccumaceae act as endophytes, coexisting harmoniously with the plant. However, their pathogenic activity may be triggered under stress conditions experienced by the plant, whether physiological or environmental. This is the first study to identify and characterize endophytic fungi from these families in cashew cultivation.

Keywords: *Anacardium occidentale*; endophytic fungi; diversity; phylogeny.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Material vegetal sadio obtido de cajueiro. (a) Localização dos tecidos dos brotos de cajueiro utilizados no estudo (M.A = meristema apical; P.I. = ponto intermediário e P.E. = ponto de enxertia), (b) Variação na coloração e crescimento de colônia de fungos da família Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae.....	33
Figura 2 -	Inoculação de Botryosphaeriaceae em mudas de cajueiro. (a) mudas inoculadas; (b) e (c) lesão causada por Botryosphaeriaceae.....	41
Figura 3 -	Árvore filogenética inferida por máxima parcimônia (MP) de dados combinados das regiões genômicas ITS e EF e β -tub para espécies de Botryosphaeriaceae. Os valores de bootstrap com 1000 repetições são mostrados nos nós. <i>S. viticola</i> foi usada como grupo externo. Os espécimes obtidos nesse estudo são destacadas em negrito.....	44
Figura 4 -	Aspectos morfológicos das colônias dos isolados de Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae identificados nesse estudo, cultivado em BCA. (a) colônia e conídios do isolado BOT.EN 03, (b) colônia e conídios do isolado BOT.EN 35.....	46
Figura 5 -	Lesões provocadas por espécies de Botryosphaeriaceae em plantas jovens de cajueiro. (a) mudas sem lesão visível, (b) mudas que apresentaram pequena lesão, (c) muda apresentado sintoma inicial da doença (d) muda morta.....	48
Figura 6 -	Aspecto gerais das sementes usada neste estudo, para a detecção de fungos da ordem Botryosphaeriales. (a) aspectos externo da semente; (b) aspecto interno da semente usada no estudo.....	60

- Figura 7 - Árvore filogenética inferida por máxima parcimônia (MP) de dados combinados das regiões genômicas ITS e EF e β -tub para espécies da família Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae. Os valores de bootstrap com 1000 repetições são mostrados nos nós. *S. viticola* foi usada como grupo externo. Os espécimes obtidos nesse estudo são destacadas em negrito..... 66
- Figura 8 - Característica morfologia da conídios de fungos da família Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae. (a) *Lasiodiplodia hormozganensis*; (b) *Pseudofusicoccum stromaticum*, isoladas de castanha de caju..... 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Isolados das espécies de Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae utilizada neste estudo. Sendo composta por em espécies de Botryosphaeriaceae, número do isolado, planta hospedeira, país de origem e o número de acesso no GenBank para as sequências ITS, TEF1- α e β -tub.....	36
Tabela 2 -	Caracterização dos isolados de Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae utilizada no estudo de diversidade cultural e morfológica coletados na fazenda planalto no município de Pio-IX – PI.....	40
Tabela 3 -	Características morfológicas de conídios das espécies de Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae identificadas nesse estudo, em comparação com as descrições morfológicas originais de cada espécie.....	45
Tabela 4 -	Ensaio de Patogenicidade dos vinte isolados de fungos da família Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae nos clones BRS265 (susceptível) e BRS 226 (resistente).....	47
Tabela 5 -	Porcentagem de ocorrência de fungos da família Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae em sementes de cajueiro.....	61
Tabela 6 -	Isolados utilizados para a construção filogenética, planta hospedeiros, país de origem e código de acesso GenBank para as sequências ITS, TEF1- α e β -tub.....	66
Tabela 7 -	Características morfológicas de conídios das espécies de Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae identificadas nesse estudo, em comparação com as descrições morfológicas originais de cada espécie.....	68

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I	12
1.1	Introdução geral.....	12
1.2	Revisão de literatura	13
1.2.1	<i>Cultura do cajueiro</i>	13
1.2.2	<i>Principais doenças do cajueiro</i>	14
1.2.3	<i>Aspectos taxonômico e ecológico da família Botryosphaeriaceae</i>	16
1.2.4	<i>Família Pseudofusicoccumaceae</i>	18
1.2.5	<i>Fungos endofíticos</i>	18
1.2.6	<i>Ferramentas moleculares para identificação de Botryosphaeriaceae</i>	20
2	CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE FUNGOS ENDOFITICO DA FAMÍLIA BOTRYOSPHAERIACEAE E PSEUDOFUSICOCCUMACEAE ASSOCIADO A TECIDOS ASSINTOMÁTICO DE CAJUEIRO	
2.1	Introdução	32
2.2	Materiais e métodos	33
2.2.1	<i>Coleta das amostras e isolamento dos fungos</i>	33
2.2.2	<i>Extração, amplificação por PCR e sequenciamento de DNA</i>	34
2.2.3	<i>Análises filogenéticas</i>	35
2.2.4	<i>Estudo morfológico e características culturais</i>	40
2.2.5	<i>Caracterização patogênica dos isolados</i>	40
2.2.6	<i>Teste de sobrevivência dos fungos da família Botryosphaeriaceae</i>	42
2.3	Resultados	43
2.3.1	<i>Análise filogenética e sequenciamento do DNA</i>	43
2.3.2	<i>Caracterização morfológica</i>	46
2.3.3	<i>Caracterização patogênica</i>	49
2.4	Discussão	50
3	CAPÍTULO III: DETECÇÃO DE FUNGOS DA FAMÍLIA BOTRYOSPHAERIACEAE E PSEUDOFUSICOCCUMACEAE EM SEMENTES DE CAJUEIRO	
3.1	Introdução	59
3.2	Material e métodos	60

3.2.1	<i>Coletas das castanhas</i>	60
3.2.2	<i>Caracterização dos materiais coletados</i>	60
3.2.3	<i>Extração, amplificação e sequenciamento de DNA genômico</i>	62
3.2.3	<i>Análises filogenéticas</i>	63
3.2.4	<i>Caracterização morfológica dos isolados</i>	66
3.4	Resultados	66
3.4.1	<i>Análises filogenéticas</i>	66
3.4.2	<i>Caracterização morfológica dos isolados</i>	68
3.5	Discussão	69
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
	REFERÊNCIAS	73

1. CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma frutífera tropical de origem brasileira de ampla importância econômica e social para a região Nordeste, principalmente nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte e Piauí (IBGE, 2018). Contribuindo para a geração de emprego e renda, a exploração comercial de produtos como a castanha e o pedúnculo apresenta grande potencial, sendo a castanha o principal item destinado à exportação (Cardoso et al., 2018). Os avanços tecnológicos têm promovido um aumento na atividade industrial do processamento tanto para a castanha quanto para o pedúnculo, obtendo uma produção média anual de 99 mil toneladas amêndoa em 2017 (CONAB, 2017).

Com a introdução dos clones de cajueiros do tipo anão observou-se, um acréscimo na produção, pois os mesmos apresentaram características mais favoráveis ao cultivo intensivo, a suas características tais como: porte baixo, precocidade, uniformidade da castanha e maior rendimento tanto em amêndoa quanto em pedúnculo, permitindo também, uma exploração comercial para o caju de mesa (Barros; Crisóstomo, 1995; Oliveira et al., 2002). Entretanto, os problemas fitossanitários vêm se agravando, pois o uso dos clones contribuiu para a diminuição da variabilidade genética, tornando as plantas mais vulneráveis ao ataque de doenças e pragas (Oliveira et al., 2002; Viana, et al 2016).

Entre as principais doenças que acometem a cultura do cajueiro, destacam-se as provocadas por fungos da família Botryosphaeriaceae. Os fungos desta família são importantes patógenos de plantas lenhosas, podendo apresentar hábitos parasitário, endofítico e saprofítico, além de apresentarem uma ampla diversidade genética, morfológica e ecológica (Slippers; Wingfield, 2007). Os patógenos desse grupo são responsáveis por causar diferentes sintomas nas plantas, que vão desde morte descendente dos ramos, podridões de frutos e cancos em diversos hospedeiros lenhosos, podendo a doença ser agravada quando a planta é submetida a condições de estresse (Von arx, 1987; Slippers; Wingfield, 2007).

A importância econômica dos fungos da família Botryosphaeriaceae tem aumentado nos últimos anos devido às doenças que causam, estando intimamente associados aos hospedeiros e aos elevados prejuízos que podem ocasionar, especialmente por se tratar de doenças de característica silenciosa. A bioecologia desses fungos também se mostra bastante complexa, alternando entre comportamentos como endofíticos e como patógenos altamente agressivos e destrutivos, o que dificulta tanto sua detecção precoce quanto o manejo quando atuam como patógenos. Estudos recentes, utilizando técnicas moleculares baseadas em ácido

desoxirribonucleico (DNA), têm proporcionado grandes avanços na compreensão da filogenia, caracterização e taxonomia das espécies desse grupo (Slippers; Wingfield, 2007; Cardoso; Wilkinson, 2008; Lopes et al., 2014; Sakalidis et al., 2013; Coutinho et al., 2017). Entretanto, as interações entre espécies da família Botryosphaeriaceae e frutíferas arbóreas tropicais, como o cajueiro, têm sido estudadas principalmente sob o enfoque das interações patogênicas.

Diante do exposto, e a grande diversidade de fungos da família Botryosphaeriaceae e a necessidade de aprofundar os estudos sobre esses microrganismos, especialmente em frutíferas tropicais, este projeto teve como objetivo analisar a bioecologia e a patogenicidade de fungos dessa família que estão associados à cultura do cajueiro nas principais regiões produtoras dos estados do Ceará e Piauí.

1.2. REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 *Cultura do cajueiro*

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma frutífera tropical nativa do Brasil, pertencente à família da Anacardiaceae, provavelmente com origem no Nordeste brasileiro e atualmente encontra-se disperso nas regiões tropicais em todo o mundo, que vão desde Sudeste da Flórida, a África do Sul (Frota 1988; Cardoso; Viana, 2011). Cerca de 98% de área ocupada por cajueiro encontra-se com maior predominância na região Nordeste, sendo que deste total 80%, esta localizado nos estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte (Crisóstomo *et al.*, 2003). Por ser uma planta rústica o cajueiro, apresenta uma alta adaptabilidade aos solos de baixa fertilidade, clima seco e quente que é característico de regiões semiáridas (Cardoso; Viana, 2016; Serrano; Pessoa, 2017). No Nordeste a cajucultura, tem elevada importância econômica e social, devido a geração de emprego e renda nos períodos da entressafra das culturas de subsistência como milho e feijão e pelo alto aproveitamento de seus produtos na agroindústria. (Aguiar et al., 2000; Cardoso; Viana, 2011; Morreira et al., 2012).

O cajueiro foi a frutífera mais explorada em 2018 do estado do Ceará, chegando a 31,7% de produção de castanha (IBGE, 2019). Diversos produtos do cajueiro podem ser explorados comercialmente, tais como a madeira, a castanha e o caju (pedúnculo) (Brainer, 2018). Sendo a amêndoa o principal produto pelo seu alto valor agregado para a exportação, já o pedúnculo pode ser consumido in natura ou utilizado para a indústria na produção de doces, geleias, sucos e cajuína (Paiva et al., 2000). A castanha de caju é voltada principalmente para a exportação, tem como principais produtos: o líquido da casca da castanha (LCC), que é

proveniente do processamento da castanha sendo utilizado em revestimento, tintas, esmaltes, isolantes elétricos, reveladores fotográficos, abrasivos e antioxidante e a amêndoa da castanha de caju (ACC) é utilizada principalmente para a alimentação (Paiva *et al.*, 2000; Vidal, 2016).

Segundo a FAO (2018), Vietnã, Índia, Nigéria e Costa do Marfim, nessa ordem de importância, foram os maiores produtores mundiais de castanha de caju in natura em 2016, com 70,6% da produção mundial, enquanto o Brasil ocupou a décima quarta posição, produzindo cerca de 1,5% do volume total de castanha produzido no mundo. Dentre os países produtores de castanha o Brasil vem apresentando uma contínua queda de produtividade na produção de castanha. Essa redução é atribuída a alguns fatores principais: como o declínio natural dos pomares da produção, ocorrência de determinadas doenças e pragas chave dos cajueiros e os longos períodos de estiagem que se agravou ao longo de todo território nacional, sobretudo na região Nordeste (Vidal, 2016; Brainer, 2018).

O cajueiro apresenta uma grande variabilidade genética, sendo dividido em dois grupos distintos o cajueiro comum e o cajueiro anão, definidos basicamente pelo porte das plantas. O comum é o mais difundido, apresenta como característica um porte elevado, podendo chegar a uma altura média de 8 e 15 m de envergadura (expansão da copa), podendo chegar a 20 m. Apresentando uma capacidade produtiva bastante variável, devido a variabilidade genética, onde algumas plantas podem chegar a produzir menos de 1 Kg ou próximo de 180 kg de castanha por safra (Crisóstomo *et al.*, 2001). Já o cajueiro anão é caracterizado, por apresentar altura inferior a 4 m, copa homogênea, precoce, com início do florescimento entre 6 e 18 meses e alta produção (BARROS *et al.*, 1995). O cajueiro anão representa um ganho tecnológico para a exploração da cultura sob vários aspectos. Sua implantação é baseada em enxertia, o que assegura, além do seu baixo porte, a uniformidade, precocidade, redução de perdas na colheita e aproveitamento maior do pedúnculo e amêndoa (Cavalcanti *et al.*, 2000). Presentemente, 14 clones de cajueiro estão registrados no ministério da agricultura para plantio, sendo dois deles relacionados como comuns (BRS 274 e BRS 275) e os demais como anões (CCP 06, CCP 76, CCP 09, CCP 1001, Embrapa 50, Embrapa 51, BRS 189, BRS 226, BRS 253, BRS 265, Faga 1 e Faga 11) (MAPA, 2003; SERRANO, 2019).

1.2.2 Principais doenças do cajueiro

O cajueiro é afetado por diferentes patógenos (fungos e bactérias), responsáveis por causarem as principais doenças da cultura ao longo de todo o seu ciclo produtivo, sendo as doenças fúngicas as de maior frequência. Todas as partes da planta podem ser acometidas por

esses patógenos, logo a parte aérea (folhas e frutos) é a mais afetadas (Cardoso *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2018). Algumas destas doenças se destacam pelas severas epidemias que causam perdas significativas a cultura do cajueiro (Cardoso *et al.*, 2013). As condições de ambiente favoráveis e a susceptibilidade da planta são condições propícias a ocorrência severa de doenças principalmente no cajueiro do tipo anão que apresenta uma baixa variabilidade e uniformidade genética, tornando-o assim mais vulnerável ao ataque de patógenos (Cardoso; Viana, 2011; Viana *et al.*, 2016).

As mudanças climáticas, associadas ao manejo inadequado e à prática do monocultivo, têm provocado alterações epidemiológicas significativas, promovendo a ascensão de doenças que antes eram consideradas secundárias (Cardoso *et al.*, 2002; Cardoso; Viana, 2011; VIANA *et al.*, 2016). As doenças são os principais entraves para a exploração eficiente do cajueiro devido aos seus danos diretos na integridade física e na fisiologia da cultura ou, indiretamente, atuando na interação com outros tipos de estresses (Moreira *et al.*, 2012).

As principais doenças do cajueiro são: a antracnose (*Colletotrichum* spp.), o oídio (*E. quercicola* e *E. necator*), o mofo-preto (*Pilgeriela anacardii* Arx e Muller), a mancha-de-xantomonas (*Xanthomonas campestris* pv. *mangiferae indicae*) e o complexo de doenças causadas por fungos da família Botryosphaeriaceae (resinose, morte descendente e podridão-preta-das-hastes) (Freire *et al.*, 2002; Cardoso *et al.*, 2006; Cardoso *et al.*, 2013; Viana *et al.*, 2016; Cardoso *et al.*, 2017; Coutinho *et al.*, 2017; Fonseca *et al.*, 2019).

A resinose, causada por fungos do gênero *Lasiodiplodia* spp., é atualmente considerada a segunda doença mais relevante na cultura do cajueiro. Ela afeta diretamente os vasos condutores da planta, bloqueando o fluxo de seiva por toda a sua extensão, o que compromete gravemente a saúde e a produtividade da cultura (Cardoso; Viana, 2011; Moreira *et al.*, 2012; Viana *et al.*, 2016; Coutinho *et al.*, 2017; Cardoso *et al.*, 2018). Esta doença foi descrita pela primeira vez na região Nordeste no município de Alto Santo (Freire, 1991). Está associada a planta estressada (altitude, amplitude térmica e alta temperatura) e os primeiros sintomas se manifestam no período de 24 a 36 meses de idade da planta, período em que a planta começa a sua produção comercial. Os sintomas se caracterizam inicialmente pelo escurecimento localizado no tronco apresentando rachaduras, que eventualmente podem exsudar uma goma característica. Nos tecidos internos, também é observado um escurecimento que se estende desde a região cortical e o câmbio vascular bloqueando os tecidos condutores, provocando amarelecimento, seca e morte do ramo ou da planta (Cardoso *et al.*, 2006; Sacramento; Souza, 2009; Alves *et al.*, 2015 Cardoso *et al.*, 2018).

Podridão-preta-das-hastes (PPH), é também doença ocasionada por *Lasiodiplodia* spp., foi descrita pela primeira vez nos estados de Ceará e Piauí (Cardoso et al., 2000). Os sintomas são caracterizados pelo escurecimento longitudinal das hastes terminais, com exsudações de uma goma, que progride para uma necrose. No cerrado brasileiro é considerada a doença mais importante do cajueiro devido às condições climáticas favoráveis, como elevadas precipitações pluviais no período de brotações (Cardoso et al., 2002).

A morte descendente é uma doença atribuída a um complexo de fungos da família da Botryosphaeriaceae (Ramos et al., 1991). Vários gêneros estão associados a morte descendente entre eles: *Lasiodiplodia*, *Botryosphaeria*, *Fusicoccum*, *Neoscytalidium*, *Neofusicoccum*, *Pseudofusicoccum* e *Cophinforma* (Marques et al., 2013b; Machado et al., 2014a; Cardoso et al., 2019). A sintomatologia da doença inclui o murchamento e o cancro dos ramos terminais e laterais, geralmente de forma unilateral, podendo se expandir para toda a copa da planta. Com o tempo, observa-se a queda das folhas e a necrose do sistema vascular, o que leva à morte do ramo afetado (Ploetz et al., 2009a; Cardoso et al., 2019).

Desde modo, estas e outras espécies de fungos pertencentes a família Botryosphaeriaceae, apresentam grande destaque na região Nordeste, por serem responsável por elevadas perdas de produção na fruticultura da região (Freire et al., 2011; Marques et al., 2013b).

1.2.3 Aspectos taxonômico e ecológico da família Botryosphaeriaceae

A família Botryosphaeriaceae, foi relatada pela primeira vez por Theissene Sydow (1918), colocada na subfamília Pseudosphaeriaceae, passando por inúmeras mudanças até os dias atuais. Taxonomicamente, pertence ao Domínio Eukarya; Reino Fungi; Filo Ascomycota; Classe Dothideomycetes e Ordem Botryosphaeriales (Schoch et al., 2006), composta por 23 gêneros e cerca de 110 espécies, sendo apoiado tanto pelas análises morfológicas e moleculares (Phillips et al., 2013).

Os fungos pertencentes a família Botryosphaeriaceae foram descritos inicialmente com base apenas em suas características morfológicas de estruturas assexuadas (Cardoso et al., 2019). Os gêneros que integram a família são *Lasiodiplodia*, *Barriopsis*, *Botryosphaeria*, *Botryobambusa*, *Cophinforma*, *Diplodia*, *Dothiorella*, *Neodeightonia*, *Macrophomina*, *Phaeobotryon*, *Sphaeropsis*, *Tiarosporella*, *Neoscytalidium*, *Neofusicoccum*, *Spencermartinsia* (Phillips et al., 2013). Nesse contexto, a família Botryosphaeriaceae foi dividida em dois grupos

compostos pelos gêneros *Diplodia*, que apresenta conídios pigmentados quando maduros, paredes espessas de formatos ovóides a elipsóides, e os gêneros *Fusicoccum*, que apresenta conídios hialinos, de paredes finas e de formato elíptico a fusiforme ou clavado (Denman et al., 2000).

