



GLENDIA FERNANDES SILVEIRA

**ESPÉCIES DE BOTRYOSPHAERIACEAE ASSOCIADAS À
MORTE DESCENDENTE EM JAMBEIRO**

**TERESINA - PI
2017**

GLENDIA FERNANDES SILVEIRA

**ESPÉCIES DE BOTRYOSPHAERIACEAE ASSOCIADAS À MORTE DESCENDENTE EM
JAMBEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, para a obtenção do Título de Mestre em Agronomia, área de concentração: Agricultura Tropical.

Orientador

Prof. Dr. José Evando Aguiar Beserra Júnior

Coorientador

Dr. Maruzanete Pereira de Melo

**TERESINA - PI
2017**

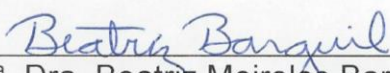
GLEND A FERNANDES SILVEIRA

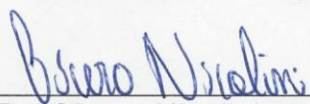
ESPÉCIES DE BOTRYOSPHAERIAE ASSOCIADAS À MORTE
DESCENDENTE EM JAMBEIRO

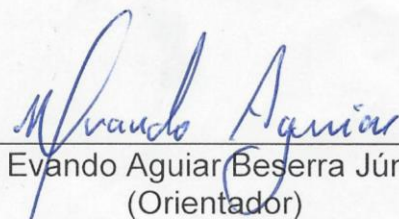
Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Agricultura Tropical, para obtenção do título de Mestre em Ciências com área de concentração em Agricultura Tropical.


APROVADA em 20 de fevereiro de 2017.

Comissão Julgadora:


Prof^a. Dra. Beatriz Meireles Barguil – UESPI


Prof. Dr. Cícero Nicolini – UESPI


Prof. Dr. José Evando Aguiar Beserra Júnior – CCA/UFPI
(Orientador)


Dr. Maruzanete Pereira de Melo – PNP/UFPI
(Coorientador)

TERESINA-PI

2017

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

S587e Silveira, Glenda Fernandes

Espécies de botryosphaeiraceae associadas à morte descendente em jameiro / Glenda Fernandes Silveira - 2017.
50 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.

Orientação: Prof. Dr. José Evando Aguiar Beserra Júnior

1. Fungos endofíticos 2. *Syzygium malaccense* L., 3. Teste de patogenicidade I. Título

CDD 579

AGRADECIMENTOS

Primeiramente Deus por seu amor eterno e incondicional, por sempre guiar meus passos e possibilitar todas as minhas conquistas, à toda minha família em especial aos meus pais Osiel Fernandes de Sousa e Maria Silveira Lima por todo o amor e exemplo de dedicação, caráter e perseverança.

Ao professor José Evando Aguiar Beserra Júnior por toda paciência e por todos os ensinamentos.

À Universidade Federal do Piauí (UFPI) e ao Centro de Ciências Agrárias e em especial ao Departamento de Fitotecnia, pelo apoio institucional.

Ao Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar da UFPI (PMGCA-UFPI) por toda a estrutura física disponibilizada que foi essencial para o desenvolvimento do presente trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Agricultura Tropical, pelos conhecimentos transmitidos.

Sinceros agradecimentos à Maruzanete.

A todos os amigos da turma pelos momentos compartilhados, em especial para Welder Silva, Janaína Mendes, Antônio Neto, Ana Tereza, Marcos Vinicius, Edvaldo.

Aos amigos Jayara Silva, Mynor Garcia, Raquel Veras, Gerusa, Miguel, Renato Feitoza, Kelvin Texeira, Diego Viana, Antônia Daniela, Enayra, Emanuele, Abel Borges pela atenção em momentos especiais;

As funcionárias Marta e Antônia;

Por fim, a todos os que de alguma forma fizeram parte desta conquista.

RESUMO

O jameiro é uma espécie lenhosa utilizada como frutífera ou planta ornamental, cultivada principalmente nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Inúmeras doenças de plantas lenhosas estão associadas a fungos da família Botryosphaeriaceae, as quais geralmente são favorecidas por condições de estresse. Dentre essas doenças encontra-se a morte descendente, que se caracteriza por murcha de ramos terminais e laterais, declínio e posterior morte da árvore. Na cidade de Teresina-PI, elevada incidência da morte descendente vem sendo observada em jameiros utilizados na ornamentação de ruas. Visando identificar o agente causal dessa doença, este estudo teve como objetivo identificar espécies de Botryosphaeriaceae associadas a morte descendente em jameiro, utilizando características morfológicas e moleculares, e realizar teste de patogenicidade. Foram realizadas coletas nos municípios de Teresina (PI) e São Domingos do Azeitão (MA). Isolados foram obtidos e preservados, além de terem o DNA extraído e as regiões TEF-1 α e ITS amplificadas por PCR e sequenciadas. Com base nos caracteres morfológicos e filogenéticos os isolados foram identificados como *Lasiodiplodia theobromae* e *Pseudofusicoccum stromaticum*, os quais agruparam com isolados referência. Os isolados foram patogênicos ao jameiro e todas as plantas inoculadas apresentaram sintomas semelhantes àqueles observados em plantas naturalmente infectadas no campo. Os fungos foram reisolados de todas as frutíferas inoculadas, completando os Postulados de Koch. Este é o primeiro relato de *L. theobromae* e *P. stromaticum* causando morte descendente em jameiro no Brasil.