Dentre os gêneros de Botryosphaeriaceae, mencionados anteriormente, alguns deles já foram relatados no Brasil, causando danos tanto em fruteiras tropicais, quanto em outras plantas cultivadas, entre eles podem ser citados: *Botryosphaeria*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium*, *Macrophomina*, e *Pseudofusicoccum*, *Cophinforma*, (Marques et al., 2013b; Machado et al., 2014b; Coutinho et al., 2017; Cardoso et al., 2019; Machado et al., 2019). Dentro do gênero *Lasiodiplodia* 14 espécies já foram relatadas no Brasil, em associação com a resinose e morte descendente de cajueiro, mangueira, videira e podridão peduncular, em frutos de mangueira, mamoeiro, graviola e coqueiro (Costa et al., 2010; Marques et al., 2013a; Netto et al., 2014; Correia et al., 2016; Coutinho et al., 2017). O gênero *Neoscytalidium*, relatado em associação com mangueira causando morte descendente (Marques et al., 2013b). Cardoso et al., (2019), relatou pela primeira vez *Cophinforma atrovirens*, causando morte descendente em plantas de cajueiro no Brasil.

Tradicionalmente, membros da família Botryosphaeriaceae eram identificados com base nos marcadores morfológicos de seus estádios sexuais (ascósporos) e assexuais (conídios), e posteriormente pela associação com seus hospedeiros e distribuição geográfica. Entretanto, com o avanço de estudos dentro da família, pesquisadores observaram que a sua fase sexuada, apresentava baixa capacidade de identificar as espécies e passaram a avaliar as diferenças apenas na fase assexuada, por ser facilmente encontrado na natureza (Denman et al., 2000; Crous et al., 2006; Phillips et al., 2013). Os principais caracteres morfológicos avaliados são os conídios e conidióforos (comprimento, largura, tamanho, forma, a presença de septação, a espessura da parede e coloração), presença ou não de paráfises, células conidiogênicas, e o formato dos picnídios. Já na fase sexuada são avaliados as dimensões e formato ascos e ascósporos e dos ascostromas, para a identificação das espécies (Crous et al., 2006; Schoch et al., 2006; Slippers; Wingfield, 2007; Phillips et al., 2013).

A família Botryosphaeriaceae, como relatado anteriormente engloba uma variedade de espécies de fungos ecologicamente variados, podendo ser endofíticos, patogênicos e saprófitos, geralmente associados às plantas lenhosas. Grupos da família são encontrados em quase todas as regiões geográficas e climas do mundo, infectando plantas de interesse agrônomo, florestal e ornamental (Crous et al., 2006; Phillips et al., 2013).

1.2.4 Família *Pseudofusicoccumaceae*

A Família *Pseudofusicoccumaceae*, antes relatada como gênero da família *Botryosphaeriaceae*, foi relatada pela primeira vez como uma nova família da ordem *Botryosphaeriales* por Yang et al., (2017) de acordo com estudos filogenéticos, no qual apresentaram alto valor de suporte. No qual o gênero *Pseudofusicoccum* é morfologicamente distinto de outros gêneros em *Botryosphaeriaceae*. Atualmente a família, apresenta conidiomata amplo, podendo estar imerso ou na superfície do tecido vegetal, podendo ser uni ou multilocular, sendo coberto de hifas; sua parede apresenta textura angular e de coloração marrom escuro; conidióforos reduzidos e suas células conidiogênicas são hialinas, lisas e cilíndricas. Conídios hialinos, finos de paredes ligeiramente espessas, asseptados, granulares, cilíndricas, raramente elipsoides e reto (Yang et al., 2017). Esses microrganismos em sua maioria sobrevivem de forma endofítica em seus hospedeiros, o que demonstra uma relação evolutiva com a planta hospedeira.

A família *Pseudofusicoccumaceae*, apresenta espécies de *Pseudofusicoccum* que se destacam em ocorrência e frequência associações com frutíferas de importância econômica (Marques et al., 2013a; Netto et al., 2014; Coutinho et al., 2017). Apresentando quadro sintomatológico em seus hospedeiros, que vão desde morte descendente de caules e ramos até a formação de cancrios e podridões de hastes, frutos e raízes, sendo recentemente considerados patógenos de importância secundária na agricultura (Cardoso et al. 2019).

1.2.5 Fungos endofíticos

Fungos endofíticos são microrganismos que vivem de forma assintomática dentro dos tecidos vegetais, como folhas, caules e raízes, sem causar danos aparentes às plantas hospedeiras. Eles podem estabelecer relações simbióticas, mutualísticas ou neutras com a planta. Esses fungos desempenham papéis importantes, como: proteção contra patógenos: produzem compostos bioativos que inibem o crescimento de organismos que poderiam atacar a planta; resistência ao estresse: ajudam a planta a lidar com condições adversas, como seca, salinidade e temperaturas extremas; e produção de metabólitos secundários: alguns fungos endofíticos sintetizam substâncias com potencial farmacológico ou pesticidas naturais. (Petrini, 1991; Azevedo; Araújo, 2007; Hyde; Soyong, 2008). Os fungos endofíticos também são, responsáveis por produzirem metabólitos secundários que ajudam a planta contra o ataque de fungos e pragas, além de apresentarem uma maior plasticidade na sobrevivência em diferentes

habitats. Ecologicamente, os fungos endofíticos desempenham papel fundamental na sustentabilidade dos ecossistemas e biodiversidade (Li et al., 2007; Arnold et al., 2000; ZOU et al., 2000; Gunatilaka, 2006).

Os fungos endofíticos são divididos em dois grupos, os endófitos clavicipitaceus (C-endófitos), que infectam algumas gramíneas; e os endófitos não-clavicipitaceus (NC-endófitos), que podem ser encontrados em tecidos assintomáticos de uma biodiversidade de plantas, sendo discriminados com base nas características filogenéticas (Clay; Schardl, 2002; Rodriguez et al., 2008). Os endofíticos C, representam um único grupo (classe I), de espécies filogenéticas relacionadas e limitada a algumas gramíneas, sendo sua transmissão via vertical. Os endófitos NC é um grupo de fungos altamente diversos e dividido em três grupos (classe II, classe III e classe IV), com base nos padrões de colonização do hospedeiro, mecanismo de transmissão entre gerações de hospedeiros, níveis de biodiversidade da planta e função ecológica (Saikkonen et al., 2002; Bischoff; White, 2005; Rodriguez et al., 2008)

A família Botryosphaeriaceae encontram-se agrupada, nos endofíticos da classe III. Onde este grupo, apresenta uma alta diversidade, estando associado exclusivamente a tecidos da parte aérea das plantas, entre eles podendo destacar os tecidos fotossintéticos como as folhas de árvores tropicais e tecidos não fotossintéticos como: flores e frutos e tecidos lenhosos. Sua transmissão é essencialmente via horizontal (Lodge et al., 1996; Fröhlich e Hyde, 1999; Arnold et al., 2000; Kumar e Hyde, 2004; Tejesvi et al., 2005).

Estudos afirmam, que a disseminação das Botryosphaeriaceae ocorre predominantemente via horizontal pelo meio da dispersão dos esporos no ar e penetração através de ferimentos provocados por pragas, meios abióticos ou aberturas naturais (Slippers; Wingfield, 2007). Entretanto, estas pesquisas não descartam a ocorrência de disseminação via vertical (via semente infectada), logo, a mesma ocorre de forma rara que a horizontal (Petrini, 1991; Marinho et al., 2005; Johri, 2006). Contudo, a aptidão demonstrada por esses microrganismos de conviver de forma endofítica nas plantas, representa uma ameaça para a agricultura, pois plantas assintomáticas infectadas servem de fonte de inóculo para outras plantas (Silveira, 2017). É fundamental ampliar o entendimento sobre o papel ecológico e evolutivo das Botryosphaeriaceae, suas interações com as plantas hospedeiras, estratégias de reprodução, mecanismos de dispersão e os principais modos de infecção (Saikkonen et al., 1998; Slipper, Wingfield, 2007; Gonçalves et al., 2016).

Os fungos da família Botryosphaeriaceae se distingue de outros endófitos pelo elevado potencial de agressividade de algumas espécies, que se manifesta principalmente quando o hospedeiro está sob estresse. Sua patogenicidade é desencadeada por desequilíbrios

metabólicos no hospedeiro, provocados por fatores estressantes como condições climáticas adversas, características do solo ou interações biológicas. (Desprez-loustau et al., 2006; Cardoso et al., 2009; Phillips et al., 2013; Alves et al., 2015). Para avaliar as características endofítica ou patogênica de Botryosphaeriaceae, é realizado o teste de patogenicidade, que pode ser feito por suspensão de esporos (Cardoso et al., 2019) ou disco de micélio (Coutinho et al., 2017). Sendo o disco de micélio o mais utilizado, devido a sua praticidade em relação a outros métodos, entretanto apresenta algumas desvantagens, devido a não quantificação de esporos. Contudo, este método vem sendo criticado por alguns pesquisadores, por ser um procedimento altamente agressivo para a planta sem chance de defesa.

Estudos evidenciam que as mudanças climáticas são determinantes, para o desenvolvimento de doenças ocasionadas por fungos desta família, pois provocam mudanças em seu comportamento (Slipper, Wingfield, 2007). Vale ressaltar, que esta família apresenta uma alta diversidade, tornando difícil o seu controle em razão de seus diferentes hábitos ecológicos, pela capacidade de infectar uma ampla gama de hospedeiros e por sua aptidão endofítica. No entanto, há poucos trabalhos de epidemiologia e caracterização molecular da família Botryosphaeriaceae no Brasil (Perreira *et al.*, 2006; Slippers; Wingfield, 2007; Lima et al., 2013; Coutinho et al., 2017).

Há uma necessidade urgente de desenvolver ferramentas que detectem com rapidez e precisão a presença desses fungos e os mecanismos que governam sua infecção, dispersão e patogenicidade, bem como, a manipulação genética de plantas para resistir a esses fungos intrigantes e relativamente pouco compreendidos (Slipper, Wingfield, 2007).

Técnicas moleculares têm avançado cada vez mais, sendo atualmente utilizada na detecção do patógeno diretamente de amostra do tecido vegetal, face a uma maior rapidez, baixo custo, alta especificidade e sensibilidade quando comparado com métodos tradicionais (Cao et al., 2007).

1.2.4 Ferramentas moleculares para identificação de Botryosphaeriaceae

Para os estudos de populações de fungos endofíticos e patogênicos, tem-se feito o uso de técnicas moleculares, que são capazes de detectar a variabilidade genética a nível de sequência de DNA, apresentando assim, relevantes contribuições para o entendimento etiológico, epidemiológico, a co-evolução hospedeiro/patógeno, bem como manejo de resistência e métodos de controle de doenças (Ferreira; Grattapaglia, 1998).

Atualmente, entre as técnicas moleculares mais utilizadas está, a reação em cadeia da polimerase (PCR), é uma ferramenta poderosa, que envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA (Ferreira; Grattapaglia, 1998). Assim, após o desenvolvimento da PCR, outras técnicas foram desenvolvidas, com o objetivo de identificar e caracterizar os microrganismos de forma apropriada. Dentre elas, podem ser citados Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Simple Sequence Repeats (SSR), tendo destaque, o uso de primers específicos utilizados pela técnica de sequenciamento gênico (Zabeau; Vos, 1993; Williams *et al.*, 1990).

Entre os marcadores moleculares disponíveis, destacar-se, as SSR (microssatélites) que são sequências curtas, envolvendo 1 a 6 pares de bases, repetidas na sequência do DNA (Akkaya *et al.*, 1992; Milach, 1998). As SSRs são polimórficas, consequentemente aumentam a possibilidade de detecção de diferenças alélicas entre espécies próximas, dentro de uma espécie, ou até mesmo entre indivíduos numa população (Yu *et al.*, 1999).

Para o sequenciamento gênico de Botryosphaeriaceae são empregados marcadores moleculares capazes de mapear regiões específicas do DNA que apresente elevado valor filogenético. Os genes mais utilizados e comprovadamente eficazes para a Botryosphaeriaceae são: DNA ribossômico (rDNA), por ser uma região universal englobando os genes 18S, 5.8S, 28S e as regiões dos espaçadores internos transcritos (ITS); a segunda maior subunidade da RNA polimerase II (RPB2); e regiões codificadoras de proteínas, como o fator de alongação 1 alfa (TEF1- α) e a região da β -tubulina (β t) (Phillips *et al.*, 2013).

Nos últimos anos, vários dados com base em sequência de DNA, têm sido utilizados para distinguir táxons de Botryosphaeriaceae, mostrando-se, bastante eficiente no reconhecimento de espécies filogenéticas dentro da família resultando em descrição de novas espécies, sendo este, um dado importante para o estudo de cultivares resistentes (De wet *et al.*, 2003; Crous, 2005; Slippers; Wingfield, 2007).

Portanto, a busca pela identificação correta dos microrganismos, com base em inferências filogenéticas, visa não apenas a caracterização deles, mas também a obtenção de informações sobre a epidemiologia das doenças que provocam e o manejo adequado dessas enfermidades nas plantas. Nesse contexto, torna-se indispensável a realização de pesquisas que explorem a diversidade de espécies da família Botryosphaeriaceae, seu comportamento endofítico em plantas, suas relações com os hospedeiros e as possíveis causas das epidemias verificadas no cajueiro. Além disso, essas pesquisas são essenciais para esclarecer dúvidas sobre a correta identificação das espécies que ocorrem nessa região.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, M. J. N. et al. **Zoneamento pedoclimático para a cultura do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) no Nordeste do Brasil e Norte de Minas Gerais**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2000. Boletim de Pesquisa N° 27.
- AKKAYA, M. S. et al. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, v. 132, n. 4, p. 1131-1139, 1992.
- ALVES, E. S. et al. **Efeito das condições edafoclimáticas na ocorrência da resinose do cajueiro**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2015. 28 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Boletim de pesquisa e desenvolvimento 100). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/131487/1/BPD15005.pdf>. Acesso: 22/03/2019.
- ARNOLD, A. ELIZABETH et al. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse?. **Ecology letters**, v. 3, n. 4, p. 267-274, 2000.
- AZEVEDO, J. L.; ARAUJO, W. L. Endophytic fungi of tropical plants: diversity and biotechnological aspects. **Fungi: multifaceted microbes**. Anamaya Publishers, New Delhi, India, p. 189-207, 2007.
- BARROS, L.M.; CRISÓSTOMO, J.R. Melhoramento genético do cajueiro. In: ARAÚJO, J.P.P.; SILVA, V.V. (Org.). **Cajucultura: modernas técnicas de produção**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 1995.
- BISCHOFF, J. F.; WHITE, J. F. Evolutionary development of the Clavicipitaceae. **Mycology Series**, v. 23, p. 505, 2005.
- BRAINER, M. S. C. P. **Cajucultura nordestina em recuperação**. Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste – ETENE. Ano 3, N° 54, novembro, 2018. Disponível em: <https://www.bnb.gov.br/documents/80223/4141162/54caju.pdf/95e65093-50e1b48d-ab01-15f3a8f690b4>. Acesso em: 30/05/2019.
- CAO, T. et al. Molecular detection of *Plasmodiophora brassicae*, causal agent of clubroot of crucifers, in plant and soil. **Plant disease**, v. 91, n. 1, p. 80-87, 2007.
- CARDOSO, J. E. et al. First Report of *Cophinforma atrovirens* causing stem rot and dieback of cashew plants in Brazil. **Plant Disease**, v. 103, n. 7, p. 1772-1772, 2019.

CARDOSO, J. E. et al. **Monitoramento de doenças na cultura do cajueiro**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2002.

CARDOSO, J. E. et al. **Doenças causadas por fungos da família Botryosphaeriaceae em cajueiro**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2018.

CARDOSO, J. E. et al. **Monitoramento de doenças na cultura do caju**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006.

CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P. Impacto potencial das mudanças climáticas sobre as doenças do cajueiro no Brasil. *In*: GHINI, R.; HAMADA, E.; BETTIOL, W. (Eds.). **Impactos das mudanças climáticas sobre doenças de importantes culturas no Brasil**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2011.

CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P.; FREIRE, F. C. O. **Doenças do cajueiro**. *In*: ARAÚJO, J. P. P. Agronegócio caju: práticas e inovações. Brasília: Embrapa, 2013.

CARDOSO, J. E. et al. First report of *Erysiphe quercicola* causing powdery mildew on cashew in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 7, p. 1327, 2017.

CARDOSO, J. E. et al. **Ocorrência da podridão-preta dos ramos do cajueiro no Ceará e Piauí**. Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, 2000. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT-2010/11959/1/Ct-052.pdf>. Acesso em: 12/05/ 2019.

CAVALCANTI, J. J. V. et al. **Resistência genética de clone de cajueiro anão precoce às principais fitomoléstias**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2000.

CLAY, Keith; SCHARDL, Christopher. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. **the american naturalist**, v. 160, n. S4, p. S99-S127, 2002.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Análise mensal castanha de caju, agosto 2017.

CORREIA, KAMILA C. et al. Phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of table grape in the main Brazilian exporting region. **Plant Pathology**, v. 65, n. 1, p. 92-103, 2016.

DE OLIVEIRA COSTA, VALÉRIA SANDRA et al. Species of Botryosphaeriaceae associated on mango in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 127, n. 4, p. 509-519, 2010.

COUTINHO, I. B. L. et al. Diversity of genus Lasiodiplodia associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. **Plant Pathology**, v. 66, n. 1, p. 90-104, 2017.

CRISÓSTOMO, L. A. et al. **Cultivo do cajueiro anão-precoces: aspectos fitotécnicos com ênfase na adubação e na irrigação**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. Circular Técnica, 2001.

CROUS, PEDRO W. et al. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Studies in mycology**, v. 55, n. 1, p. 235-253, 2006.

DENMAN, SANDRA et al. 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.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Production**. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>. Acesso em 28/05/2019.

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

FONSECA, W. L. et al. Morphological, molecular phylogenetic and pathogenic analyses of Erysiphe spp. causing powdery mildew on cashew plants in Brazil. **Plant Pathology**, v. 68, n. 6, p. 1157-1164, 2019.

FREIRE, F. C. O. et al. Diseases of cashew nut plants (*Anacardium occidentale* L.) in Brazil. **Crop Protection**, v. 21, n. 6, p. 489-494, 2002.

FREIRE, F.C.O. **A resinose do cajueiro**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, Caju Informativo, v.4, n.1, 1991.

FREIRE, F. C. O. et al. Status of Lasiodiplodia theobromae as a plant pathogen in Brazil. **Essentia**, v. 12, n. 2, p. 53-71, 2011.

FRÖHLICH, JANE; HYDE, KEVIN D. Biodiversity of palm fungi in the tropics are global fungal diversity estimates realistic. **Biodiversity & Conservation**, v. 8, n. 7, p. 977-1004, 1999.

FROTA, P. C. E. Clima e fenologia. In: LIMA, V. P. M. S. (Ed.). **A cultura do cajueiro no nordeste do Brasil**. Fortaleza: BNB/ETENE, 1988.

GONÇALVES, Francisco José Teixeira et al. Patogenicidade de espécies de Botryosphaeriaceae endofíticas de plantas da Caatinga do estado do Ceará em manga e umbu-cajá. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 1, p. 43-52, 2016.

GUNATILAKA, AA Leslie. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of natural products**, v. 69, n. 3, p. 509-526, 2006.

HYDE, K. D.; SOYTONG, Kasem. The fungal endophyte dilemma. **Fungal divers**, v. 33, n. 163, p. e173, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal: Culturas temporárias e permanentes – PAM**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticasnovoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html?&t=resultados>. Acesso: 10/04/2019.

KUMAR, D. Siva Sundara; HYDE, Kevin D. Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. **Fungal diversity**, 2004.

LI, WEN-CHAO et al. Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China. **Fungal Divers**, v. 25, p. 69-80, 2007.

LIMA, J. S. et al. Cultural, morphological and pathogenic characterization of *Lasiodiplodia theobromae* associated with tropical fruit plants. **Summa phytopathologica**, v. 39, p. 81-88, 2013.

LODGE, D.; FISHER, P. J.; SUTTON, B. C. Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. **Mycologia**, v. 88, n. 5, p. 733-738, 1996.

MACHADO, A. R. et al. Botryosphaeriaceae species causing dieback on Annonaceae in Brazil. **Plant Pathology**, v. 68, n. 7, p. 1394-1406, 2019.

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, n. 1, p. 231-247, 2014.

MACHADO, A. R. et al. New occurrences of Botryosphaeriaceae causing black root rot of cassava in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, p. 464-470, 2014.

MARINHO, A. M. et al. Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 280-283, 2005.

MARQUES, M. W. et al. Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, v. 61, n. 1, p. 181-193, 2013.

MARQUES, M. W. et al. *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* and *Pseudofusicoccum* species associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, v. 61, n. 1, p. 195-208, 2013.

MARTINS, M. V. V. et al. Progresso do oídio em função da fenologia do cajueiro. **Summa Phytopathologica**, v. 44, n. 2, p. 178-184, 2018.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa 10/2003**. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoportalMapa&chave=1412030772>. Acesso:12/07/2019.

MILACH, S. C. K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. **Marcadores moleculares em plantas**. UFRGS, Porto Alegre, Brasil, p. 17-28, 1998.

MOREIRA, R. C. et al. **Clones de Cajueiro-Comum à Resinose**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2012.

NETTO, M. S. B et al. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. **Fungal Diversity**, v. 67, n. 1, p. 127-141, 2014.

OLIVEIRA, V. H. et al. **Cultivo do cajueiro anão precoce**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2002.

PAIVA, F. F. A.; GARRUTTI, D. S.; NETO, R. M. S. **Aproveitamento industrial do caju**. Fortaleza; Agroindústria Tropical-Documentos. 2000.

PEREIRA, A. L.; SILVA, G. S.; RIBEIRO, V. Q. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasioidiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 572-578, 2006.

PETRINI, Orlando. Fungal endophytes of tree leaves. In: **Microbial ecology of leaves**. New York, NY: Springer New York, 1991. p. 179-197.

PHILLIPS, A. J. L. et al. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. **Studies in mycology**, v. 76, n. 1, p. 51-167, 2013.

PLOETZ, R. C. et al. Influence of temperature, light intensity, and isolate on the development of *Neofusicoccum parvum*-induced dieback of *Eugenia*, *Syzygium paniculatum*. **Plant disease**, v. 93, n. 8, p. 804-808, 2009.

RAMOS, L. J. et al. Tip dieback of mango (*Mangifera indica*) caused by *Botryosphaeria ribis*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 75, n. 3, 1991.

RODRIGUEZ, R. J. et al. Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. **The ISME journal**, v. 2, n. 4, p. 404-416, 2008.

SACRAMENTO, C.K. et al. (Eds). **Fruticultura tropical: espécies regionais e exóticas**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2009.

SAIKKONEN, Kari et al. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. **Annual review of Ecology and Systematics**, v. 29, n. 1, p. 319-343, 1998.

SAIKKONEN, K.; ION, D.; GYLLENBERG, M. The persistence of vertically transmitted fungi in grass metapopulations. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 269, n. 1498, p. 1397-1403, 2002.

SCHOCH, C.d L. et al. A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. **Mycologia**, v. 98, n. 6, p. 1041-1052, 2006.

SERRANO, L. A. L. 2019. **O cajueiro e suas características**. Disponível em: <http://www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias/Materia.asp?id=28425&secao=Artigos%20Especiais>. Acesso em 15/03/2019.

SERRANO, L. A. L. (Ed.). **Sistema de Produção do caju**. Embrapa Informação Tecnológica, 2017.

SILVEIRA, G. F. **Espécies de Botryosphaeriaceae associadas à morte descendente em jambeiro**. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí- PI. 2017.

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.

TEJESVI, Mysore V. et al. Endophytic fungal assemblages from inner bark and twig of *Terminalia arjuna* W. & A. (Combretaceae). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 8, p. 1535-1540, 2005.

VIANA, F. M. P. et al. Doenças do cajueiro. Informe Agropecuário, v. 37, n. 290, 2016.

VON ARX J. A. **Plant fungos patogênicos** Behefte zur Nova Hedwigia. p. 288. 1987.

WILLIAMS J. K. F. et al. Amplificados por primers arbitrários são úteis como marcadores genéticos. **Nucl Acids Res**, 1990.

YANG, Tao et al. Families, genera, and species of Botryosphaeriales. **Fungal biology**, v. 121, n. 4, p. 322-346, 2017.

YU, K. et al. Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus* and *Vigna*). **Genome**, v. 42, n. 1, p. 27-34, 1999.

ZOU, W. X. et al. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. **Journal of natural products**, v. 63, n. 11, p. 1529-1530, 2000.

CAPÍTULO II: Caracterização morfológica e molecular de fungos endofítico da família Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae associado a tecidos assintomático de cajueiro

Autores

Regimara Francisca Bernardo da Silva Vieira ^a, Wéverson Lima Fonseca ^a, Suane de Oliveira Souza Brasil ^a, Cristiano Souza Lima ^a e José Emilson Cardoso ^b

^a Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal do Ceará, 60440-554 Fortaleza, Ceará, Brasil; ^b Embrapa Agroindústria Tropical, 60511-110 Fortaleza, Ceará, Brasil.

*Autor para correspondência: José Emilson Cardoso; Endereço de E-mail: jose-emilson.cardoso@embrapa.br; Regimara F. B. S. Vieira; Endereço de E-mail: bernardoregimara@gmail.com; TELEFONE: +55 88 99704-8222.

RESUMO

As famílias Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae estão amplamente associadas ao seu hospedeiro e apresentam um papel ecológico bastante diversificado, ora comportando-se como saprófitos, parasitas ou endofíticos, podendo ser encontrado diversos hospedeiro e ecossistema. A ecologia das famílias Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae é comparada a padrões gerais observados para endófitos, o qual inclui altos níveis de diversidade, transmissão horizontal, vertical e níveis de afinidade com o hospedeiro podendo ser de específico a amplo, tornando-se uma ameaça significativa aos ecossistemas agrícolas. Este estudo teve como objetivo elucidar o comportamento endofítico de fungos das famílias Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae na cultura do cajueiro, de acordo com as características morfológicas e relações filogenéticas e sua semelhança, com fungos já relatado como patógeno da cultura do cajueiro. Foram coletados tecidos assintomáticos de cajueiro dos clones CCP76 (altamente susceptível), BRS265 (susceptível) e BRS226 (resistente), aonde foram plaqueados e observados a presença de Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae. Com base nas análises morfológicas e filogenética foi observado que os gêneros *Lasiodiplodia* e *Pseudofusicoccum* estão intimamente associados com fungos endofíticos do cajueiro. A patogenicidade apresentada por esses fungos foi baixa, mostrando assim uma relação uma afinidade do fungo com o hospedeiro. Este é o primeiro estudo de fungos endofíticos de Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae associados a cultura do cajueiro.

Palavras chaves: Estudos filogenéticos; Hospedeiro; Morfologia.

ABSTRACT

The families Botryosphaeriaceae and Pseudofusicoccumaceae are widely associated with their host and have a very diversified ecological role, sometimes behaving as saprophytes, parasites or endophytes, and can be found in several hosts and ecosystems. The ecology of the Botryosphaeriaceae family is compared to general patterns observed for endophytes, which include high levels of diversity, horizontal, vertical transmission and can be specific to wide host levels, becoming a significant threat to agricultural ecosystems. This study aimed to elucidate the endophytic fungi behavior of Botryosphaeriaceae and Pseudofusicoccumaceae families in the cashew culture, according to the morphological characteristics and phylogenetic relationships and their similarity, with fungi already reported as a pathogen in the cashew culture. Asymptomatic cashew tissues were collected from clones CCP76 (highly susceptible), BRS265 (susceptible) and BRS226 (resistant), where the presence of Botryosphaeriaceae and Pseudofusicoccumaceae was plated and observed. Based on the morphological and phylogenetic analyzes it was observed that the *Lasiodiplodia* and *Pseudofusicoccum* genus are closely associated with cashew endophytic fungi. The pathogenicity presented by these fungi was low, thus showing an affinity relationship between the fungus and the host. This is the first study of Botryosphaeriaceae and Pseudofusicoccumaceae endophytic fungi associated with cashew culture.

Keywords: Phylogenetic studies; Host; Morphology.

2.1 INTRODUÇÃO

A cultura do cajueiro está concentrada, principalmente, na região semiárida do Nordeste brasileiro, com maior distribuição nos estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte. O Ceará destaca-se como o principal estado produtor, concentrando 61,6% da área plantada nacional e 61,9% da área cultivada na região Nordeste (IBGE, 2018; CONAB, 2017). Os principais produtos explorados dessa cultura são o pedúnculo (pseudofruto) e a castanha (fruto), sendo a castanha especialmente valorizada devido ao seu alto valor agregado (BRAINER, 2018).

Dentre as principais doenças que afetam o cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), destacam-se a resinose, a podridão preta da haste (PPH) e a morte descendente (MD), que são responsáveis por severos danos à cultura. Essas doenças têm como agentes causais fungos da família Botryosphaeriaceae, que estão intimamente associados ao hospedeiro. Além disso, mudanças climáticas em curtos intervalos de tempo, aliadas à pressão ambiental e biológica, são fatores que podem favorecer o desenvolvimento de doenças causadas por fungos dessa família (Alves et al., 2015; Cardoso et al., 2009b; Desprez-loustau et al., 2007; Sturrock et al., 2011).

A família Botryosphaeriaceae é relatada como agente etiológico causador das principais doenças que atacam plantas lenhosas, afetando caules, galhos, folhas, frutos e sementes, podendo inviabilizar todo o pomar devido à sua característica silenciosa. Os fungos dessa família desempenham um papel ecológico bastante diversificado, comportando-se ora como saprófitos, ora como parasitas ou endofíticos, podendo ser encontrados em diversos hospedeiros e ecossistemas (Slippers et al., 2007; Cardoso et al., 2018). Em muitos aspectos, a ecologia da família Botryosphaeriaceae é comparada aos padrões gerais observados para endófitos, incluindo altos níveis de diversidade, transmissão horizontal, uma estrutura espacial definida e diferentes níveis de afinidade com o hospedeiro, que podem variar de específicos a amplos. Quando negligenciada, essa família pode se tornar uma ameaça significativa aos ecossistemas agrícolas, plantações e florestas nativas (Slippers et al., 2007).

Embora haja mais relatos de espécies deste grupo causando doenças em seus hospedeiros, alguns estudos estão sendo realizados para descrever a ampla distribuição taxonômica e a alta frequência de espécies endofíticas de Botryosphaeriaceae em diferentes hospedeiros, como *Diplodia pinea*, isolado de galhos de *Pinus* (Petrini; Fisher, 1988), e *Lasiodiplodia theobromae*, isolado de tecidos saudáveis de manga (Johnson et al., 1992).

A aptidão demonstrada por esse grupo de fungos em conviver de forma endofítica em culturas exploradas comercialmente representa um grande risco para a agricultura, devido à dificuldade de manejo. Sendo assim, é necessário conhecer melhor o papel ecológico desse grupo e sua interação com os hospedeiros. Nesse contexto, os objetivos deste estudo foram: (i) investigar a presença de espécies de Botryosphaeriaceae em tecidos assintomáticos de cajueiro, (ii) identificar os fungos da família presentes nos brotos e sua distribuição, e (iii) caracterizar a patogenicidade dos isolados.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Coleta das amostras e isolamento dos fungos

As amostras foram coletadas na Fazenda Planalto, localizada no município de Pio IX – PI, onde foram recolhidos tecidos assintomáticos (brotações novas) de pomares de cajueiro (*Anacardium occidentale*) dos clones CCP 76, BRS 265 e BRS 226. Também foram coletados galhos e caules lenhosos dos clones CCP 76 e BRS 265, que apresentavam sintomas de resinose. Posteriormente, as amostras foram levadas para o Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, no Ceará, onde foram lavadas com água corrente e detergente para uma desinfestação inicial. Em seguida, os materiais assintomáticos foram divididos em partes: meristema apical, intermediário e ponto de enxertia (Figura 1). As amostras foram cortadas em pequenos fragmentos de 5 mm e esterilizadas de acordo com a metodologia de Araújo et al. (2002) para fungos endofíticos. Os materiais foram imersos em etanol 70% por 1 minuto, seguido de 1 minuto em hipoclorito de sódio a 3%, sendo novamente submetidos ao etanol por 1 minuto, com dois enxágues em água destilada estéril (ADE), e depois foram colocados para secar em papel filtro esterilizado. Os tecidos doentes, foram submersos em etanol 70% por 30 segundos, seguido de 1 minuto em NaCl a 1,5%, e depois dois enxágues em água destilada estéril. Posteriormente, os materiais foram transferidos para placas de Petri contendo Batata Cenoura Água (BCA), suplementadas com 200 µL de cloranfenicol.

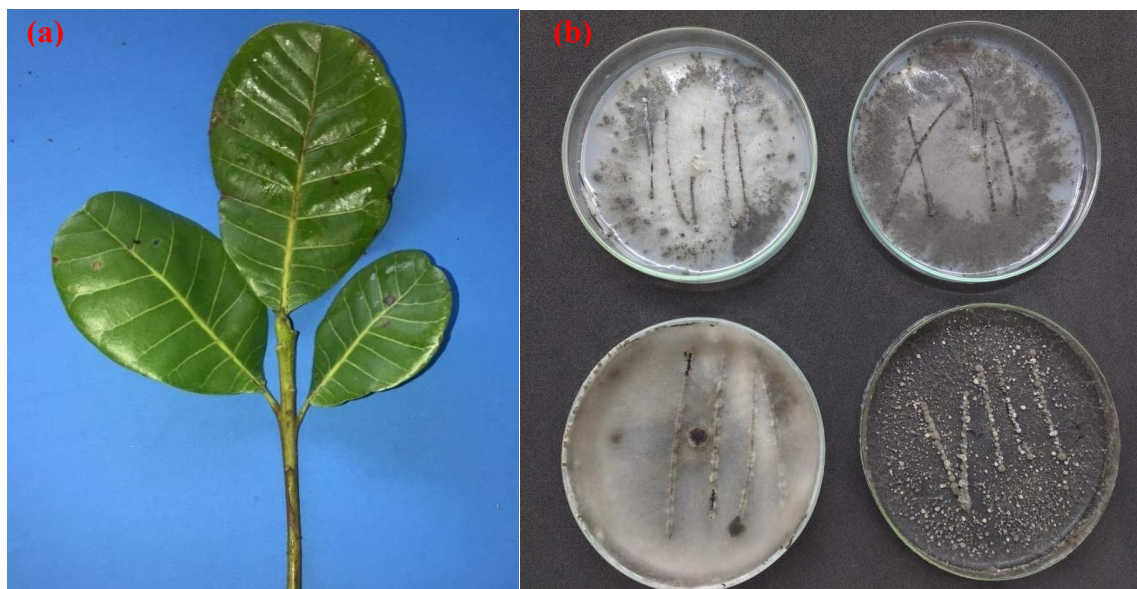


Figura 1 – Material vegetal sadio obtido de cajueiro. (a) Localização dos tecidos dos brotos de cajueiro utilizados no estudo (M.A = meristema apical; P.I. = ponto intermediário e P.E. = ponto de enxertia), (b) Variação na coloração e crescimento de colônia de fungos da família Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae. Fonte: elaborada pela autora.

Em seguida, as placas foram incubadas em temperatura controlada (25°-30°C), com fotoperíodo de 12 horas. As placas foram examinadas três dias após o isolamento, momento em que os fungos que apresentaram crescimento rápido e coloração mais escura foram transferidos para outra placa de Petri contendo BCA + acícula, com o intuito de induzir a esporulação. Posteriormente, as placas foram novamente incubadas em temperatura controlada (25 - 30°C) e expostas à luz negra por um período de 4 a 5 semanas, até a produção de picnídios. Após esse período, foi realizada a identificação dos fungos, com base na morfologia e nas características típicas da família Botryosphaeriaceae (micélio de crescimento rápido, coloração variando de cinza a verde, verde escuro, marrom e preto, presença de picnídios e formato dos esporos). Em seguida, obteve-se uma cultura pura de cada isolado para estudos de sequenciamento de DNA.

2.2.2 Extração, amplificação por PCR e sequenciamento de DNA

As extrações e amplificações de DNA dos isolados foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Agroindústria Tropical. O DNA genômico foi extraído de 20 isolados de fungos, obtidos de tecidos assintomáticos de cajueiro. Os isolados foram cultivados em meio Batata Dextrose (BD) por um período de sete dias, sob fotoperíodo de 12

horas, em condições estáticas. Após esse período, a massa micelial foi filtrada e submetida a duas lavagens com água estéril, com o objetivo de eliminar o meio de cultura. Em seguida, a manta de micélio foi colocada em uma placa de Petri contendo papel filtro autoclavado, para realizar uma breve secagem. O protocolo utilizado para a extração do DNA genômico foi o de CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônia), conforme descrito por Cavalcanti & Wilkinson (2007), com modificações. Posteriormente, as amostras de DNA extraído foram quantificadas utilizando um espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific). Em seguida as amostras foram diluídas para 10 ng/μL e armazenadas a -20 °C.

A solução para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) continha um volume final de 50 μL, composto por 6,25 μL de DNA genômico (10 ng/μL), 10 μL de buffer 5x, 3,0 μL de MgCl₂ (25 mM), 1 μL de dNTP (10 mM), 5 μL de cada iniciador (10 mM), 0,5 μL de GoTaq polimerase (5 U/μL) e 19,25 μL de água deionizada estéril.

Os iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE *et al.*, 1990) foram utilizados para amplificar as regiões ITS 1 e 2. Para a amplificação da região EF1- α , foram empregados os iniciadores TEF1-688F (5'-CGGTCACCTTGATCTACAAGTGC-3') e TEF1-1251R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (ALVES *et al.*, 2008). Além disso, os iniciadores β t2a e β t2b foram utilizados para sequenciar o fragmento β -tub (Glass & Donaldson, 1995). O ciclo da PCR consistiu em uma desnaturação inicial a 96 °C por 1 minuto, seguida de 35 ciclos, cada um composto por uma desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 58 °C por 1 minuto (para ITS e EF1- α) ou a 68 °C por 1 minuto (para β -tub), e uma extensão final a 72°C por 10 minutos (Coutinho *et al.*, 2017).

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, com tampão Tris-Borato-EDTA 1X, corados com brometo de etídio (0,5 mg/mL) e visualizados sob transluminador UV. Após a verificação das bandas amplificadas, alíquotas de 40 μL de cada produto de PCR foram enviadas para a empresa Macrogen Inc., na Coreia do Sul (<http://www.macrogen.com>), para serem purificadas e sequenciadas nas direções sentido e antissenso. Os 20 isolados foram sequenciados nas regiões ITS e EF1- α , e a região β -tub foi sequenciada para resolver as espécies do gênero *Lasiodiplodia*.

2.2.3 Análises filogenéticas

As sequências de ITS, TEF1- α e β -tub foram editadas utilizando o programa BioEdit versão 7.0.5 (HALL, 2012) e alinhadas manualmente com o ClustalW. As sequências de ITS, TEF1- α e β -tub apresentaram tamanhos aproximados de 580, 300 e 420 pb, respectivamente.

O alinhamento concatenado foi obtido a partir das sequências de ITS, TEF1- α e β -tub dos isolados deste estudo, juntamente com sequências de isolados de espécies tipo dos gêneros Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae previamente publicadas e depositadas no GenBank (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), totalizando 65 táxons e 1095 caracteres (Tabela 1). As sequências de ITS, TEF1- α e β -tub foram combinadas, incluindo 65 táxons e totalizando 1095 caracteres. As relações filogenéticas foram inferidas por meio da análise de máxima parcimônia (MP), utilizando uma busca heurística com a opção treebisection-reconnection (TBR) no programa MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016). O suporte estatístico da árvore foi testado por meio da análise de bootstrap com 1.000 repetições. *Spencermartinsia viticola* foi usado como grupo externo (outgroup). Os escores da árvore, incluindo o comprimento da árvore, o índice de consistência (CI), o índice de retenção (IR) e o índice de consistência reescalada (RC), também foram calculados.