Palavras-chaves: fungos endofíticos, *Syzygium malaccense* L., teste de patogenicidade.

ABSTRACT

Malay apple tree is a woody species used as a fruit tree or ornamental plant, cultivated mainly in the North and Northeast of Brazil. Countless woody plants diseases are associated with Botryosphaeriaceae family fungi, which are generally incited by stress conditions. Among these diseases is the dieback, characterized by wilting of terminal and lateral branches, decline and later death of the tree. In the city of Teresina, PI, a high incidence of dieback has been observed in Malay apple trees used in the ornamentation of streets. In order to identify the causal agent of this disease, this study aimed to identify Botryosphaeriaceae species associated with dieback in Malay apple tree, using morphological and molecular characteristics, and to perform pathogenicity test. Samples were collected in the counties of Teresina, PI and São Domingos do Azeitão, MA. Isolates were obtained and preserved, in addition to having the DNA extracted and the regions TEF-1 α and ITS amplified by PCR and sequenced. Based on the morphological and phylogenetic characters the isolates were identified as *Lasiodiplodia theobromae* and *Pseudofusicoccum stromaticum*, grouping with reference isolates with high Bayesian posterior probability. The isolates were pathogenic to the Malay apple seedlings and all inoculated plants presented symptoms similar to those observed in naturally infected plants in the field. The fungi were reisolated from all inoculated plants, completing the Koch Postulates. This is the first report of *L. theobromae* and *P. stromaticum* causing dieback in Malay apple tree in Brazil.

Key words: endophytic fungi, *Syzygium malaccense* L., pathogenicity test.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. A e B- Morte descendentes em Jambeiro vermelho (*Syzygium malaccense*); C- Muda de jambeiro inoculada, apresentando seca dos ponteiros; D: Presença de escurecimento do lenho em jambeiro inoculado; E- Muda de manga inoculada, sintomática à esquerda e muda de manga controle, assintomática à direita; F- Muda de goiaba inoculada, sintomática à esquerda e muda de goiaba controle, assintomática à direita.....29
- Figura 2. Colônias dos isolados CMM3314 (A) e CMM3315 (B) crescidas em meio de cultura batata-dextrose-ágar aos 15 dias de incubação no escuro com temperatura de 28 °C.....31
- Figura 3. A. Colônia do isolado CMM3314 com desenvolvimento de primórdios picnidiais; B. Conídios jovens e em fase de maturação do isolado CMM3314; C. Picnídio do isolado CMM3314; D. Picnídio do isolado CMM3315 e E. Conídios do isolado CMM3315.....33
- Figura 4. Mangas cv. Tommy Atkins, após seis dias de inoculação, com isolados da família Botryosphaeriaceae obtidos de jambeiro (*Syzygium malaccense* L.). A. Fruto controle não-inoculado; B. Fruto inoculado com o isolado CMM3315; C. Fruto inoculado com o isolado CMM3314.....36
- Figura 5. Árvore filogenética construída por Inferência Bayesiana de sequências das regiões ITS-5.8S rDNA e TEF-1 α mostrando a relação filogenética entre espécies de Botryosphaeriaceae. Os valores de probabilidade *a posteriori* estão representados nos entroncamentos da figura. O isolado utilizado neste estudo está em vermelho. *Dilodia mutila* e *Diplodia seriata* foram utilizadas como as espécies outgrup.....39
- Figura 6. Árvore filogenética construída por Inferência Bayesiana de sequências das regiões ITS-5.8S rDNA e TEF-1 α mostrando a relação filogenética entre espécies de Botryosphaeriaceae. Os valores de probabilidade *a posteriori* estão representados nos entroncamentos da figura. O isolado utilizado neste estudo está destacado em vermelho. *Botryosphaeria dothidea* foi utilizada como a espécie outgrup.....40

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Dimensões e razão comprimento/largura (C/L) de conídios de isolados obtidos de jameiro vermelho (*Syzygium malaccense* L.) causadores da morte descendente, em comparação com isolados obtidos de outras espécies de Botryosphaericeae citadas na literatura. Teresina, PI, 2017.....32
- Tabela 2. Percentual médio de mudas sintomáticas de quatro espécies hospedeiras após inoculação com os fungos da família Botryosphaeriaceae (isolados CMM3314 e CMM3315) obtidos de jameiro vermelho (*Syzygium malaccense* L.). Teresina, PI, 2017.....34
- Tabela 3. Patogenicidade em frutos de manga inoculados com isolados da família Botryosphaeriaceae obtidos de jameiro (*Syzygium malaccense* L.) Teresina, PI, 2017.....36
- Tabela 4. Isolados utilizados para a construção da árvore filogenética, com seus respectivos hospedeiros, localizações de isolamento, coletores das amostras e código de acesso as sequências ITS e TEF-1 α no bando de dados do Genbank. Teresina, Piauí, 2017.....39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2.1 Jambeiro.....	13
2.2 Botryosphaeriaceae endofíticos	14
2.3 Família Botryosphaeriaceae	17
2.3.1 Aspectos gerais	17
2.3.2 Taxonomia da família Botryosphaeriaceae	19
2.4 Morte descendente.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Coleta e obtenção dos isolados	23
3.2 Caracterização morfocultural	23
3.3 Patogenicidade em plantas.....	24
3.4 Patogenicidade em frutos de manga.....	25
3.5 Análise filogenética.....	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 Quadro sintomatológico da morte descendente em jambeiro	28
4.2 Caracterização morfocultural	29
4.3 Patogenicidade em plantas.....	32
4.4 Patogenicidade em frutos de manga.....	34
4.5 Análise filogenética.....	35
5 CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

O jameiro (*Syzygium malaccense* L.) é uma árvore pertencente à família Myrtaceae, tendo como centro de origem o continente Asiático (VIEIRA et al., 2004). A espécie é apreciada para fins ornamentais ou como produtora de frutas, e sua madeira é usada para a produção de lenha, podendo ainda ser utilizada como quebra-vento (CARVALHO, 2005). No Brasil é encontrado nas regiões Norte, Nordeste e parte do Sudeste (LIMBERGER et al., 2004). A maioria dos trabalhos científicos realizados com a espécie concentra-se na utilização de partes da planta para fins farmacológicos, faltando na literatura estudos sobre seus caracteres agrônômicos e doenças que acometem a cultura (CERQUEIRA, 2002; DE OLIVEIRA; DIAS, 2005).

Diversas doenças de plantas lenhosas das mirtáceas estão associadas a espécies de fungos da família Botryosphaeriaceae (VAN DER VLUGT, 2008). Nessa família são encontrados muitos gêneros que possuem espécies relatadas como endófitos de plantas, tendo destaque os gêneros *Neofusicoccum*, *Pseudofusicoccum*, *Lasiodiplodia*, *Diplodia*, *Fusicoccum* e *Dothiorella*. No entanto, pela importância e por razões econômicas esses fungos são principalmente estudados e descritos por seus papéis como fitopatógenos (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007). Em estudo de fungos da família Botryosphaeriaceae em plantas nativas de *Syzygium cordatum*, na África do Sul, foi identificada uma nova espécie em associação endofítica, *Lasiodiplodia gonubiensis*. O fungo é filogeneticamente relacionado com *Lasiodiplodia theobromae*, importante patógeno associado a eucalipto na mesma região, sendo, portanto, um possível patógeno latente para *S. cordatum* (PAVLIC et al., 2004).

A expressão da fase patogênica de Botryosphaeriaceae comumente está associada a alguma condição de estresse, como aumento de temperatura, estresse hídrico, ataque por insetos ou patógenos. Condições essas que podem ocasionar grandes perdas caso se apresentem por um período de tempo prolongado. Esses fungos geralmente incitam nas plantas infectadas diversos sintomas como cancrios, manchas foliares, podridões de colo em mudas, seca de brotos, gomose, podridão de frutos e morte descendente (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007).

A morte descendente caracteriza-se por causar murcha de ramos terminais e laterais, com desenvolvimento unilateral, escurecimento do sistema vascular, declínio e posterior morte da planta (PLOETZ et al., 2009a). A doença já é relatada em muitas espécies lenhosas, como é o caso do eucalipto (*Eucalyptus globulus*) e em inúmeras frutíferas tais como mangueira (*Mangifera indica* L.), aceroleira (*Malpighia glabra* L.), goiabeira (*Psidium guajava* L.), mamoeiro (*Carica papaya* L.) entre outras de importância econômica (VAN DER VLUGT, 2008; COSTA et al., 2010; MACHADO; PINHO; PEREIRA, 2014).