Tabela 1 - Isolados utilizados para a construção filogenética, com seus respectivos hospedeiros, localizações geográficas de isolamento, coletores das amostras e código de acesso as sequências ITS e TEF1- α no banco de dados do Genbank. Fortaleza, Ceará, 2020.

Espécies	Isolados	Hospedeiro	Origem	Número de acesso ao GenBank			Referência
				ITS	EF1- α	β -tub	
<i>Lasiodiplodia brasiliense</i> ^T	CMM 4015	<i>Mangifera indica</i>	Brazil	JX464063	JX464049	-	1
<i>L. brasiliense</i>	IBL348	<i>Mangifera indica</i>	Brazil	KT151807	KT151801	KT151804	2
<i>L. brasiliense</i>	BOT.EN 05	<i>A. occidentale</i>	Brazil	-	-	-	-
<i>L. caatinguensis</i> ^T	CMM 1325	<i>Citrus sinensis</i>	Brazil	KT154760	KT008006	KT154767	2
<i>L. caatinguensis</i>	IBL271	<i>A. occidentale</i>	Brazil	KT154756	KT154750	KT154763	2
<i>L. crassispota</i> ^T	CBS 118741	-	Australia	DQ103550	EU673303	KU887506	3
<i>L. crassispota</i>	CBS110492	<i>Unknown</i>	Unknown	EF622086	EF622066	EU673134	4
<i>L. crassispota</i>	BOT. EN10	<i>A. occidentale</i>	Brazil	-	-	-	-
<i>L. euphorbicola</i> ^T	CMM 3609	<i>Jatropha curcas</i>	Brazil	KF234543	KF226689	KF254926	5
<i>L. euphorbicola</i>	IBL327	<i>Annona squamosa</i>	Brazil	KT247491	KT247493	KT247495	2
<i>L. euphorbicola</i>	BOT.EN 15	<i>A. occidentale</i>	Brazil	-	-	-	-
<i>L. endophytica</i> ^T	MFLUCC 18-1121	<i>Magnolia Liliflora</i>	Tailândia	MK501838	MK584572	MK550606	6
<i>L. hormozganensis</i> ^T	CBS 124709	<i>Olea sp.</i>	Iran	GU945355	GU945343	KU887515	7
<i>L. hormozganensis</i>	CBS 124708	<i>Mangifera indica</i>	Iran	GU945356	GU945344	-	7
<i>L. hormozganensis</i>	BOT.EN 03	<i>A. occidentale</i>	Brazil	-	-	-	-
<i>L. hormozganensis</i>	BOT.EN 08	<i>A. occidentale</i>	Brazil	-	-	-	-
<i>L. iraniensis</i> ^T	CBS 124710	<i>Mangifera indica</i>	Iran	GU945346	GU945334	KU887516	7
<i>L. iraniensis</i>	IRAN1519C	<i>Mangifera indica</i>	Iran	GU945350	GU945338	-	7
<i>L. iraniensis</i>	BOT. EM 02	<i>A. occidentale</i>	Brazil	-	-	-	-
<i>L. iraniensis</i>	BOT.EN 13	<i>A. occidentale</i>	Brazil	-	-	-	-
<i>L. iraniensis</i>	BOT.EN 30	<i>A. occidentale</i>	Brazil	-	-	-	-
<i>L. mahajangana</i> ^T	CBS 124927	<i>Terminalia catappa</i>	Madagascar	FJ900595	FJ900641	FJ900630	8
<i>L. mahajangana</i>	CMW27820	<i>Terminalia catappa</i>	Madagascar	FJ900597	FJ900643	FJ900632	8
<i>L. margaritacea</i> ^T	CBS122519	<i>Adansonia gibbosa</i>	Australia	EU144050	EU144065	KU887520	9
<i>L. parva</i> ^T	CBS456.78	<i>Cassava-field soil</i>	Colômbia	EF622083	EF622063	KU887523	4
<i>L. parva</i>	CBS495.78	<i>Cassava-field soil</i>	Colômbia	EF622085	EF622065	-	4
<i>L. pyriformis</i> ^T	CBS 121770	<i>A. mellifera</i>	Namibia	EU101307	EU101352	KU887527	10

Espécies	Isolados	Hospedeiro	Origem	Número de acesso ao GenBank			Referência
				ITS	EF1- α	β -tub	
<i>L. pyriformis</i>	CBS121771	<i>A. mellifera</i>	Namibia	EU101308	EU101353	-	10
<i>L. pseudotheobromae</i> ^T	CBS 116459	<i>Gmelina arborea</i>	Costa Rica	EF622077	EF622057	EU673111	4
<i>L. pseudotheobromae</i>	IBL266	<i>A. occidentale</i>	Brazil	KT247480	KT247484	KT247486	2
<i>L. pseudotheobromae</i>	BOT. EN 35	<i>A. occidentale</i>	Brazil	-	-	-	-
<i>L. rubropurpurea</i> ^T	CBS 118740	<i>Eucalyptus grandis</i>	Australia	DQ103553	EU673304	EU673136	3
<i>L. rubropurpurea</i>	WAC12536	<i>Eucalyptus grandis</i>	Australia	DQ103554	DQ103572	-	3
<i>L. thailandica</i> ^T	CBS 138760	<i>Albizia chinensis</i>	China	KY767663	KY751304	KY751301	11
<i>L. thailandica</i>	CPC 22795	<i>Mangifera indica</i>	Thailand	KJ193637	KJ193681	-	12
<i>L. theobromae</i> ^T	CBS 164.96	-	New Guinea	AY640255	AY640258	KU887532	13
<i>L. theobromae</i>	IBL404	<i>A. occidentale</i>	Brazil	KT247468	KT247470	KT247476	2
<i>L. theobromae</i>	BOT. EN 01	<i>A. occidentale</i>	Brazil	-	-	-	-
<i>L. theobromae</i>	BOT. EN 32	<i>A. occidentale</i>	Brazil	-	-	-	-
<i>L. venezueiensis</i> ^T	CBS 118739	-	-	DQ103547	EU673305	KU887533	3
<i>L. venezuelensis</i>	CMW13513	<i>Acacia mangium</i>	Venezuela	DQ103549	DQ103570	-	3
<i>L. viticola</i> ^T	CBS 128313	<i>Vitis vinifera</i>	USA	HQ288228	HQ288270	HQ288307	14
<i>L. viticola</i>	UCD2553AR	<i>Vitis vinifera</i>	USA	HQ288227	HQ288269	HQ288306	14
<i>P. adansoniae</i>	CBS 122054	<i>Eucalyptus sp.</i>	Australia	EF585532	EF585570	-	9
<i>P. adansoniae</i>	WAC 13299	<i>M. indica</i>	Austrália	GU172404	GU172436	-	15
<i>P. ardesiacum</i>	WAC13294	<i>Mangifera indica</i>	Austrália	GU172405	GU172437	-	9
<i>P. ardesiacum</i>	CBS 122062	<i>Adansonia gibbosa</i>	Austrália	EU144060	GU172437	-	9
<i>P. kimberleyense</i>	CBS 122061	<i>F. opposita</i>	Australia	EU144059	EU144074	-	15
<i>P. kimberleyense</i>	WAC 13293	<i>Mangifera indica</i>	Austrália	GU172406	GU172438	-	16
<i>P. olivaceum</i>	CMW22639	<i>P. angolensis</i>	África	FJ888463	FJ888439	-	16
<i>P. olivaceum</i>	CMW20881	<i>P. angolensis</i>	África	FJ888459	FJ888437	-	2
<i>P. stromaticum</i>	IBL500	<i>A. occidentale</i>	Brazil	KT247464	KT247462	-	1
<i>P. stromaticum</i>	CMM 3961	<i>Mangifera indica</i>	Brazil	JX464103	JX464110	-	5
<i>P. stromaticum</i>	URM7471	<i>Atemoya</i>	-	KY994640	KX528581	-	2
<i>P. stromaticum</i>	IBL36	<i>A.occidentale</i>	Brazil	KT247465	KT247463	-	2
<i>P. stromaticum</i>	BOT. EN 04	<i>A.occidentale</i>	Brazil	-	-	-	-
<i>P. stromaticum</i>	BOE. EN 07	<i>A.occidentale</i>	Brazil	-	-	-	-

<i>P. stromaticum</i>	BOT.EN 09	<i>A.occidentale</i>	Brazil	-	-	-	-
<i>P. stromaticum</i>	BOT.EN 31	<i>A.occidentale</i>	Brazil	-	-	-	-
<i>P. stromaticum</i>	BOT.EN 33	<i>A.occidentale</i>	Brazil	-	-	-	-
<i>P. stromaticum</i>	BOT.EN 34	<i>A.occidentale</i>	Brazil	-	-	-	-
<i>P. stromaticum</i>	BOT.EN 36	<i>A.occidentale</i>	Brazil	-	-	-	-
<i>P. violaceum</i>	CMW22671	<i>P. angolensis</i>	África	FJ888472	FJ888441	-	16
<i>P. violaceum</i>	CMW20436	<i>P. angolensis</i>	África	FJ888458	FJ888440	-	16
<i>Spencermartinsia viticola</i>	CBS117009	<i>Vitis vinifera</i>	Spain	AY905554	AY905554	EU673104	17

Espécie com ^T: são as espécies tipo utilizadas neste estudo. As sequências em negrito foram obtidas do presente estudo. Referências 1- Marques *et al.*, (2013); 2 - Coutinho, *et al.*, (2017); 3 - Burgess *et al.*, (2006); 4 - Alves *et al.*, (2008); 5 - Machado *et al.*, (2014); 6- Silva *et al.*, (2019); 7- Abdollahzadeh *et al.*, (2010); 8- Begoude *et al.*, (2010); 9- Pavlic *et al.*, (2008); 10- Van der Walt *et al.*, (2009); 11- Dou *et al.*, (2017); 12- Trakunyingcharoen *et al.*, (2015); 13- Phillips *et al.*, (2005); 14- Urbez-Torres *et al.*, (2012); 15- Sakalidis *et al.*, (2011); 16- Mehl *et al.*, (2011); 17- Luque *et al.*, (2005). Espécie com ^T, são as espécies tipo utilizado neste estudo. Os números de sequência em negrito são as espécies trabalhada neste estudo.

Fonte: elaborada pelo autor.

2.2.4 Estudo morfológico e características culturais

Para o estudo morfológico foi mensurado o comprimento e a largura dos conídios de cada representante das espécies dos gêneros *Lasiodiplodia* (Botryosphaeriaceae) e *Pseudofusicoccum* (Pseudofusicoccumaceae) identificadas neste estudo. Os isolados foram cultivados em placas de Petri com BCA contendo acículas esterilizadas, incubadas a 25 °C e submetidas à luz negra para induzir o desenvolvimento de picnídios e conídios, por um período de 30 dias.

Os corpos de frutificação foram removidos e rompidos manualmente com o auxílio de um bisturi, sendo colocados em lâminas e corados com lactofenol, para posterior observação em microscópio. Foram realizadas 30 medições de conídios, enquanto outras características morfológicas, como paráfises e células conidiogênicas, não foram mensuradas. As imagens foram obtidas com uma câmera digital ICc5 131 Axiocam, acoplada a um microscópio (LEICA DM LS - Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) e um dispositivo de imagem Motic Image Plus 2.0 (Motic Group Co.).

2.5 CARACTERIZAÇÃO PATOGENICA

O teste de patogenicidade dos isolados foi realizado de acordo com a origem de cada um. Os isolados relacionados à morte descendente (PPH) foram inoculados na parte aérea das mudas, enquanto os isolados associados à resinose foram inoculados no caule. Ao todo, foi testada a patogenicidade de vinte isolados.

Os isolados foram inoculados em mudas de cajueiro com 30 dias. Cada isolado foi inoculado em quatro mudas de cada clone, BRS 265 (suscetível) e BRS 226 (resistente), totalizando oito mudas por isolado. A metodologia de inoculação consistiu na aplicação de uma suspensão de esporos na concentração de $1,0 \times 10^6$ esporos/mL. Com o auxílio de uma seringa estéril, uma pequena alíquota da suspensão foi retirada e injetada nos tecidos meristemáticos (gema apical). Para as amostras controle, foi injetada uma alíquota de água estéril (Tabela 2).

Para os fungos isolados da resinose. A metodologia de inoculação consistiu em um corte em bisel no caule na altura de 10 cm acima do colo, com o auxílio de um bisturi estéril. Posteriormente, foi colocado um disco de micélio de 6 mm de diâmetro no corte. Em seguida, o local foi envolto com algodão umedecido e coberto com Parafilm (Figura 2a). Nas plantas controle, foram colocados discos do meio de cultura BCA.

Em seguida, as mudas foram mantidas em câmara úmida por um período de 48 horas, com temperatura de 25 ± 2 °C, sendo retirados o Parafilm e o algodão. Posteriormente, as mudas foram transferidas para a casa de vegetação, onde a temperatura oscilava entre 30 e 36 °C, por um período de 30 dias, e, após esse período, foram avaliadas quanto à presença ou ausência de sintomas (Figura 2).

Após esse período foram realizados cortes longitudinais e paralelos ao ponto de inoculação, a fim de mensurar, com o auxílio de um paquímetro digital, a lesão necrótica provocada por cada isolado.

Tabela 2 – Espécies de fungos endofíticos da família Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae utilizados no estudo de diversidade cultural e morfológica, coletados na Fazenda Planalto, no município de Pio IX – PI.

Nº Isolado	Hospedeiro	Clone	Tecido	Característica do isolado	Origem
BOT. EN 01	Cajueiro	265	Enxertia	Endofítico	Pio IX-PI
BOT. EN 02	Cajueiro	76	Enxertia	Endofítico	Pio IX-PI
BOT. EN 03	Cajueiro	76	Enxertia	Endofítico	Pio IX-PI
BOT. EN 04	Cajueiro	265	Enxertia	Endofítico	Pio IX-PI
BOT. EN 05	Cajueiro	76	Intermediário	Endofítico	Pio IX-PI
BOT. EN 06	Cajueiro	265	Meristema	Endofítico	Pio IX-PI
BOT. EN 07	Cajueiro	76	Meristema	Endofítico	Pio IX-PI
BOT. EN 08	Cajueiro	76	Enxertia	Endofítico	Pio IX-PI
BOT. EN 10	Cajueiro	76	Meristema	Endofítico	Pio IX-PI
BOT. EN 11	Cajueiro	76	Intermediário	Endofítico	Pio IX-PI
BOT. EN 12	Cajueiro	265	Meristema	Endofítico	Pio IX-PI
BOT. EN 13	Cajueiro	265	Intermediário	Endofítico	Pio IX-PI
BOT. EN 14	Cajueiro	265	Intermediário	Endofítico	Pio IX-PI
BOT. EN 15	Cajueiro	76	Enxertia	Endofítico	Pio IX-PI
BOT. EN 16	Cajueiro	265	Enxertia	Endofítico	Pio IX-PI
BOT. EN 17	Cajueiro	226	Meristema	Endofítico	Pio IX-PI
BOT. EN 18	Cajueiro	265	Meristema	Endofítico	Pio IX-PI
BOT. EN 19	Cajueiro	265	Enxertia	Endofítico	Pio IX-PI
BOT. EN 20	Cajueiro	265	Enxertia	Endofítico	Pio IX-PI
BOT. EN 21	Cajueiro	76	Intermediário	Endofítico	Pio IX-PI
BOT. EN 22	Cajueiro	226	Enxertia	Endofítico	Pio IX-PI
BOT. EN 23	Cajueiro	76	Enxertia	Endofítico	Pio IX-PI
BOT. EN 24	Cajueiro	265	Intermediário	Endofítico	Pio IX-PI
BOT. EN 25	Cajueiro	76	Intermediário	Endofítico	Pio IX-PI

Abreviatura: BOT.EN = Botryosphaeriaceae endofítico. Fonte: dados da pesquisa.



Figura 2 - Inoculação de Botryosphaeriaceae em mudas de cajueiro. (A) mudas inoculadas; (B) e (C) Lesão causada por Botryosphaeriaceae. Fonte: elaborada pela autora.

A avaliação foi avaliada por meio de uma escala de notas adaptada de Pereira et al. (2006), que varia de 0 a 4, determinada com base na severidade da doença: (0 – mudas sem lesão visível; 1 – lesão de até 3 cm de comprimento; 2 – lesão de até 6 cm; 3 – lesão com comprimento superior a 6 cm; 4 – morte da planta).

Após as avaliações, foi realizado o reisolamento do fungo a partir das lesões avaliadas nas mudas que apresentaram sintomas de doença, e a partir do ponto de inoculação nas mudas que não apresentaram sintomas. Foram isolados 10 fragmentos do material vegetal em placas de Petri (BCA + acículas) os quais foram avaliados após 15 dias.

2.2.5 Teste de sobrevivência dos fungos da família Botryosphaeriaceae

Uma característica dos fungos endofíticos é a capacidade de sobreviver de forma harmônica com o hospedeiro. Com o objetivo de confirmar uma associação simbiótica do fungo com o hospedeiro em tecidos assintomáticos de cajueiro, foi realizado um terceiro ensaio. Os fungos isolados das brotações jovens dos clones de cajueiro CCP 76, BRS 265 e BRS 226 foram utilizados neste estudo (Tabela 2). Cada isolado foi inoculado via suspensão de esporos ($1,0 \times 10^5$) na parte apical de 4 mudas de cajueiro dos clones BRS 265 e BRS 226, respectivamente.

Posteriormente, as mudas foram colocadas em câmara úmida a uma temperatura de 25 °C por 2 dias. Em seguida, foram transferidas para a casa de vegetação, onde permaneceram por 60 dias. Após 30 dias, foi realizada a primeira avaliação, que consistiu no plaqueamento de duas mudas de cada clone por isolado. As mudas foram levadas para o laboratório, onde as folhas foram removidas, deixando apenas o caule, que foi submetido a uma lavagem inicial com água e detergente. Em seguida, os caules foram cortados em 10 fragmentos a partir do ponto de inoculação. Os fragmentos foram levados ao fluxo laminar, onde foi realizada a desinfestação superficial, que consistiu na utilização de etanol 70% por 30 segundos, seguido de 1 minuto em hipoclorito de sódio a 1,5%, e 2 enxágues com água destilada estéril (ADE). Por fim, os fragmentos foram plaqueados em meio BCA + acícula para induzir a esporulação.

Em seguida, as placas foram incubadas sob temperatura controlada (25 - 30 °C), com fotoperíodo de 12 horas, e examinadas por um período de 3 a 6 semanas até a produção de picnídios e esporos. O mesmo procedimento foi adotado na avaliação realizada após 60 dias.

2.3. RESULTADOS

2.3.1 *Análise filogenética e sequenciamento do DNA*

As análises filogenéticas dos vinte isolados estudados foram realizadas para identificar os fungos em nível de espécie. A construção da árvore filogenética mais parcimoniosa (comprimento = 353, IC = 0,7184, RI = 0,9349, RC = 0,7517) foi baseada no conjunto de dados combinados das sequências ITS, EF1- α e β -tub. Dos isolados obtidos neste estudo, 12 se agruparam no gênero *Lasiodiplodia* sp. (Botryosphaeriaceae) e 8 no gênero *Pseudofusicoccum* sp. (Pseudofusicoccumaceae).

A árvore filogenética (Figura 3) foi dividida em dois clados bem suportados, com valores de suporte de 100%, representando as famílias Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae. O clado superior da árvore inclui espécies da família Botryosphaeriaceae, divididas em 14 clados, enquanto o clado basal agrupa espécies de fungos da família Pseudofusicoccumaceae, organizadas em 6 clados. Os isolados identificados neste estudo se agruparam da seguinte forma: *Lasiodiplodia brasiliense* (BOT.EN 05), *Lasiodiplodia crassipora* (BOT.EN 10), *Lasiodiplodia euphorbicola* (BOT.EN 15), *Lasiodiplodia hormozganensis* (BOT.EN 03, BOT.EN 08), *Lasiodiplodia iraniensis* (BOT.EN 02, BOT.EN 13), *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (BOT.EN 35) e *Lasiodiplodia theobromae* (BOT.EN 01,

BOT.EN 32). Os isolados BOT.EN 11 e BOT.EN 30 não foram agrupados em nenhuma espécie específica.