No nordeste brasileiro, doenças causadas em diversas espécies de frutíferas por *Lasiodiplodia* spp. são de grande importância, ocorrendo um aumento no número de espécies fúngicas descritas devido o incremento da utilização de sequenciamento de DNA de genes housekeeping, tendo principalmente *L. theobromae* como a espécie mais frequentemente associada ao patossistema (COUTINHO et al., 2016; CORREIA et al., 2015; NETTO et al., 2016, 2014).

Devido a importância dos fungos botriosferiáceos, e o grande número de espécies vegetais com as quais estão associados, as pesquisas envolvendo a identificação e caracterização de patossistemas ainda são relativamente pequenas, isso revela a necessidade na identificação de espécies, conhecimento sobre a etiologia e sintomatologia e as relações com os seus hospedeiros. .

Estudos revelam que há um aumento na descrição do número de hospedeiros e na severidade dos sintomas de espécies de Botryosphaeriaceae, podendo ser decorrente de pressões ambientais, como observado em regiões semiáridas (FREIRE et al., 2004). No estado do Piauí, inclusive na capital Teresina, nota-se a elevada incidência da morte descendente, de causa desconhecida, ocorrendo em jambeiros. Devido ao exposto este estudo teve como objetivos realizar a caracterização morfocultural, análise filogenética e avaliar a patogenicidade de isolados de Botryosphaeriaceas associados a morte descendente em jambeiro. Adicionalmente foi avaliada a patogenicidade dos isolados em outras espécies de frutíferas, além de frutos de mangueira.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Jambeiro

O jambeiro vermelho (*Syzygium malaccense* L.) é uma espécie arbórea, pertencente à família Myrtaceae que compreende cerca de 80 gêneros com aproximadamente 3.000 espécies, amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (VIEIRA et al., 2004). No Brasil é geralmente encontrado nas regiões Norte, Nordeste e nas regiões quentes do Sudeste (LIMBERGER et al., 2004).

A família Myrtaceae é dividida em duas sub-famílias: Myrtoideae, principalmente encontrada na América do Sul e Central, tendo seus frutos do tipo baga e folhas opostas; e Leptospermoideae, com maior distribuição na Austrália, apresentando frutos do tipo cápsula ou núculas e folhas alternadas ou opostas. O gênero *Syzygium*, assim como todas as espécies de mirtáceas nativas do Brasil, pertence a subfamília Myrtoideae (LIMBERGER et al., 2004).

Cerca de 500 espécies compõem o gênero *Syzygium*, considerado um dos maiores da família Myrtaceae. Dentre essas espécies, cerca de 400 são encontradas no Brasil (DE OLIVEIRA; DIAS, 2005), algumas com alto valor de apreciação como a jabuticabeira (*S. Edulis* Vell.), o jambeiro, a pintangueira (*S. uniflora* L.), o jabolão (*S. jabolana* Lam.) e o cravo da Índia (*S. caryophyllata* Thunb.). Geralmente espécies de *Syzygium* são cultivadas devido a seus frutos comestíveis e por sua finalidade ornamental, sendo utilizada no paisagismo (FALCÃO; PARALUPPI; CLEMENT, 2002).

O jambeiro é uma árvore originária da Ásia tropical, mais precisamente no leste da Índia e Malásia, considerada uma espécie arbórea de grande porte. Mede cerca de 12 m de altura, possui folhas dispostas aos pares, a frutificação se dá três meses após a floração, o que resulta em frutos carnosos que podem atingir mais de 4 cm de comprimento. As sementes são poliembrionárias, podendo gerar até oito plantas (CARVALHO, 2005).

O jambeiro caracteriza-se por ser uma espécie sempre verde, com alta resistência ao vento, que o torna muito utilizado como quebra-vento. Sua madeira pode ser utilizada como lenha, o que contribui para sua ampla disseminação pelo mundo; podendo ser usada também na construção civil, na extração de tanino e

confeção de artesanato. Os frutos são utilizados na alimentação, na forma *in natura* ou na produção de doces e geleias. Em algumas regiões suas sementes e raízes são usadas na medicina popular, no tratamento de processos inflamatórios, febre, coceira, diabetes, tosse, dores de cabeça e como diurético (DUNSTAN et al., 1997; NOREEN et al., 1998). Devido à forma piramidal de sua copa e suas flores avermelhadas, é frequentemente cultivada como planta ornamental (FALCÃO; PARALUPPI; CLEMENT, 2002). Extratos oriundos de folhas e sementes da planta apresentam atividade fungicida contra *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. associados a cultura do café (*Coffea canephora* L.) (SALLET; TEIXEIRA, 2007).