Os demais isolados (BOT.EN 04, BOT.EN 07, BOT.EN 09, BOT.EN 14, BOT.EN 31, BOT.EN 33, BOT.EN 34, BOT.EN 36) agruparam-se em *Pseudofusicoccum stromaticum* (Pseudofusicoccumaceae), formando um único clado com sustentação de 100% de bootstrap (Figura 3).

Com base na morfologia e nos dados filogenéticos, foi possível identificar espécies de *Lasiodiplodia* sp. (Botryosphaeriaceae) e *Pseudofusicoccum* sp. (Pseudofusicoccumaceae) presentes de forma endofítica em tecidos de cajueiro nos três clones estudados.

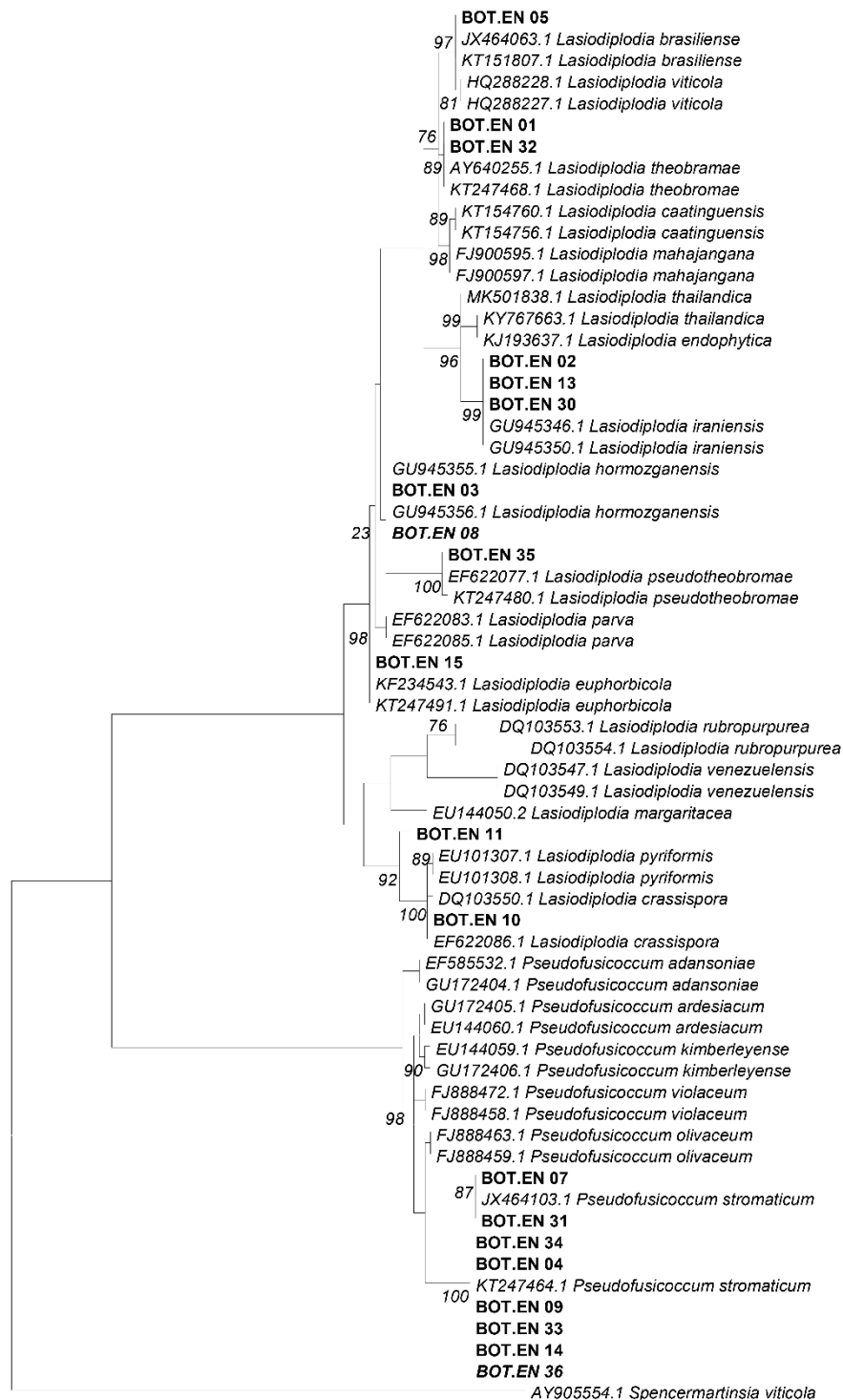


Figura 3 - Árvore filogenética inferida por máxima parcimônia (MP) a partir de dados combinados das regiões genômicas ITS, EF e β -tub para espécies de *Botryosphaeriaceae*. Os valores de bootstrap com 1.000 repetições são mostrados nos nós. *S. viticola* foi usada como grupo externo. Os espécimes obtidos neste estudo estão destacados em negrito.

2.3.2 Caracterização morfológica

Os isolados identificados com base nas análises filogenéticas, utilizando os dados combinados, compreenderam 12 isolados de *Lasiodiplodia* (*Lasiodiplodia brasiliense*, *L. iraniensis*, *L. pseudotheobromae* e *L. theobromae*) e 8 isolados de *Pseudofusicoccum stromaticum*. Esses isolados foram caracterizados com base em sua morfologia, exceto o isolado *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (BOT.EN 35) (Tabela 3). Os isolados apresentaram um rápido crescimento em meio de cultura. Inicialmente, o micélio exibia coloração branca, que posteriormente alterava para cinza-escuro, esverdeado ou preto, dependendo da espécie. O surgimento dos picnídios foi observado após 30 dias de incubação, apresentando conídios de formato ovóide, hialinos quando jovens e pigmentados à medida que envelheciam. Os conídios possuíam paredes celulares espessas, ápices arredondados e um septo longitudinal, característicos do gênero *Lasiodiplodia* (Figura 4). Para os isolados do gênero *Pseudofusicoccum*, os conídios apresentaram formato fusiforme, hialino e asseptado (Figura 4). Todas as espécies exibiram características morfológicas típicas de seus respectivos gêneros.

As dimensões dos conídios do isolado BOT.EN 11 não foram comparadas com as de outros isolados. Os aspectos morfológicos das colônias desses isolados, cultivados em BCA, e os conídios produzidos nas mesmas condições, podem ser visualizados na Figura 4b.

Tabela 3 - Características morfológicas de conídios das espécies de Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae identificadas nesse estudo, em comparação com as descrições morfológicas originais de cada espécie. Abreviaturas: C: Comprimento; L: Largura; C/L: relação entre o comprimento e a largura. Fonte: dados da pesquisa.

Espécies	Conídios C x L (µm)	Razão C/L	Referências
<i>Lasiodiplodia brasiliense</i> BOT.EN 05	22,7–29,2 × 11,7–17,0 21,3–25,6 × 13,79–12,7	1.8 1,77	Netto et al. (2014). Isolado de estudo
<i>L. crassispota</i> BOT.EN 10	(27–) 28,8 (–33) × (14–) 16 (–17) (23,7–) 23,1(17,6) × (15,4) 11,5 (11,3)	1.8 1.6	Burgess et al. (2006) Isolado do estudo
<i>L. hormozganensis</i> BOT.EN 03	(15,3–) 21,5 (–25,2) × (11–) 12,5 (14) 21,3–20,8 × 13,5–13,2	1.7 1.6	Abdollahzadeh et al. (2010) Isolado do estudo
<i>L. iraniensis</i> BOT.EN 02	(15,3–) 20,7 (–29,7) × (11–) 13 (–14) 24.3–21.7 × 12,9– 13,0	1.6	Abdollahzadeh et al. (2010) Isolado do estudo
<i>L. theobromae</i> BOT.EN 01	19.7–26.7 × 10.9–15.3 20,14– 15,13 × 10,31 – 9,74	1.69 1,7	Coutinho et al., 2017 Isolado do estudo
<i>P. stromaticum</i> BOT.EN 33	(19–)20–23(–24) × 5,0 (4,0) 6,0 15,23–14,0 × 5,35–4,7	4,0 3,2	Mohali et al. 2006 Isolado do estudo

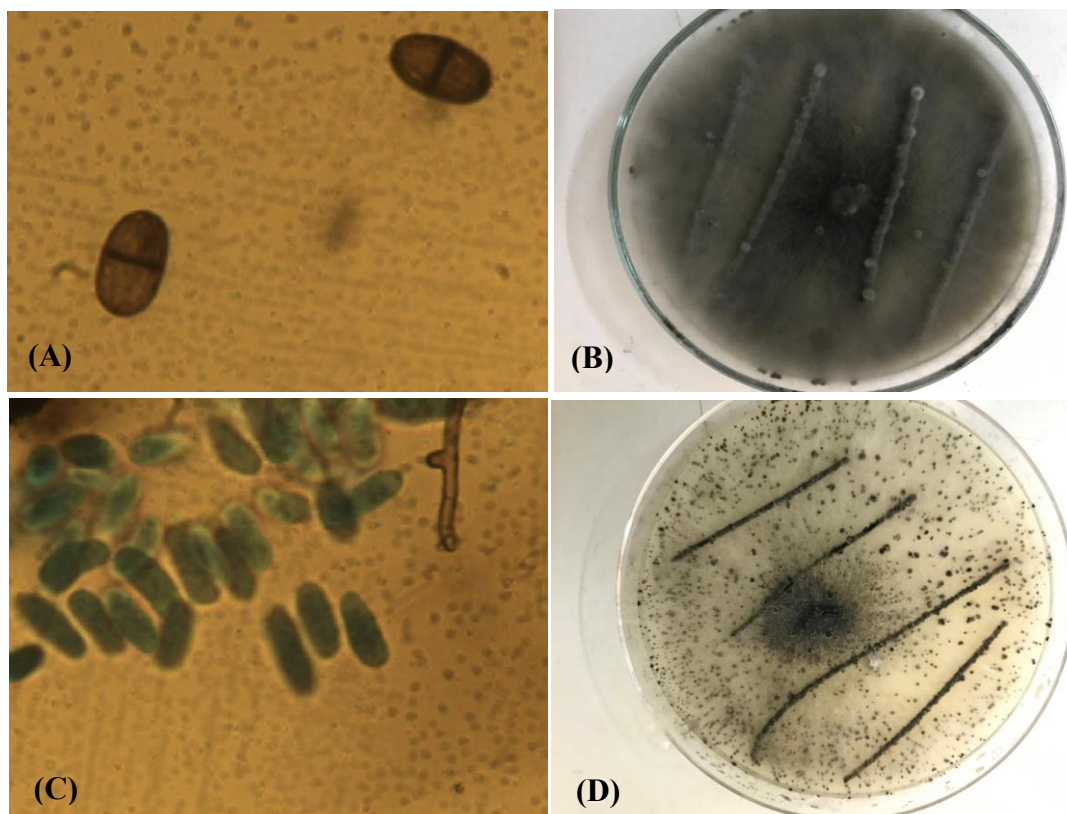


Figura 4 - Aspectos morfológicos das colônias dos isolados de Botryophariaceae e Pseudofusicoccumaceae identificados nesse estudo, cultivado em BCA. (A) colônia e (B) conídios do isolado BOT.EN 03, (C) colônia e (D) conídios do isolado BOT.EN 35. Fonte: elaborada pela autora.

2.3.2 Caracterização patogênica

Dos 20 isolados inoculados nas mudas de cajueiro, apenas 4 se mostraram patogênicos, causando a morte da planta (Tabela 4). Os isolados mais agressivos foram *Lasiodiplodia theobramae* (BOT.EN 01), *Lasiodiplodia brasiliensis* (BOT.EN 05), *Lasiodiplodia hormozganensis* (BOT.EN 08) e *Pseudofusicoccum stromaticum* (BOT.EN 07). O período de incubação até o aparecimento dos primeiros sintomas foi de 5 dias. Os sintomas consistiram no escurecimento da haste apical, seguido de necrose e, posteriormente, uma seca descendente (Figura 5). Cinco isolados causaram pequenas lesões nas mudas, mas não afetaram a fisiologia da planta, que se desenvolveu normalmente. Os demais isolados não causaram sintomas nas mudas de cajueiro. Posteriormente, todos os fungos inoculados foram reisolados e suas identidades confirmadas com base nos dados das sequências, cumprindo assim os postulados de Koch. As mudas não foram submetidas a nenhuma condição de estresse. Para os isolados

extraídos de tecidos com sintomas de resinose, todos foram patogênicos, causando lesões superiores a 3 cm, e obtiveram nota 2 de acordo com a escala utilizada para a avaliação.

Tabela 4 - Ensaio de patogenicidade dos vinte isolados de fungos da família Botryophariaceae e Pseudofusicoccumaceae nos clones BRS265 (susceptível) e BRS 226 (resistente).

Isolados	Hospedeiro	Notas de agressividade	Local de onde foi extraído
BOT.EN 01	265	1	265 (P.E)
	226	4	
BOT.EN 02	265	0	76 (P.E)
	226	0	
BOT.EN 03	265	0	76 (P.E)
	226	0	
BOT.EN 04	265	0	265 (P.E)
	226	1	
BOT.EN 05	265	4	76 (P.I)
	226	1	
BOT.EN 06	265	1	265 (M.A)
	226	0	
BOT.EN 07	265	0	76 (M.A)
	226	4	
BOT.EN 08	265	1	76 (P.E)
	226	4	
BOT.EN 09	265	0	76 (M.A)
	226	0	
BOT.EN 10	265	0	76 (P.I)
	226	0	
BOT.EN11	265	0	265 (M.A)
	226	1	
BOT.EN 12	265	1	265 (P.I)
	226	0	
BOT.EN 13	265	1	265 (P.I)
	226	0	
BOT.EN 14	265	1	76 (P.E)
	226	0	
BOT.EN 15	265	0	265 (P.E)
	226	1	
BOT.EN 16	265	0	226 (M.A)
	226	1	
BOT.EN 17	265	1	265 (P.E)
	226	0	
BOT.EN 18	265	0	76 (P.E)
	226	1	
BOT.EN 19	265	0	226 (M.A)
	226	1	
BOT.EN 20	265	1	265 (P.E)
	226	0	
BOT. EN 21	265	0	265 (P.I)
	226	0	
BOT. EN 22	265	0	76 (P.I)
	226	0	

BOT. EM 23	265	0	
	226	0	226 (P.E)

Fonte: dados da pesquisa.

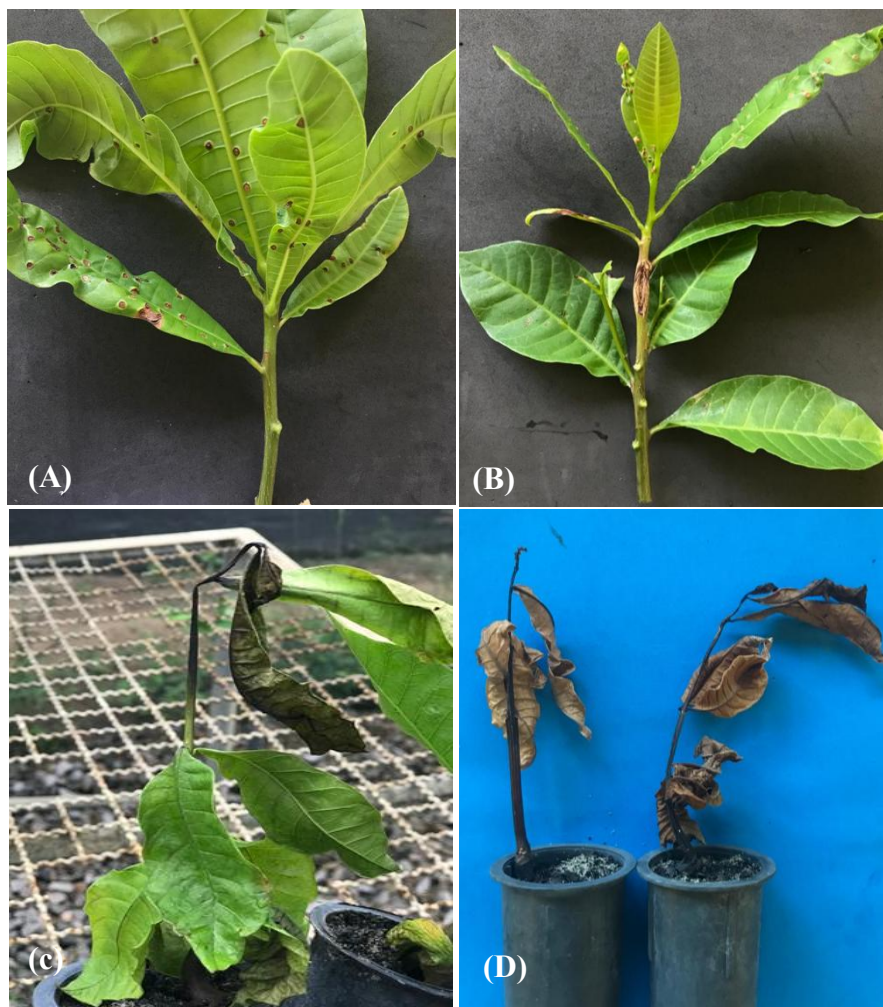


Figura 5 - Lesões provocadas por espécies de Botryosphaeriaceae em plantas jovens de cajueiro. (a) mudas sem lesão visível, (b) mudas que apresentaram pequena lesão, (c) muda apresentando sintoma inicial da doença (d) muda morta. Fonte: elaborada pela autora.

2.3.3 Sobrevivência do isolados em mudas de caju

Para investigar a associação do fungo endofítico com o hospedeiro, os fungos foram inoculados nas mudas de cajueiro por meio de uma suspensão de esporos. Na primeira avaliação, realizada após 30 dias, constatou-se que as mudas não apresentavam sinais de doença. Nessa etapa, foram retiradas duas mudas por isolado de cada clone e encaminhadas ao laboratório de fitopatologia. No laboratório, as mudas passaram por uma limpeza superficial com água e detergente, seguida de um procedimento de desinfestação superficial, conforme

descrito por Araújo *et al.* (2002). Após o tratamento, as mudas foram incubadas a 25 °C sob luz negra por um período de 4 semanas. O mesmo procedimento foi realizado para a avaliação posterior, aos 60 dias.

Na primeira avaliação, realizada aos 30 dias, apenas o isolado BOT.EN 14 não foi reisolado a partir dos tecidos de cajueiro inoculados. Os demais isolados do estudo foram observados no procedimento de reisolamento. Na segunda avaliação, todos os isolados inoculados em mudas sadias de cajueiro foram reisolados com sucesso. As avaliações foram realizadas com base na morfologia dos conídios inoculados.

2.4. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo sobre fungos endofíticos da ordem *Botryosphaeriales* associados à cultura do cajueiro (*Anacardium occidentale*) no Nordeste do Brasil. Ainda há pouco conhecimento sobre a diversidade e a ecologia desse grupo tão diversificado de fungos na cultura do cajueiro.

A árvore filogenética foi dividida em dois grandes clados, correspondentes às famílias Botryosphaeriaceae (*Lasiodiplodia* sp.) e Pseudofusicoccumaceae (*Pseudofusicoccum* sp.), ambas identificadas neste estudo, apresentando altos valores de suporte. Das 20 espécies identificadas, doze pertencem ao gênero *Lasiodiplodia* (Botryosphaeriaceae) e oito ao gênero *Pseudofusicoccum* (Pseudofusicoccumaceae), com base em um conjunto de dados apoiado por características morfológicas, associação com o hospedeiro e análise filogenética de três regiões gênicas (ITS, EF1- α e β -tub). As espécies identificadas foram *Lasiodiplodia brasiliense*, *Lasiodiplodia crassipora*, *Lasiodiplodia euphorbicola*, *Lasiodiplodia hormozganensis*, *Lasiodiplodia iraniensis*, *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Lasiodiplodia theobromae* e *Pseudofusicoccum stromaticum*.