Em associação com o gênero *Syzygium* algumas espécies fúngicas já foram relatadas: *Lasiodiplodia gonubiensis* foi isolada de forma endofítica de plantas de *Syzygium cordatum* na África do Sul. Na Tailândia *Pestalotiopsis samarangensis* foi descrito como patógeno de frutos de *Syzygium samarangense*. *Pestalotiopsis eugeniae*, *Phytophthora palmivora*, *Dothiorella* sp., *Pseudocercospora* sp. também já foram associadas a podridões de frutos, além de *Fusarium* sp. associado a morte descendente de ramos e *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2013; JANICK; PAULL, 2008; PAVLIC et al., 2004; LAN, 2001). No Brasil ainda não existe registro de fungos fitopatogênicos associados ao jambaí.

2.2 Botryosphaeriaceae endofíticos

Microorganismos endofíticos foram mencionados na literatura científica pela primeira vez no início do século XIX, porém somente no final dos anos 1970 deixaram de ser considerados como simples habitantes do interior de vegetais e passaram a ser vistos como possíveis patógenos latentes, influenciados pelas condições ambientais e estado fisiológico do próprio hospedeiro. Conseqüentemente, foi levantada a hipótese de que o desenvolvimento da patogênese seja derivada da condição endofítica ou vice-versa (AZEVEDO, 1998).

São muitas as definições encontradas para endófitos na literatura, a mais recente afirma que endófitos são microrganismos que podem ou não crescer em meios de cultura e que colonizam o interior de tecidos e órgãos vegetais, de forma assintomática, sem causar prejuízos ao seu hospedeiro e sem produzir estruturas externas emergindo dos vegetais (HYDE; SOYTONG, 2008). Os microrganismos

endófitos podem passar todo, ou boa parte do seu ciclo de vida no interior da planta hospedeira e não lhe causar sintomas aparentes de doenças. A colonização por estes fungos no interior do vegetal pode ser inter ou intracelular, localizada ou sistêmica (SCHULZ; BOYLE, 2005).

Em todas as plantas estudadas foi constatada a presença de microrganismos endofíticos, alguns demonstrando especificidade de hospedeiro e outros colonizando uma ampla gama de espécies vegetais (KRIEL; SWART; CROUS, 2000). A colonização dos tecidos vegetais por esses fungos pode ocorrer de duas maneiras: por transmissão horizontal, ocorrendo penetração de esporos por ferimentos resultantes de causas bióticas ou abióticas, como ação de insetos e ferimentos causados por injúrias mecânicas e podas, por aberturas naturais nas partes aéreas das plantas, ocorrendo na maioria das espécies lenhosas; ou por transmissão vertical, comum em gramíneas, através de sementes ou propágulos vegetativos oriundos de plantas hospedeiras infectadas (SAIKKONEN et al., 2004; MARINHO et al., 2005; JOHRI, 2006).

A distinção entre microrganismos endofíticos, epifíticos (aqueles que habitam a superfície dos tecidos e órgãos vegetais) e patogênicos (aqueles que causam doenças nas plantas) muitas vezes é bastante difícil, devido a capacidade que alguns microrganismos tem de atuarem em mais de um desses grupos em seus diferentes estágios de vida (AZEVEDO, 1998). Muitos endófitos são considerados patógenos latentes, e por terem co-evoluído com seus hospedeiros apresentam baixa virulência (PHOTITA et al., 2004; SIEBER, 2007; SLIPPERS; WINGFIELD, 2007). O aumento da virulência desses fitopatógenos pode ser resultado de alterações fisiológicas do hospedeiro devido à atividade do próprio fungo, ou de alterações ambientais que aumentam a pressão sobre a planta, causando assim um desequilíbrio na interação endófito-planta (PHOTITA et al., 2004).

A infecção por endófitos em plantas pode evoluir para a fase patogênica e, conseqüentemente, causar sintomas, o que vem sendo demonstrado em inúmeros patossistemas. Como exemplo tem-se muitos fungos da família Botryosphaeriaceae que, isolados de plantas assintomáticas, quando inoculados em seus próprios hospedeiros ou em plantas de outras espécies agem como patógenos agressivos (PAVLIC et al., 2007). Como foi demonstrado com fungos endofíticos isolados de banana selvagem (*Musa acuminata* Colla.), quando inoculados artificialmente em folhas de bananeiras saudáveis se mostraram patogênicos (PHOTITA et al., 2004).

Em 1980, fungos da família Botryosphaeriaceae foram reconhecidos como fungos endofíticos, sendo normalmente isolados de partes de plantas saudáveis. No entanto, poucos estudos com esses fungos têm sido realizados, subestimando o papel fundamental destas infecções na epidemiologia das doenças. Devido a capacidade desses fungos conviver com seus hospedeiros sem que estes demonstrem sintomas da colonização, faz com que passem despercebidos em estratégias de controle como medidas de quarentena (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007).

Todas as partes das plantas podem ser infectadas por fungos botriosferáceos, desde o xilema, ramos, folhas, flores, frutos e até sementes, permanecendo os fungos em infecções latentes por longos períodos (KIM et al., 2001; LUPO; TISCORNIA; BETTUCCI, 2001; PHOTITA et al., 2004; GONÇALVES et al., 2015). A infecção de sementes vem sendo relatada, porém há a necessidade de estudos mais aprofundados sobre a importância da transmissão vertical desses fungos, que pode resultar em infecções sistêmicas, e sobre sementes portadoras de infecções latentes como meios de dispersão desses fungos para áreas isentas do patógeno (BURGESS; WINGFIELD; WINGFIELD, 2004; SLIPPERS; WINGFIELD, 2007).

No Brasil, infecção de sementes de gravioleira por *Lasiodiplodia theobromae* oriundas de plantas saudáveis e com sintomas de podridão seca e de morte descendente foi demonstrada no estado do Ceará (CARDOSO et al., 2006), sendo encontrado percentual de transmissão de 50 a 100% para aquelas obtidas de frutos de plantas infectadas (CARDOSO; FREIRE, 2002). Infecções em frutas por espécies de Botryosphaeriaceae também são frequentes, resultando em podridões pós-colheita, doenças que podem causar grandes perdas nas regiões produtoras de frutas, como ocorre na cultura da manga nas áreas produtoras do submédio do vale do São Francisco, onde tem sido notada alta frequência de frutos com sintomas decorrentes dos gêneros *Fusicoccum* e *Neofusicoccum* (COSTA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2008). As frutas podem ser infectadas endofiticamente no princípio do seu desenvolvimento e só apresentar sintomas da doença durante o período de maturação ou de armazenagem, quando os níveis de açúcar solúveis são elevados (PARKER; SUTTON, 1993).

A relação endófito-planta pode apresentar caráter transitório, a estabilidade da colonização assintomática resulta de um conjunto de fatores determinantes como variabilidade do endófito, grau de virulência, suscetibilidade do hospedeiro,

condições ambientais, que interferem na consolidação do triângulo da doença (SCHULZ; BOYLE, 2005). Não excluindo um fungo que tenha sido isolado como endófito de se apresentar como patógeno quando um dos fatores mencionados estiver em desequilíbrio (KULDAU; YATES, 2000).

As condições ambientais e climáticas podem afetar a interação endófito-planta, contribuindo para o desenvolvimento da doença, pois essas mudanças podem adicionar estresse e pressão biológica de fungos sobre as plantas e resultar em sintomas graves de doenças e acarretar perdas elevadas caso as condições perdurem por grande intervalo de tempo (DESPREZ-LOUSTAU et al., 2006).

2.3 Família Botryosphaeriaceae

2.3.1 Aspectos gerais

A família Botryosphaeriaceae pertence ao Domínio Eukarya; Reino Fungi; Filo Ascomycota; Classe Dothideomycetes e Ordem Botryosphaeriales (SCHOCH et al., 2006). Seus membros são diferenciados por caracteres morfológicos e moleculares em 17 gêneros e cerca de 110 espécies.

Espécies de Botryosphaeriaceae apresentam distribuição mundial, sendo encontradas em quase todas as regiões geográficas e climas do mundo, exceto em regiões polares, infectando plantas de diversos grupos (PHILLIPS et al., 2013), dentre elas plantas de interesse agrônomo, florestal e ornamental (CROUS et al., 2006). A relação desses fungos com seus hospedeiros pode se apresentar de forma endofítica, colonizando os tecidos internos do vegetal sem provocar danos; de forma patogênica, desencadeada por alguma condição de estresse como, por exemplo, elevação da temperatura, ocorrendo tanto em espécies lenhosas quanto em plantas herbáceas (PHILLIPS et al., 2013). Exemplo disso ocorreu na Flórida (EUA), onde sintomas externos e internos de seca descendente em *Syzygium paniculatum*, causado por *Neofusicoccum parvum*, aumentaram significativamente à medida que a temperatura foi elevada (PLOETZ et al., 2009a).