O isolado BOT.EN 05 agrupou-se com *L. brasiliense*; o isolado BOT.EN 10, no clado de *L. crassipora*; o isolado BOT.EN 15 alinhou-se no clado de *L. euphorbicola*; os isolados BOT.EN 3 e 8, no clado de *L. hormozganensis*; os isolados BOT.EN 2, 13 e 30, no clado de *L. iraniensis*; o BOT.EN 35, no clado de *L. pseudotheobromae*; e os isolados BOT.EN 1 e 32, de *L. theobromae*, apresentando, assim, alta semelhança com espécies relatadas na literatura como patógenos de frutíferas.

As características morfológicas e filogenéticas revelaram semelhanças entre as espécies estudadas e as descritas na literatura, o que comprova que os fungos da família

Botryosphaeriaceae são endofíticos e podem apresentar patogenicidade ao hospedeiro com o qual estão associados, quando este é submetido a alguma condição de estresse. Crous et al. (2006) afirmam que a maioria dos gêneros da família Botryosphaeriaceae são relatados como endofíticos, incluindo Guignardia, Botryosphaeria, Dothidotthia, Neofusicoccum, Pseudofusicoccum, Lasiodiplodia e Diplodia, em Eucalyptus e Pinus. Essas informações podem ser potencialmente importantes para entender o risco apresentado por esses fungos e para elaborar estratégias de controle, bem como para compreender os mecanismos que governam a especificidade ou neutralidade em relação ao hospedeiro.

Os isolados (BOT.EN 04, BOT.EN 07, BOT.EN 09, BOT.EN 14, BOT.EN 31, BOT.EN 33, BOT.EN 34 e BOT.EN 36) agruparam-se no clado de *Pseudofusicoccum stromaticum* (Pseudofusicoccumaceae), apresentando um valor de suporte de 100%, o que caracteriza esses isolados como pertencentes à mesma espécie. As espécies de *P. stromaticum* foram as que apresentaram maior incidência no estudo de tecidos assintomáticos de cajueiro. Essa espécie foi descrita pela primeira vez por sua associação com ramos sem sintomas de *Eucalyptus sp.* e árvores de *Acácia mangium* na Venezuela, sugerindo sua natureza endofítica (Phillips et al., 2013). Há relatos de *P. stromaticum* causando podridões da haste em culturas no Brasil (Marques et al., 2013b), resinose em *Anacardium sp.* (Netto et al., 2017) e morte de plantas de graviola e atemoya. É possível que *P. stromaticum* sobreviva como endofítico em vários hospedeiros, mas possa causar doenças em plantas sob condições de estresse.

O isolado (BOT.EN 11) se agrupou sozinho na árvore, sugerindo ser uma espécie nova de Botryosphaeriaceae, apresentando um valor de suporte de 92%, de acordo com a abordagem filogenética baseada em dados de sequência de DNA.

Das espécies encontradas no estudo este é o primeiro relato de *Lasiodiplodia crassipora* e *Lasiodiplodia homorgonesis* na cultura do cajueiro.

No estudo filogenético, os isolados pertencentes ao gênero *Lasiodiplodia* (Botryosphaeriaceae) foram divididos em 8 clados, sendo que *Lasiodiplodia theobromae* e *Lasiodiplodia iraniensis* foram as espécies que apresentaram maior frequência de isolamento. Segundo Slippers et al. (2007), *Lasiodiplodia theobromae* é um fungo que apresenta uma ampla faixa de hospedeiros em diferentes regiões geográficas, conseguindo estabelecer-se mais facilmente em novas áreas, pois seu estabelecimento não depende da presença de hospedeiros específicos. Isso pode explicar a alta frequência de isolamento da espécie em diferentes culturas estudadas, como observado por Coutinho et al. (2017) e Netto et al. (2017), ao estudarem as principais doenças ocasionadas por fungos da família Botryosphaeriaceae em diferentes frutíferas.

O estudo de patogenicidade dos fungos mostrou que apenas quatro isolados causaram danos severos, ocasionando a morte da planta. Esses isolados foram BOT.EN01, BOT.EN05 e BOT.EN08, pertencentes à família *Botryosphaeriaceae*, e BOT.EN07, da família *Pseudofusicoccumaceae*. Cinco isolados causaram pequenas lesões, mas nada significativo, pois a planta conseguiu se restabelecer, não sendo afetada em seu desenvolvimento. Os demais isolados, um total de onze, não causaram nenhum sintoma visível nas mudas. Os resultados podem ser explicados pela capacidade do hospedeiro de desenvolver mecanismos que reconhecem a presença do fungo, facilitando sua entrada, uma vez que o fungo faz parte do nicho de fungos endofíticos presentes na cultura. Outro fator que pode ser levantado é que, por serem fungos com características endofíticas, sua ação patogênica tende a ser mínima. Essa mesma observação foi relatada por Van Niekerk *et al.* (2004) e Pavlic *et al.* (2007), ao estudarem espécies de *Botryosphaeriaceae* isoladas de tecidos assintomáticos. Eles observaram que, quando as espécies são inoculadas de forma artificial, apresentam níveis de patogenicidade baixos ou insignificantes. Pouco se sabe sobre o papel ecológico desse grupo de fungos, e qual seria sua real função nas comunidades vegetais, o que nos leva a questionar se ocorre uma interação benéfica ou mutualística entre esses fungos e as plantas. Entretanto, são necessários mais estudos sobre a diversidade desse grupo de fungos para confirmar essa hipótese.

Após a identificação, conclui-se que todas as espécies estudadas estejam correlacionadas com aquelas que causam as principais doenças já relatadas para a cultura do cajueiro e/ou outras frutíferas, o que apoia a teoria de que *Botryosphaeriaceae* e *Pseudofusicoccumaceae* são famílias de fungos endofíticos.

Estudos afirmam que a maioria, se não todas, as espécies de *Botryosphaeriaceae* possam ter uma fase endofítica (Slippers *et al.*, 2007), e que alguns fatores podem ser os precursores dessa mudança de comportamento de endofíticos para patogênicos, tais como: mudanças climáticas, que são capazes de causar pressão nas plantas, levando ao estresse, ou uma pressão biológica que possa ocorrer em diferentes áreas geográficas. Esses elementos favorecem o desenvolvimento de doenças relacionadas à *Botryosphaeriaceae* (Coakley *et al.*, 1999; Desprez-Loustau *et al.*, 2006). Apesar de alguns gêneros dessa família serem descritos como endofíticos, ainda hoje a maioria dos estudos sobre esses fungos é predominantemente voltada para a ação patogênica. Segundo Crous *et al.* (2006), esse fato pode ser explicado por razões econômicas. Sendo assim, são necessários mais estudos direcionados às características endofíticas dessa família e seu comportamento ecológico.

Com base na morfologia e na filogenia das espécies estudadas, observou-se que ambas apresentam semelhanças com espécies das famílias *Botryosphaeriaceae* e

Pseudofusicoccumaceae, as quais são relatadas na literatura como fungos patogênicos de diversas culturas de importância econômica. Em geral, as espécies de *Lasiodiplodia* (Botryosphaeriaceae) mostraram-se mais virulentas nos genótipos de cajueiro, com destaque para *L. theobromae*, *L. brasiliense* e *L. hormozganensis*. O isolado (BOT.EN 07) de *Pseudofusicoccum stromaticum* da família *Pseudofusicoccumaceae* também apresentou virulência apenas para o clone BRS226, causando uma pequena lesão no clone BRS265. O genótipo de cajueiro BRS226 foi o mais suscetível à maioria dos isolados utilizados neste estudo.

Este é o primeiro estudo sobre fungos endofíticos das famílias *Botryosphaeriaceae* e *Pseudofusicoccumaceae* associados à cultura do cajueiro. O teste de sobrevivência evidenciou a capacidade do fungo de conviver de forma simbiótica com o hospedeiro em condições naturais, nas quais a planta se desenvolve.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao suporte financeiro e estrutural da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa).

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHZADEH, J. et al. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 25, n. 1, p. 1-10, 2010.
- ALVES, Artur et al. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. **Fungal diversity**, v. 28, n. 1, p. 1-13, 2008.
- ALVES, E. S. et al. **Efeito das condições edafoclimáticas na ocorrência da resinose do cajueiro**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2015. 28 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Boletim de pesquisa e desenvolvimento 100). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/131487/1/BPD15005.pdf>. Acesso: 22 mar. 2019.
- BEGOUDE, BA Didier et al. Botryosphaeriaceae associated with *Terminalia catappa* in cameroon, south africa and madagascar. **Mycological Progress**, v. 9, n. 1, p. 101-123, 2010.
- BRAINER, M. S. C. P. **Cajucultura nordestina em recuperação**. Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste – ETENE. Ano 3, Nº 54, novembro, 2018. Disponível em: https://www.bnb.gov.br/documents/80223/4141162/54_caju.pdf/95e65093-50e1b48d-ab01-15f3a8f690b4. Acesso em: 30/05/2019.
- BURGESS, Treena I. et al. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. **Mycologia**, v. 98, n. 3, p. 423-435, 2006.
- CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P.; MARTINS, M. V. V. **Doenças causadas por fungos da família Botryosphaeriaceae em cajueiro**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza: 2018.
- CARDOSO, José Emilson et al. Ocorrência endofítica de *Lasiodiplodia theobromae* em tecidos de cajueiro e sua transmissão por propágulos. **Summa Phytopathologica**, v. 35, p. 262-266, 2009.
- COAKLEY, S. M.; SCHERM, H.; CHAKRABORTY, S.. Climate change and plant disease management. **Annual review of phytopathology**, v. 37, n. 1, p. 399-426, 1999.
- COUTINHO, I. B. L. et al. Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. **Plant Pathology**, v. 66, n. 1, p. 90-104, 2017.

DESPREZ-LOUSTAU, Marie-Laure et al. Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. **Annals of forest science**, v. 63, n. 6, p. 597-612, 2006.

DOU, Z. P.; HE, W.; ZHANG, Y. Does morphology matter in taxonomy of *Lasiodiplodia* An answer from *Lasiodiplodia hyalina* sp. nov. *Mycosphere* 8: 1014–1027 [em linha]. 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal: Culturas temporárias e permanentes – PAM**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticasnovportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html?&t=resultados>. Acesso: 10/04/2019.

JOHNSON, G. I. et al. Mango stem end rot pathogens-Fruit infection by endophytic colonisation of the inflorescence and pedicel. **Annals of Applied Biology**, v. 120, n. 2, p. 225-234, 1992.

LUQUE, J.; MARTOS, S.; PHILLIPS, A. J.L. *Botryosphaeria viticola* sp. nov. on grapevines: a new species with a *Dothiorella* anamorph. *Mycologia*, v. 97, n. 5, p. 1111-1121, 2005.

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, n. 1, p. 231-247, 2014.

MACHADO, Alexandre Reis et al. *Botryosphaeriaceae* species causing dieback on *Annonaceae* in Brazil. **Plant Pathology**, v. 68, n. 7, p. 1394-1406, 2019.

MARQUES, M. W. et al. *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* and *Pseudofusicoccum* species associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, v. 61, n. 1, p. 195-208, 2013.

MEHL, J. W.M et al. *Botryosphaeriaceae* associated with *Pterocarpus angolensis* (kiaat) in South Africa. **Mycologia**, v. 103, n. 3, p. 534-553, 2011.

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

PAVLIC, D. et al. Seven new species of the *Botryosphaeriaceae* from baobab and other native trees in Western Australia. **Mycologia**, v. 100, n. 6, p. 851-866, 2008.

PETRINI, O.; FISHER, P. J. A comparative study of fungal endophytes in xylem and whole stem of *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 91, n. 2, p. 233-238, 1988.

PHILLIPS, A. et al. 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. et al. The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. **Studies in mycology**, v. 76, n. 1, p. 51-167, 2013.

SAKALIDIS, M. L. et al. Pathogenic *Botryosphaeriaceae* associated with *Mangifera indica* in the Kimberley region of Western Australia. **European journal of plant pathology**, v. 130, n. 3, p. 379-391, 2011.

DE SILVA, N. I. et al. Phylogeny and morphology of *Lasiodiplodia* species associated with *Magnolia* forest plants. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 14355, 2019.

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.

TRAKUNYINGCHAROEN, T. et al. Caulicolous *Botryosphaeriales* from Thailand. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 34, n. 1, p. 87-99, 2015.

URBEZ-TORRES, J. R. et al. Characterization of fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Arkansas and Missouri. **Fungal diversity**, v. 52, n. 1, p. 169-189, 2012.

VAN DER WALT, F. J. J. **Botryosphaeriaceae associada a espécies nativas de Acacia no sul da África, com referência especial a *A. mellifera***. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de Pretória.

CAPÍTULO III: Detecção de fungos da família Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae em sementes de cajueiro

Autores

Regimara Francisca Bernardo da Silva Vieira ^a, Wéverson Lima Fonseca ^a, Suane de Oliveira Souza Brasil ^a, Cristiano Souza Lima ^a e José Emilson Cardoso ^b

^a *Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal do Ceará, 60440-554 Fortaleza, Ceará, Brasil;* ^b *Embrapa Agroindústria Tropical, 60511-110 Fortaleza, Ceará, Brasil.*

*Autor para correspondência: José Emilson Cardoso; Endereço de E-mail: jose-emilson.cardoso@embrapa.br; Regimara F. B. S. Vieira; Endereço de E-mail: bernardoregimara@gmail.com; TELEFONE: +55 88 99704-8222.

RESUMO

O Brasil é o terceiro maior exportador de castanha de caju, sendo a região Nordeste responsável por 99% da produção do país. As doenças ocasionadas por fungo da família botryosphaeriaceae como resinose, morte descendente e podridão preta da haste tem provocado inúmeros prejuízos à cultura. A transmissão desse patógeno via semente, representa um grande risco para a agricultura em função da impossibilidade de manejo. Este trabalho teve como objetivo detectar a presença de fungos das famílias Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae em semente de cajueiro. Foram coletadas amostras de sementes em dois locais diferentes. Onde o primeiro local a alta incidência de doenças relacionado a Botryosphaeriaceae, sendo coletadas castanhas dos clones CCP 76 e BRS 226 e um local de baixa incidência da doença associada ao grupo de fungos, onde foram coletadas castanha do clone BRS 265. As amostras foram isoladas em placas de Petri, divididas em amêndoa e castanha, onde foi observado a incidência de isolamento. Posteriormente, realizou as análises morfológicas e filogenética dos isolados, onde comprovou, a presença de fungos das famílias Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae de forma endófitica em semente de cajueiro e que a sua transmissão ocorre de forma vertical. E por meio da caracterização morfológica, molecular das espécies de Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae, encontrada no estudo, evidenciou, que as espécies endofítica encontrada neste estudo são a mesmas espécies relatadas como patógenos da cultura.

Palavras chaves: fungos endofíticos; filogenia; patogenicidade.

ABSTRACT

Brazil is the third largest exporter of cashew nuts, being a Northeast region responsible for 99% of the country's production. The fungus diseases caused by the Botryosphaeriaceae and Pseudofusicoccumaceae family such as resinosis, descending death and black rot stem caused several crop damages. The seed transmission represents a great agriculture risk due to the management impossibility. This work aimed to detect the fungi presence at Botryosphaeriaceae and Pseudofusicoccumaceae families in cashew seed. Seed samples were collected at two different locations. The first location had a high incidence of Botryosphaeriaceae and Pseudofusicoccumaceae diseases, with chestnuts from clones CCP 76 and BRS 226 being collected and a local place with low diseases incidence associated with the group of fungi, where chestnuts from the clone BRS 265 were collected. The samples were isolated in Petri dishes, separated into almond and chestnut, the isolation incidence was observed. Subsequently, performed as morphological and phylogenetic analysis of the levels, where proved the presence of endophytic fungi belonged at Botryosphaeriaceae and Pseudofusicoccumaceae families in cashew seeds and the transmission occurs vertically. In this study, the morphological and molecular characterization of the Botryosphaeriaceae and Pseudofusicoccumaceae species evidenced that endophytic species found in this work were the same species related as pathogens culture.

Keywords: endophytic fungi; phylogeny; pathogenicity.

3.1. INTRODUÇÃO

O cajueiro (*Anarcadium occidentale* L.), é uma planta pertencente à família Anarcadiaceae, caracteriza-se por ser uma planta perene, de porte médio, apresentando caule comumente tortuoso e ramificado; suas folhas são simples inteira, alternas, de aspecto subcoriáceo. É uma planta adromonoíca, onde apresenta flores masculina e hermafroditas numa mesma panícula. O fruto é um aquênio de formato reniforme, composto por epicarpo, mesocarpo e endocarpo. A amêndoa é recoberta por uma película (Lima, 1988; Barros, 1993).

O Brasil é o terceiro maior exportador de castanha de caju, ficando atrás apenas da Índia e do Vietnã. Sendo a região Nordeste responsável por 99% da produção do país, mostrando a importância socioeconômica da cultura para a região (Moreira et al., 2013, Freire et al., 2014). A ocorrência de mudanças climáticas em curtos intervalos de tempo, aliada ao uso inadequado de práticas de manejo e à adoção do monocultivo, tem provocado alterações na epidemiologia de determinadas doenças, anteriormente consideradas secundárias, mas que atualmente são responsáveis por danos severos às culturas, comprometendo sua produtividade. Entre essas doenças, destacam-se aquelas associadas à família *Botryosphaeriaceae*. (Cardoso; Viana, 2011; Viana et al., 2016).

As doenças hoje, são os principais entraves para uma exploração eficiente do cajueiro devido a danos diretos na integridade física e na fisiologia da cultura ou indiretamente, quando associado a algum tipo de estresse ambiental (Moreira et al., 2012). Os fungos da família *Botryosphaeriaceae* são relatados como os principais patógenos na cultura, sua infecção ocorre quando seu hospedeiro é submetido a algumas condições de estresses (Smith et al., 1994, Stanosz et al., 2001). As doenças ocasionadas por este grupo de fungos são observadas de modo indistinto, tanto em plantas estressadas como em plantas aparentemente vigorosas (Bezerra et al., 2003). Este grupo de fungos são cosmopolitas, altamente diversos, podem infectar uma ampla gama de hospedeiro, causando sintomas de podridões de frutos, morte descendente e cancro em plantas lenhosas (Von Arx e Müller, 1954; Barr, 1987).

A transmissão desses patógenos pode ocorrer via horizontal por meio da dispersão dos esporos pelo vento que penetra nas plantas via aberturas naturais ou por abertura provocadas por pragas (Petrini, 1991; Marinho et al., 2005; Slippers; Wingfield, 2007) e via vertical quando o fungo já se encontra presente na semente de forma endofítica e ao desenvolve-se transporta o fungo em seus tecidos (Petrini, 1991; Marinho et al., 2005; Slippers; Wingfield, 2007). O aparecimento de doença associado as *Botriosphaeriaceae*, em locais antes não relatadas,

levantam a hipótese sobre a transmissão desse patógeno por mudas sadias e sementes (Cardoso et al., 2009).

Freire, (2012) afirma que a infecção por fungos endofíticos em amêndoas de cajueiro ocorre quando os fungos, normalmente presentes nos ramos e folhas do cajueiro, se estabelecem nos tecidos que formarão as novas inflorescências.

A aptidão demonstrada por esse grupo de fungos de conviver de forma endofítica em culturas exploradas comercialmente, representa um grande risco para a agricultura em função da impossibilidade de manejo. Sendo necessário conhecer melhor o papel ecológico desta família, sua interação com os hospedeiros, transmissão e sua forma de infecção. Contudo, ainda detém de poucos estudos das sementes como veículo de transmissão desses fungos, para culturas de importância econômica. Conduto, este trabalho teve como objetivo detectar a presença de fungos da família Botryosphaeriaceae em semente de cajueiro.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Coletas das castanhas

Foram coletadas amostras de 100 castanhas saudáveis dos clones CCP 76, BRS 265 e BRS 226, colhidos em 2019 dos pomares do município de PIO-IX, no estado do Piauí e em Pacajus no estado do Ceará. Posteriormente, os materiais foram levados para o laboratório de Fitopatologia da Embrapa Agroindústria Tropical em Fortaleza Ceará. As sementes usadas no estudo, foram coletadas em dois locais diferentes. Os clones CCP 76 e BRS 265, foram coletadas na fazenda planalto em PIO-IX-PI, onde apresenta alta incidência de doenças associadas as Botryosphaeriaceae e o clone BRS265 foi coletada na fazenda da Embrapa Agroindústria em Pacajus-CE, onde a incidência de doenças ocasionada por este grupo de fungos é menor.