O processo de infecção e colonização por espécies de Botryosphaeriaceae em seus hospedeiros lenhosos dá-se principalmente por transmissão horizontal, através de esporos, podendo o fungo infectar a planta por meio de aberturas naturais ou ferimentos (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007). A capacidade desses

fungos de conviver como endófitos em plantas assintomáticas por longos períodos de tempo, os tornam séria ameaça para a agricultura, pois plantas assintomáticas infectadas servem de fonte de inóculo para outras plantas. Preocupante também é a capacidade de movimento horizontal do fungo de hospedeiros nativos e introduzidos, para hospedeiros cultivados. Testes de patogenicidade realizados com espécies de Botryosphaeriaceae isoladas de plantas nativas e exóticas do Bioma Caatinga, no estado do Ceará, demonstraram que todas as seis espécies estudadas, *L. theobromae*, *L. gonubiensis*, *Pseudofusicoccum stomaticum*, *P. adansoniae*, *Neofusicoccum parvum/ribis* e *Botryosphaeria mamane* foram capazes de infectar ramos de umbu-cajá (*Spondias* sp.) (GONÇALVES et al., 2015).

Na África do Sul também foi relatada a capacidade de espécies isoladas de *Syzygium cordatum* Hochst. assintomáticas, de causar doença quando inoculadas artificialmente no hospedeiro original sadio e no clone *Eucaliptus grandis* x *camaldulensis*, confirmando assim que espécies de Botryosphaeriaceae isoladas de plantas sadias quando inoculadas artificialmente podem agir como patógenos agressivos (PAVLIC et al., 2007).

A patogenicidade de espécies de Botryosphaeriaceae está intimamente ligada a algum tipo de condição de estresse ou de crescimento não ideal de plantas (BLODGETT; KRUGER; STANOSZ, 1997; MA; MORGAN; MICHAILIDES, 2001; STANOSZ et al., 2001). Esses fatores podem, em conjunto com a pressão biológica dos patógenos, favorecerem o desenvolvimento de doenças, sendo responsáveis por incitar em plantas infectadas sintomas como a morte descendente de ramos e galhos, cancos, gomose, podridões pedunculares em frutos, morte de plantas jovens, adultas e porta-enxertos, além de se apresentarem como patógenos importantes de sementes (DESPREZ-LOUSTAU et al., 2006; SLIPPERS; WINGFIELD, 2007; ZHAI et al., 2014).

Nos últimos anos a patogenicidade de espécies de Botryosphaeriaceae tem aumentado significativamente em viveiros de frutíferas e plantas ornamentais, que tem sofrido com sérias infecções. Membros dessa família estão comumente associados à podridão peduncular de diversos frutos tais como abacate, goiaba, manga e caju. A podridão de estacas de roseiras, devido a perda da capacidade de enraizamento, também é associada a esses fungos, principalmente, à *L. theobromae* (FREIRE; VIANA, 2007).

2.3.2 Taxonomia da família Botryosphaeriaceae

A taxonomia e a identificação de gêneros e espécies de Botryosphaeriaceae vêm passando por inúmeras mudanças (CROUS et al., 2006). Por muito tempo os membros dessa família eram identificados com base em marcadores morfológicos da fase assexuada ou anamórfica. Porém, a grande variabilidade de seus anamorfos, facilmente influenciados pelas condições de cultivo e estágios de vida, contribui para dificultar a taxonomia desses fungos (SLIPPERS et al., 2004; CROUS et al., 2006; SCHOCH et al., 2006; PHILLIPS et al., 2013).

Os caracteres morfológicos de valor taxonômico utilizados para a identificação são: tamanho, forma, cor, septação e espessura da parede celular dos conídios, presença de paráfises, células conidiogênicas e formato de picnídios (CROUS et al., 2006; SCHOCH et al., 2006; SLIPPERS; WINGFIELD, 2007; PHILLIPS et al., 2013). Na presença da fase sexual, formato e dimensões de ascos e ascósporos juntamente com os caracteres mencionados anteriormente auxiliam na identificação (CROUS et al., 2006; SCHOCH et al., 2006; PHILLIPS et al., 2013). Não é raro que espécies distintas apresentem marcadores morfológicos semelhantes, ou até mesmo iguais, como é o caso de espécies do gênero *Botryosphaeria* quando se leva em consideração o tamanho dos conídios (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007).

A morfologia da colônia e o crescimento micelial são aspectos culturais que também auxiliam na identificação de espécies de Botryosphaeriaceae, no entanto com um valor limitado devido à grande variabilidade desses caracteres entre isolados de uma mesma espécie (ABDOLLAHZADEH et al., 2010). Outro aspecto utilizado na caracterização de Botryosphaeriaceae é a especificidade hospedeira, porém, também com valor secundário e de baixo nível de confiabilidade devido a capacidade de alguns desses fungos infectarem uma ampla gama de hospedeiros (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007).

A grande variabilidade entre os membros da família Botryosphaeriaceae, torna os caracteres morfológicos e culturais insuficientes para uma identificação precisa, necessitando de ferramentas mais robustas, como é o caso da aplicação da reação em cadeia da polimerase, PCR, sequenciamento e análises filogenéticas de genes "housekeeping" (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007; ALVES et al., 2008; PHILLIPS et al., 2008; URBEZ-TORRES et al., 2008).