3.2.2 Caracterização dos materiais coletados

Os materiais passaram por uma limpeza superficial com a água e detergente com o objetivo de eliminar sujeiras e outros microrganismos indesejáveis, sendo posteriormente colocadas para secar. Em seguida, realizou-se uma esterilização superficial para fungos endofíticos de acordo com Araújo *et al.*, (2002). Que consistiu na imersão das castanhas em álcool 70% por 1 minuto; seguida de uma lavagem com hipoclorito de sódio a 3% por 3 minuto; colocado novamente no álcool por mais 1 minuto; seguido de duas lavagens com água destilada

estéril (ADE) e colocada em uma placa contendo papel filtro esterilizado para a retirada excesso de água.

Posteriormente, as castanhas foram abertas mecanicamente, ao qual encontravam-se visualmente saudáveis sem a presença de manchas (lesões escuras), sendo em seguida distribuídas em placas contendo BCA. As placas foram divididas entre amêndoa e castanhas, onde cada placa continha duas amêndoas e duas castanhas (Figura 6).

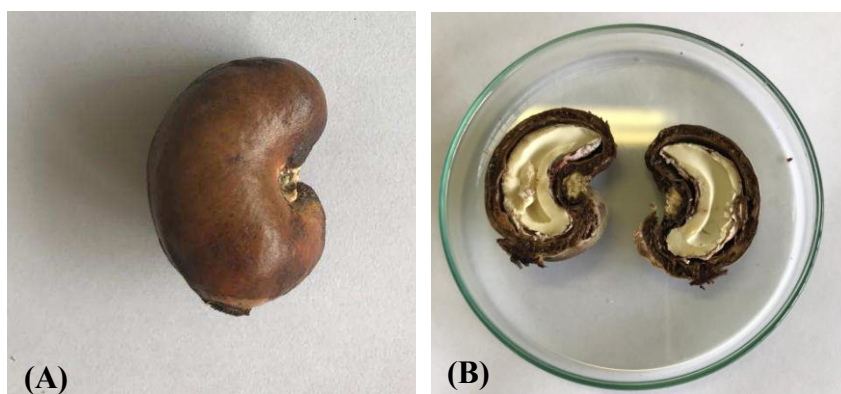


Figura 6 - Aspecto gerais das sementes usada neste estudo, para a detecção de fungos da ordem Botryosphaeriales. (A) aspectos externo da semente; (B) aspecto interno da semente usada no estudo. Fonte: elaborada pela autora.

Em seguida, as placas foram incubadas a 28° C, com fotoperíodo de 12 horas de luz, por um período de 5 dias e examinadas, diariamente, quanto ao crescimento micelial do fungo. As colônias que se desenvolveram foram transferidas para outra placa contendo Batata Cenoura Ágar (BCA + acícula), que foram novamente incubadas a 28 °C, por um período de 4 semanas. Os fungos foram identificados com base nas suas características morfológicas (coloração da colônia que variava de verde escuro a preto, presença de picnídio), para presença de fungos da família Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae. A porcentagem da ocorrência de fungos nas sementes foi anotada (Tabela 5). Posteriormente foi selecionado 11 isolados com base na sua morfologia para a extração de DNA. Os fungos foram encontrados tanto nas castanhas como nas amêndoas (Tabela 5).

Tabela 5 - Porcentagem de ocorrência de fungos da família Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae em sementes de cajueiro.

Clone	Local	Porcentagem
76	Castanha	25%
	Amêndoa	15%
265	Castanha	10%
	Amêndoa	8%
226	Castanha	17%
	Amêndoa	10%

Fonte: dados da pesquisa.

3.2.3 Extração, amplificação e sequenciamento de DNA genômico

As extrações e amplificações de DNA dos isolados foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Agroindústria Tropical. Foram extraído o DNA genômico de 11 isolados extraído das castanhas do clone CCP 76, BRS 265 e do clone BRS 226. Os isolados foram cultivados em Batata Dextrose (BD), por um período de 7 dias, com 12h fotoperíodo sem agitação, posteriormente uma filtragem para a retirada da massa micelial em seguida de duas lavagens com água estéril, a fim de eliminar o meio de cultura. Em seguida, amanta de micélio foi colocada e um placa de petri contendo papel filtro autoclavado, de modo a realizar uma breve secagem da manta micelial. O protocolo utilizado para a extração do DNA genômico foi o de CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônia), utilizando o protocolo de Cavalcanti & Wilkinson (2007) com modificações.

Posteriormente, as amostras de DNA extraído foram quantificadas utilizando um espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific). Em seguida, as amostras foram diluídas para $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de DNA μL^{-1} e armazenadas a -20°C .

A mistura de Reação da cadeia da Polimerase (PCR) continha um volume final de $50 \mu\text{L}$ sendo composta com $6,25 \mu\text{L}$ do DNA genômico ($10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), $10 \mu\text{L}$ de buffer 5x, $3,0 \mu\text{L}$ de MgCl_2 (25 mM), $1 \mu\text{L}$ de dNTP (10 mM), $5 \mu\text{L}$ de cada iniciador (10 mM), $0,5 \mu\text{L}$ de GoTaq polimerase ($5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) e $19,25 \mu\text{L}$ de água deionizada estéril.

Os iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990), foram utilizados para utilizados para amplificar as regiões ITS 1 e 2. Para amplificação da região EF1- α , foram usando os iniciadores TEF1-688F (5'-CGGTCACTTGATCTACAAGTGC-3') e TEF1-1251R (5'-

TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Alves et al., 2008) e os primers β t2a e β t2b foram usados para sequenciar o fragmento β -tub (Glass & Donaldson, 1995). O ciclo da PCR consistiu com uma desnaturação inicial de 96° C por 1 minuto, seguidos de 35 ciclos, seguindo de uma desnaturação a 94° C por 30 segundo; anelamento a 58° C por um minuto (ITS e EF1- α) ou 68° C (β -tub) por 1 min e uma extensão final de 72° C por 10 minutos (COUTINHO *et al.*, 2017).

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% com o tampão Tris Borato EDTA 1X, corados com brometo de etídio (0,5 mg mL⁻¹) e visualizados sob transluminador UV. Após verificação das bandas amplificadas, alíquotas de 40 μ L de cada produto de PCR foram enviadas para a empresa MacroGen Inc., Coreia do Sul (<http://www.macrogen.com>), para serem purificadas e sequenciadas nas direções senso e antisenso. As regiões ITS e EF foi sequenciado para os 11 isolados e a região β -tub foi sequenciada para 6 isolados do gênero *Lasioidiplodia*.

3.2.4 Análises filogenéticas

As sequências nucleotídicas das regiões de ITS, TEF1- α e β -tub foram editadas usando o programa BioEdit versão 7.0.5 (HALL, 2012) e alinhadas manualmente usando o ClustalW com sequências de fungos da família Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae publicadas e depositadas no GenBank (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Tabela 6). As sequências ITS, TEF1- α e β -tub apresentaram um tamanho de aproximadamente 580, 300 e 420pb. As relações filogenéticas foram inferidas pela análise de máxima parcimônia (MP) e realizadas através de uma opção de busca heurística por treebisection-reconnection (TBR) no programa MEGA 7 (KUMAR et al., 2016). O suporte estatístico da árvore foi testado usando análise de bootstrap com 1.000 repetições. *Spencermartinsia viticola* foi usado como grupo externo (outgroup). Os escores de árvore, incluindo o comprimento da árvore, índice de consistência (CI), índice de retenção (IR) e índice de consistência reescalada (RC) também foram calculados.

Tabela 6. Isolados utilizados para a construção filogenética, planta hospedeiros, país de origem e código de acesso Genbank para as sequências ITS, TEF1- α e β -tub.

Espécie	Isolados	Hospedeiro	Origem	Número de acesso ao GenBank			Referência
				ITS	EF1- α	β -tub	
<i>Botryosphaeria rosaceae</i>	CGMCC3.18008	<i>Amygdalus sp.</i>	China	KX197075	KX197095	KX197102	1
<i>B. rosaceae</i>	CGMCC3.18007	<i>Malus sp.</i>	China	KX197074	KX197094	KX197101	1
<i>Cophinforma atrovirens</i>	MFLUCC	<i>Eucalyptus sp.</i>	Thailand	JX646800	JX646865	JX646848	2
<i>C. atrovirens</i>	MFLUCC 11-0655	<i>Eucalyptus sp.</i>	Thailand	JX646801	JX646866	JX646849	2
<i>C. mamane</i>	CMM 3941	<i>M. indica</i>	Brazil	KC184892	JX513626	-	3
<i>C. mamane</i>	MF521897	<i>A.occidentale</i>	Brazil	MF521897	MG209371	MF538773	4
<i>C. mamane</i>	BOT.EN 17	<i>A.occidentale</i>	Brazil	-	--	-	-
<i>Fusicoccum fabicercianum</i>	CMM 3905	<i>M. indica</i>	Brazil	JX513642	JX513621	-	3
<i>F. fabicercianum</i>	CMM 3899	<i>M. indica</i>	Brazil	JX513646	JX513625	-	3
<i>Lasiodiplodia brasiliense</i> ^T	CMM 4015	<i>Mangifera indica</i>	Brazil	JX464063	JX464049	-	3
<i>L. brasiliense</i>	IBL348	<i>Mangifera indica</i>	Brazil	KT151807	KT151801	KT151804	5
<i>L. crassisporea</i> ^T	CBS 118741	<i>Unknown</i>	Australia	DQ103550	EU673303	KU887506	6
<i>L. crassisporea</i>	CMW22653	<i>P. angolensis</i>	Africa	FJ888465	FJ888452	-	7
<i>L. euphorbicola</i> ^T	CMM 3609	<i>Jatropha curcas</i>	Brazil	KF234543	KF226689	KF254926	8
<i>L. hormozganensis</i> ^T	IRAN1500C	<i>Olea sp.</i>	Iran	GU945355	GU945343	-	9
<i>L. hormozganensis</i>	CBS 124708	<i>Mangifera indica</i>	Iran	GU945356	GU945344	-	9
<i>L. hormozganensis</i>	BOT.EN 27	<i>A.occidentale</i>	Brazil	-	-	-	-
<i>L. iraniensis</i> ^T	CBS 124710	<i>Mangifera indica</i>	Iran	GU945346	GU945334	KU887516	9
<i>L. iraniensis</i>	IRAN1519C	<i>Mangifera indica</i>	Iran	GU945350	GU945338	-	9
<i>L. iraniensis</i>	BOT.EN 23	<i>A.occidentale</i>	Brazil	-	-	-	-
<i>L. iraniensis</i>	BOT.EN 19	<i>A.occidentale</i>	Brazil	-	-	-	-
<i>L. mahajangana</i> ^T	CMW27801	<i>T. catappa</i>	Madagascar	FJ900595	FJ900641	FJ900630	10
<i>L. parva</i> ^T	CBS456.78	<i>Cassava-field soil</i>	Colômbia	EF622083	EF622063	KU887523	11
<i>L. pyriformis</i> ^T	CBS 121770	<i>A. mellifera</i>	Namibia	EU101307	EU101352	KU887527	12
<i>L. pseudotheobromae</i> ^T	CBS 116459	<i>Gmelina arborea</i>	Costa Rica	EF622077	EF622057	EU673111	11
<i>L. pseudotheobromae</i>	IBL266	<i>A. occidentale</i>	Brazil	KT247480	KT247484	KT247486	5
<i>L. pseudotheobromae</i>	BOT.EN 28	<i>A.occidentale</i>	Brazil	-	-	-	-
<i>L. rubropurpurea</i> ^T	CBS 118740	<i>E. grandis</i>	Australia	DQ103553	EU673304	EU673136	6

<i>L. thailandica</i> ^T	CBS 138760	<i>Albizia chinensis</i>	China	KY767663	KY751304	KY751301	13
<i>L. theobromae</i> ^T	CBS 164.96	<i>Fruit</i>	New Guinea	AY640255	AY640258	KU887532	14
<i>L. theobromae</i>	IBL404	<i>A. occidentale</i>	Brazil	KT247468	KT247470	KT247476	5
<i>L. theobromae</i>	BOT.EN 26	<i>A.occidentale</i>	-	-	-	-	-
<i>L. theobromae</i>	BOT.EN 29	<i>A.occidentale</i>	-	-	-	-	-
<i>L. venezueiensis</i> ^T	CBS 118739	-	-	DQ103547	EU673305	KU887533	6
<i>L. viticola</i> ^T	UCD2604MO	<i>Vitis vinifera</i>	USA	HQ288228	HQ288270	HQ288307	15
<i>Macrophomina phaseolina</i>	CMM3615	<i>Jatropha curcas</i>	Brazil	KF234547	KF226693	KF254930	8
<i>M. phaseolina</i>	PD112	<i>Prunus dulcis</i>	USA	GU251105	GU251237	GU251765	16
<i>Neoscytalidium hyalinum</i>	CMM3566	<i>Jatropha curcas</i>	Brazil	KF234551	KF226709	KF254935	8
<i>N. hyalinum</i>	CMM3649	<i>Jatropha curcas</i>	Brazil	KF234550	KF226707	KF254934	8
<i>N. parvum</i>	CMM 1291	<i>Mangifera indica</i>	Brazil	JX513633	JX513613	KC794029	3
<i>N. parvum</i>	CMM 1465	<i>Mangifera indica</i>	Brazil	JX513634	JX513614	KC794027	3
<i>Pseudofusicoccum adansoniae</i>	CBS 122054	<i>Eucalyptus sp.</i>	Australia	EF585532	EF585570	-	17
<i>P. ardesiacum</i>	WAC13294	<i>Mangifera indica</i>	Austrália	GU172405	GU172437	-	18
<i>P. kimberleyense</i>	CBS 122061	<i>F. opposita</i>	Australia	EU144059	EU144074	-	17
<i>P. olivaceum</i>	CMW22639	<i>P. angolensis</i>	África	FJ888463	FJ888439	-	7
<i>P. stromaticum</i>	IBL500	<i>A.occidentale</i>	Brazil	KT247464	KT247462	-	19
<i>P. stromaticum</i>	CMM 3961	<i>Mangifera indica</i>	Brazil	JX464103	JX464110	-	3
<i>P. stromaticum</i>	BOT.EN 18	<i>A.occidentale</i>	Brazil	-	-	-	-
<i>P. stromaticum</i>	BOT.EN 21	<i>A.occidentale</i>	Brazil	-	-	-	-
<i>P. stromaticum</i>	BOT.EN 22	<i>A.occidentale</i>	Brazil	-	-	-	-
<i>P. stromaticum</i>	BOT.EN 25	<i>A.occidentale</i>	Brazil	-	-	-	-
<i>P. violaceum</i>	CMW22671	<i>P. angolensis</i>	África	FJ888472	FJ888441	-	7
<i>Spencermartinsia viticola</i>	CBS117009	<i>Vitis vinifera</i>	Spain	AY905554	AY905559	EU673104	20

Referencias 1 - Zhou *et al.*, (2017); 2 - Liu *et al.*, (2012); 3- Marques *et al.*, (2013); 4 - Cardoso *et al.*, (2019); 5 - Coutinho, *et al.*, (2017); 6 - Burgess *et al.*, (2006); 7- Mehl *et al.*, (2011); 8- Machado *et al.*, (2014); 9- Abdollahzadeh *et al.*, (2010); 10- Begoude *et al.*, (2010); 11- Alves *et al.*, (2008); 12- Van der Walt *et al.*, (2009); 13- Dou *et al.*, (2017); 14- Phillips *et al.*, (2005); 15- Urbez-Torres *et al.*, (2012); 16- Inderbitzin *et al.*, (2010); 17- Pavlic *et al.*, (2008); 18- Sakalidis *et al.*, (2011); 19- Coutinho *et al.*, (2018); 20 - Luque *et al.*, (2005). Espécie com ^T, são as espécie tipo utilizado neste estudo. Os números de sequência em negrito são as espécies trabalhada neste estudo. Fonte: elaborada pelo autor.

3.3.5 Caracterização morfológica dos isolados

Foram mensuradas as dimensões (comprimento e largura) dos conídios das espécies pertencentes aos gêneros *Lasiodiplodia* (Botryosphaeriaceae) e *Pseudofusicoccum* (Pseudofusicoccumaceae) identificadas neste estudo. Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio BCA suplementado com acículas esterilizadas. As culturas foram incubadas a 27 °C, sob fotoperíodo de 12 horas de luz negra, durante um período de quatro semanas, com o objetivo de induzir a formação de picnídios e, conseqüentemente, o desenvolvimento de estruturas conidiogênicas.

Os corpos de frutificação foram removidos e rompidos manualmente com o auxílio de um bisturi e colocados em lâminas e corados com lactonenol e observados em microscópio. Foram feitas 30 medições de conídios e as outras características morfológicas como paráfises e células conidiogênicas não foram medidas. As imagens foram obtidas com uma câmera digital, ICc5 131 Axiocam, acoplada a um microscópio (Carl Zeiss AG Imager.A2 Ltd) e um dispositivo de imagem, Motic Image Plus 2.0 (Motic Group Co.).

3.4. RESULTADOS

3.4.1 Análises filogenéticas

Onze isolados de Botryosphaeriales extraído da castanha foram sequenciados para as regiões ITS (ITS1/ITS4), TEF-1 α (EF1-688F/EF1-1251R) e para β -tub (β t2a e β t2b). As análises filogenéticas dos isolados foram realizadas para a identificação do fungo a nível de espécie. Foi retirado do GenBank sequência de isolados de espécies tipo de Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae. Em seguida, foi realizado o alinhamento concatenado (Tabela 6). árvore filogenética mais parcimoniosa (comprimento = 389, IC = 0,609418, RI = 0,921053, RC = 0,587201) obtida a partir do conjunto de dados combinados de sequências ITS, EF e β tub do rDNA. As espécies do estudo foram agrupadas em 6 clados, sendo quatro do gênero *Lasiodiplodia*, um do gênero cophinforma, pertencentes a família Botryosphaeriaceae e um do gênero *Pseudofusicoccum*, pertencente à família Pseudofusicoccumaceae.

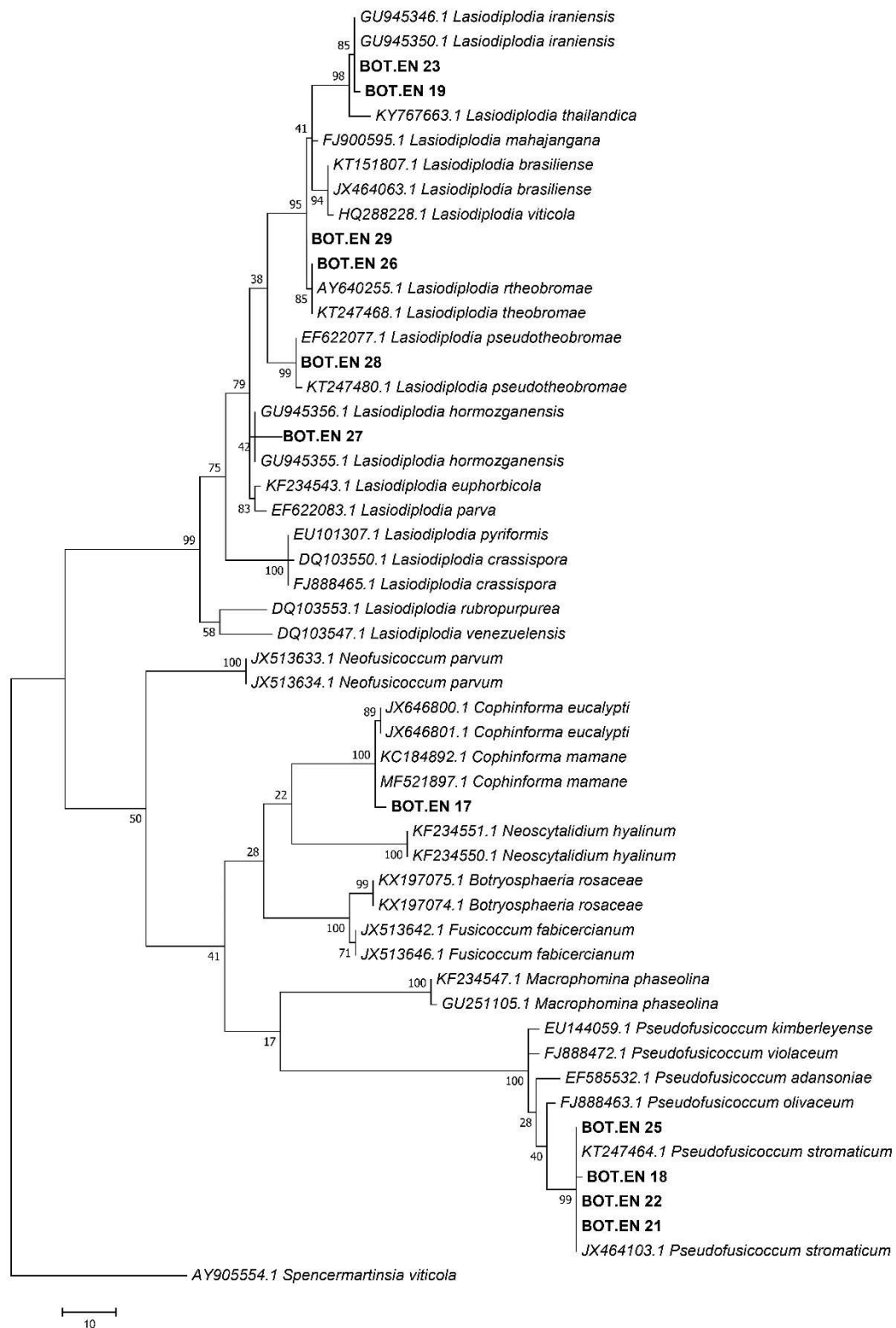


Figura 7 - Árvore filogenética inferida por máxima parcimônia (MP) de dados combinados das regiões genômicas ITS e EF e β -tub para espécies da família Botryosphaeriaceae e **Pseudofusicoccumaceae**. Os valores de bootstrap com 1000 repetições são mostrados nos nós. *S. viticola* foi usada como grupo externo. Os espécimes obtidos nesse estudo são destacadas em negrito

3.4.2 Caracterização morfológica dos isolados

Para o estudo morfológico dos isolados obtidos da castanha, foi realizado a medições dos conídios para isolados representantes das espécies identificadas no estudo, exceto para a espécies *L hormogonesis* e *Cophinforma mamane*, pois não esporularam. Os isolados foram *L. euphorbicola* (BOT.EN 27); *Lasiodiplodia. Iraniesis* (BOT.EN 23), *L. theobromae* (BOT.EN 26) e *P. stromaticum* (BOT. EN 22). Os fungos apresentaram um crescimento rápido em meio de cultura. Apresentando coloração inicialmente branca e com o passar do tempo sua coloração vai mudando para cinza escuro, verde ou preto de acordo com as espécies.

A presença de picnídio ocorreu, após 30 dias de incubação apresentando conídios de formato ovóides, hialinos quando jovens, tornando-se pigmentado quando envelhecem, paredes celulares espessas, com ápices arredondados apresentando um septo longitudinal para o gênero *Lasiodiplodia*. Para os fungos da família Pseudofusicoccumaceae apresentaram conídios de formato fusiforme hialino asseptados (Figura 8b). As medidas morfológicas das espécies estudadas, foram comparadas com as medidas morfológica das espécies originas descritas em literatura. As demais características morfológicas não foram encontradas.

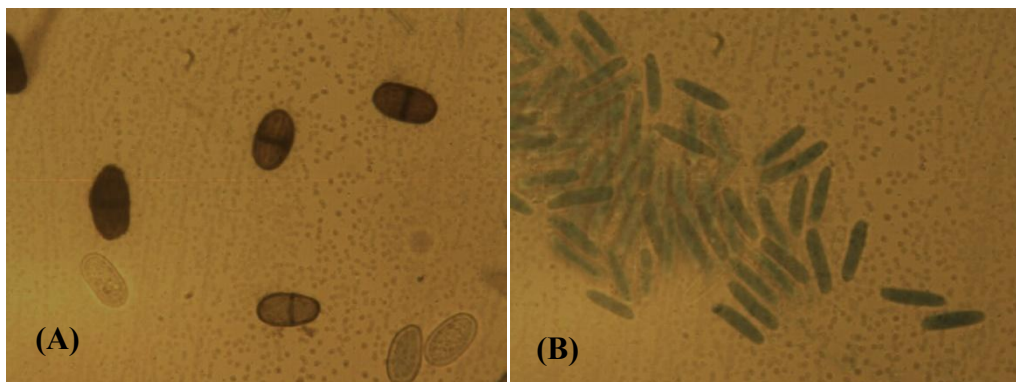


Figura 8 - Característica morfologia da conídios de fungos da família Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae. (A) *Lasiodiplodia hormozganensis*; (B) *Pseudofusicoccum stromaticum*, isoladas de castanha de caju. Fonte: elaborada pela autora.

Foram mensurados o comprimento e largura dos conídios de representante de todas as espécies identificadas nesse estudo, com exceção ao isolado da espécie com exceção de *Cophinforma mamane*. As medidas foram comparadas com as descrições morfológicas de cada espécie obtidas na literatura (Tabela 7). Todos os isolados produziram picnídios em meio BCA mais acículas, com 30 dias de incubação a 25 °C, com exposição a luz negra, com exceção do isolado da espécie *Cophinforma mamane*.

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 por Marques *et al.*, (2013b), em estudos no Brasil (Tabela 7)

Tabela 7 - Características morfológicas de conídios das espécies de Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae identificadas nesse estudo, em comparação com as descrições morfológicas originais de cada espécie.

Espécie	Conídios C x L (µm)	Razão C/L	Referências
<i>L. euphorbicola</i>	15–23 × 9–12		Machado et al. (2014)
BOT.EN 27	15,3-19,6 x 9,0-9,8	1,8	Isolado de estudo
<i>Lasiodiplodia. iranesis</i>	(15,3–) 20,7 (–29,7) × (11–) 13 (–14)	1.6	Abdollahzadeh <i>et al.</i> (2010)
BOT.EN 23	17,6-20,8 x 10,8-10,4	1,8	Isolado de estudo
<i>L. theobromae</i>	19.7–26.7 × 10.9–15.3	1.69	Coutinho <i>et al.</i> , 2017
BOT.EN 26	17,0-10,6 x 21,3-11,4	1,7	Isolado de estudo
<i>P. stromaticum</i>	(19–)20–23(–24) × 5,0 (4,0) 6,0	4	Mohali <i>et al.</i> 2006
BOT. EN 22	(13,6–) 16,4 (–18,4) × (3,7–) 4,4 (4,5)	3,9	Isolado de estudo

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

Fonte: elaborada pela autora

3.5 DISCUSSÃO

Foram observados a presença de fungos da família Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae nos três clones CCP76, BRS 265 e BRS226 de cajueiro estudados, sendo os gêneros *Lasiodiplodia*, *Cophinforma* (Botryosphaeriaceae) e *Pseudofusicoccum* (Pseudofusicoccumaceae) encontrados nesse estudo de acordo com as análises morfológica e filogenéticas. Este resultado indica o caráter endofítico deste grupo de fungos e sua afinidade

como o hospedeiro de se desenvolve em tecidos internos sem causar danos. Estudos anteriores reportaram a presença de *L.theobromae* em semente de cajueiro, graviola, sementes florestais e arbóreas (Dayan, 1986; Mittal e Wang 1987; Cilliers et al., 1993, Cardoso et al., 2006; Freire, 2014).

O clone CCP76, apresentou espécies pertencente tanto a família Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae sendo um total 50%, das sementes isolada; seguido do BRS226, que apresentou espécies das duas famílias em tudo, sendo um total de 37% das 100 das sementes estudadas e o clone BRS265, exibiu fungos somente da família Botryosphaeriaceae, sendo que 18% de sementes exibiram a presença deste grupo de fungos. Esse resultado pode ser explicado devido as sementes dos clones CCP76 e BRS226, terem sido colhidas em área que apresentavam alta incidência de doenças ocasionada por esses fungos. Onde as condições ambientais a qual as plantas estão submetidas são favoráveis para ocorrência de doenças por esse grupo de fungo. *Lasiodiplodia theobromae* foi relatado em sementes de graviola e sementes florestais (Cilliers et al., 1993; Cardoso et al., 2006).

Visando determinar o local específico do patógeno na semente, o estudo revelou um maior percentual de isolamento do fungo, ocorreu na parte interna da castanha (película e mesocarpo) do que no embrião. Entretanto, a presença do patógeno no endosperma confirma seu caráter endofítico, aumentando a importância da semente como veículo transmissor de Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae para aérea ainda não infectada.

As características morfológicas, filogenéticas dos isolados em estudo, revelaram ser as mesmas espécies já relatadas na literatura como fungos patogênicos de frutíferas de importância econômica e de outras plantas lenhosas. Esta ocorrência confirma os relatos feitos recentemente sobre a ocorrência destas espécies em tecidos assintomáticos em manga e cajueiro (Johnson et al., 1992; Cilliers et al., 1993; Cardoso et al., 2009).

A árvore filogenética (Figura 7), consegui dividir as duas famílias relatadas no estudo Botryosphaeriaceae (conídios ovóides) e Pseudofusicoccumaceae (conídios fusiformes), todos pertencentes a ordem Botryosphaeriales. Foram identificadas sete espécies de Botryosphaeriaceae isoladas das sementes, sendo seis do gênero *Lasiodiplodia* (*L. iraniensis*, *L. theobromae*, *L. hormozgonensis*, *L. pseudotheobromae*), e o gênero *Cophinforma* (*C. mamane*) e quatro espécies pertencente à família Pseudofusicoccumaceae (*Pseudofusicoccum stromaticum*).

A árvore foi composta por 52 táxons, compondo 13 clados com espécies de *Lasiodiplodia*, 2 clado de *Cophinforma*, um clado de *Neofusicoccum*, um clado de *Neoscytalidium*, um clado de *Botryosphaeria*, um clado *Fusicoccum*, um clado de *Macrophomina* e cinco clado de *Pseudofusicoccum*. Os isolados identificados nesse estudo se agruparam: com a espécie *Lasiodiplodia iraniensis* (BOT.EN 19 e BOT.EN 23), *Lasiodiplodia theobramae* (BOT.EN 26 e BOT.EN 29), *Lasiodiplodia pseudotheobramae* (BOT.EN 28), *Cophinforma mamane* (BOT.EN 17) e *Pseudofusicoccum stromaticum* (BOT.EN 18; BOT.EN 21; BOT.EN 22 e; BOT.EN 25), todos foram obtidos de sementes de cajueiro.

Estudos confirmam que a disseminação das Botryosphaeriaceae ocorre de forma horizontal, onde uma planta doente é capaz de infectar outras plantas próximas através de aberturas naturais ou por abertura ocasionado por pragas (Cysne *et al.*, 2010). Este estudo comprova que as esse grupo de fungo apresenta um alta transmissão vertical através da semente infectadas, podendo trazer severos problema no futuro, pois não são usadas medidas de quarentena para fungos endofítico, o que comprova a hipótese levantada por Cardoso *et al.*, (2009^a) e Cysne *et al.*, (2010), onde afirmam transmissão do patógeno pela muda, veiculada por sementes e/ou propágulos com infecção quiescente, sendo a infecção iniciada em função de estresse sofrido pela planta

Os fungos da família Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae conseguem sobreviver de forma endofítica na semente, dificultando assim o controle uma vez que for introduzida em uma nova área. As Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae apresentam alto percentual de transmissão vertical. Com base na morfologia e na filogenia, as espécies relatam neste estudo, são semelhantes como espécies relatados na literatura como fungos patogênicos de plantas lenhosas, caracterizando essas famílias como fungos endofíticos. Este é o primeiro relato sobre a ocorrência de espécies de Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae em semente de cajueiro.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo possibilitou um avanço significativo na compreensão da diversidade, comportamento ecológico e potencial patogênico de fungos endofíticos das famílias Botryosphaeriaceae e Pseudofusicoccumaceae associados ao cajueiro (*Anacardium occidentale*). A identificação dessas espécies em tecidos assintomáticos e em sementes evidencia que tais microrganismos estão amplamente disseminados na cultura e podem atuar como agentes patogênicos oportunistas, especialmente em condições de estresse.

As análises morfológicas e filogenéticas corroboraram a presença de isolados com elevada similaridade a espécies já descritas como patogênicas, o que reforça a importância do monitoramento e da correta identificação desses fungos em programas de manejo sanitário. A comprovação de transmissão vertical, via semente, amplia a relevância dos resultados, destacando a necessidade de estratégias de controle que considerem a fase inicial do ciclo da planta.

Este é o primeiro estudo a relatar a ocorrência e caracterização de fungos endofíticos dessas famílias na cultura do cajueiro, contribuindo com dados inéditos para a fitopatologia de frutíferas tropicais e abrindo perspectivas para futuras pesquisas, especialmente em relação à interação planta-microrganismo, aos mecanismos de transição do estado endofítico para o patogênico e ao desenvolvimento de materiais genéticos resistentes.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHZADEH, J. et al. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 25, n. 1, p. 1-10, 2010.
- ALVES, Artur et al. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. **Fungal diversity**, v. 28, n. 1, p. 1-13, 2008.
- BARROS, L. D. M et al. **Recomendações técnicas para a cultura do cajueiro anão precoce**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical-Circular Técnica, 1993.
- BEGOUDE, B. A. Didier et al. Botryosphaeriaceae associated with *Terminalia catappa* in cameroon, south africa and madagascar. **Mycological Progress**, v. 9, n. 1, p. 101-123, 2010.
- BEZERRA, M. A. et al. **Efeito da resinose na fotossíntese do cajueiro-anão precoce**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2003.
- BURGESS, Treena I. et al. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. **Mycologia**, v. 98, n. 3, p. 423-435, 2006.
- CARDOSO, J. E. et al. First Report of *Cophinforma atrovirens* causing stem rot and dieback of cashew plants in Brazil. **Plant Disease**, v. 103, n. 7, p. 1772-1772, 2019.
- CARDOSO, J. E. et al. **Transmissão de *Lasiodiplodia theobromae*, agente da resinose, em propágulos de cajueiro**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2009.
- CARDOSO, J. E. et al. **Deteção e controle de *Lasiodiplodia theobromae* em sementes de graviola (*Annona muricata* L.)**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 2006. 23p. (Documentos, 27)
- CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P. Impacto potencial das mudanças climáticas sobre as doenças do cajueiro no Brasil. In: GHINI, R.; HAMADA, E.; BETTIOL, W. (Eds.). **Impactos das mudanças climáticas sobre doenças de importantes culturas no Brasil**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2011. p.163-174.
- CARDOSO, J. E. et al. Ocorrência endofítica de *Lasiodiplodia theobromae* em tecidos de cajueiro e sua transmissão por propágulos. **Summa Phytopathologica**, v. 35, p. 262-266, 2009.

CILLIERS, A. J.; SWART, W. J.; WINGFIELD, M. J. A review of *Lasiodiplodia theobromae* with particular reference to its occurrence on coniferous seeds. **South African Forestry Journal**, v. 166, n. 1, p. 47-52, 1993.

COUTINHO, I. B. L. et al. Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. **Plant Pathology**, v. 66, n. 1, p. 90-104, 2017.

COUTINHO, I. B. L. et al. An emended description of *Neofusicoccum brasiliense* and characterization of *Neoscytalidium* and *Pseudofusicoccum* species associated with tropical fruit plants in northeastern Brazil. **Phytotaxa**, v. 358, n. 3, p. 251-264, 2018.

DAYAN, M. P. Fungi associated with different forest tree seeds of the Forest Research Institute seedbank. **Embryon**, v. 2, n. 1, 1986.

DOU, Z. P.; HE, W.; ZHANG, Y. Does morphology matter in taxonomy of *Lasiodiplodia*? An answer from *Lasiodiplodia hyalina* sp. nov. **Mycosphere** 8: 1014–1027 [em linha]. 2017.

FREIRE, F. D. C. O. Deterioração microbiológica de amêndoas de cajueiro: um problema de difícil solução. **Essentia-Revista de Cultura, Ciência e Tecnologia da UVA**, v. 15, n. 2, 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal**: Culturas temporárias e permanentes – PAM, 2018. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticasnovportal/economicas/agriculturapecuaria/9117producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html?&t=resultados>. Acesso em 28 jan. 2018.

INDERBITZIN, Patrik et al. A six locus phylogeny reveals high species diversity in *Botryosphaeriaceae* from California almond. **Mycologia**, v. 102, n. 6, p. 1350-1368, 2010.

JOHNSON, G. I. et al. Mango stem end rot pathogens-Fruit infection by endophytic colonisation of the inflorescence and pedicel. **Annals of Applied Biology**, v. 120, n. 2, p. 225-234, 1992.

LIMA, V. P. M. S. **A cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 1988. p. 301-319

LIU, Jian-Kui et al. Towards a natural classification of *Botryosphaeriales*. **Fungal Diversity**, v. 57, n. 1, p. 149-210, 2012.

LUQUE, Jordi; MARTOS, Soledad; PHILLIPS, Alan J. L. *Botryosphaeria viticola* sp. nov. on grapevines: a new species with a *Dothiorella* anamorph. **Mycologia**, v. 97, n. 5, p. 1111-1121, 2005.

MACHADO, A. R.; PINHO, D. B.; PEREIRA, O. L. Filogenia, identificação e patogenicidade das *Botryosphaeriaceae* associadas à podridão do colo e raiz da planta de biocombustível *Jatropha curcas* no Brasil, com descrição de novas espécies de *Lasiodiplodia*. **Diversidade de fungos**, v. 67, n. 1, 2014.

MARINHO, A. M. et al. Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 280-283, 2005.

MARQUES, Marília W. et al. Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, v. 61, n. 1, p. 181-193, 2013.

MEHL, James W. M et al. *Botryosphaeriaceae* associated with *Pterocarpus angolensis* (kiaat) in South Africa. **Mycologia**, v. 103, n. 3, p. 534-553, 2011.

MITTAL, R. K.; WANG, B. S. P. Fungi associated with seeds of eastern white pine and white spruce during cone processing and seed extraction. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 17, n. 9, p. 1026-1034, 1987.

MOREIRA, R. C. et al. Resistance to gummosis in wild cashew genotypes in northern Brazil. **Crop Protection**, v. 52, p. 10-13, 2013.

MOREIRA, R. C. et al. **Clones de Cajueiro-Comum à Resinose**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, (Boletim de pesquisa e desenvolvimento 58), 2012.

PAVLIC, Draginja et al. Seven new species of the *Botryosphaeriaceae* from baobab and other native trees in Western Australia. **Mycologia**, v. 100, n. 6, p. 851-866, 2008.

PETRINI, Orlando. Fungal endophytes of tree leaves. In: **Microbial ecology of leaves**. New York, NY: Springer New York, 1991. p. 179-197.

SAKALIDIS, Monique L. et al. Pathogenic *Botryosphaeriaceae* associated with *Mangifera indica* in the Kimberley region of Western Australia. **European journal of plant pathology**, v. 130, n. 3, p. 379-391, 2011.

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.

SMITH, H.; KEMP, G. H. J.; WINGFIELD, M. J. Canker and die-back of Eucalyptus in South Africa caused by Botryosphaeria dothidea. **Plant pathology**, v. 43, n. 6, p. 1031-1034, 1994.

STANOSZ, G. R. et al. Water stress and Sphaeropsissapinea as a latent pathogen of red pine seedlings. **New Phytologist**, v. 149, n. 3, p. 531-538, 2001.

URBEZ-TORRES, Jose Ramon et al. Characterization of fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Arkansas and Missouri. **Fungal diversity**, v. 52, n. 1, p. 169-189, 2012.

VAN DER WALT, F. J. J. **Botryosphaeriaceae associada a espécies nativas de Acacia no sul da África, com referência especial a A. mellifera**. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de Pretória.

VIANA, F. M. P. et al. Doenças do cajueiro. **Informe Agropecuário**, v. 37, n. 290, 2016.

ZHOU, Y. P. et al. Botryosphaeria rosaceae sp. nov. and B. ramosa, new botryosphaeriaceous taxa from China. **Mycosphere**, v. 8, n. 2, p. 162-171, 2017.