O gênero *Botryosphaeria* Ces. & De Not passou por várias mudanças e revisões taxonômicas (PHILLIPS et al., 2005; CROUS et al., 2006; DAMM; CROUS, 2007). Apresenta espécies muito semelhantes morfológicamente, dificultando a identificação usando esses caracteres, sendo diferenciadas quase que somente nas dimensões de seus ascósporos ou conídios. Por se mostrarem muito semelhantes às espécies do gênero *Neofusicoccum* faz-se necessário a aplicação de técnicas moleculares para a diferenciação entre os dois gêneros (CROUS et al., 2006; PHILLIPS et al., 2013).

Para o gênero *Pseudofusicoccum* as espécies diferenciam-se morfológicamente principalmente pelas dimensões de seus conídios e pela produção de pigmentos quando cultivados em meio de cultura (PHILLIPS et al., 2013). Os gêneros *Lasiodiplodia* e *Neocystaldium* apresentam conídios hialinos quando jovens, tornando-se marrons quando atingem a fase de maturação. Sendo suas espécies diferenciadas morfológicamente devido ao tamanho dos conídios, paráfises e células conidiogênicas. Também apresentando diferenças nas regiões gênicas do DNA, que possibilitam a diferenciação por meio do sequenciamento (PHILLIPS et al., 2013).

Os métodos moleculares estão sendo empregados para a identificação de Botryosphaeriaceae revelando relações filogenéticas entre espécies. A utilização de ferramentas de sequenciamento do DNA possibilita a identificação de novas espécies e gêneros em associação com os mais variados hospedeiros, localizações geográficas e condições ambientais (PHILLIPS et al., 2013; SAKALIDIS, 2013; SLIPPERS; WINGFIELD, 2007). A utilização de dados filogenéticos juntamente com amostragem em regiões pouco exploradas como o Brasil contribuem para o aumento no número de espécies reconhecidas de Botryosphaeriaceae (COSTA et al., 2010).

Os marcadores moleculares utilizados para o sequenciamento gênico de espécies de Botryosphaeriaceae são capazes de mapear regiões específicas do DNA, dentre elas estão a região espaçador interno transcrito, ITS (do inglês, Internal Transcribed Spacer), e regiões codificadoras de proteínas como os genes da β -tubulina (β -tub) e do fator de alongação da tradução (EF-1 α) (PHILLIPS et al., 2013). Para alguns complexos de espécies há a necessidade da combinação de sequências pelo menos duas regiões gênicas para uma análise filogenética mais precisa (PHILLIPS et al., 2013; MACHADO; PINHO; PEREIRA, 2014; SLIPPERS et

al., 2014). Levantamento de espécies de Botryosphaeriaceae em *Prunus*, na África do Sul, revelou *Lasiodiplodia plurivora* como nova espécie, filogeneticamente próxima de *L. theobromae*. A distinção entre as espécies só foi possível com base na análise filogenética conjunta da região ITS e do gene EF-1 α (DAMM et al., 2007). Dados que também permitiram a caracterização de uma coleção de isolados que inicialmente haviam sido identificadas pelos caracteres morfológicos como *L. theobromae*, resultando na descrição das novas espécies *L. pseudotheobromae* e *L. parva*, o que comprova que *L. theobromae* é um complexo de espécies crípticas (ALVES et al., 2008). Apresentando marcadores morfológicos semelhantes para diversas espécies do complexo *L. theobromae*.

2.4 Morte descendente

A etiologia da morte descendente é atribuída a um complexo de patógenos fúngicos, dentre os quais a família Botryosphaeriaceae apresenta o maior número de gêneros associados (RAMOS et al., 1991). No Brasil vários gêneros de Botryosphaeriaceae como *Botryosphaeria*, *Lasiodiplodia*, *Fusicoccum*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* e *Pseudofusicoccum* foram associados à morte descendente (MARQUES et al., 2013; MACHADO; PINHO; PEREIRA, 2014).

A sintomatologia inclui cancrios, murcha de ramos terminais e laterais que ocorre de forma unilateral ou em toda a copa. As folhas podem permanecer ligadas à planta após secarem, posteriormente caindo, deixando ramos e plantas atacadas pela doença totalmente com desfolhas. Existe a descoloração do sistema vascular de ramos atacados e em pontos de inserção ao longo da haste principal e muitas vezes a morte da planta inteira (PLOETZ et al., 2009a).

A morte descendente ocorre em diversas culturas economicamente importantes, dentre elas estão mangueira, cajueiro, abacateiro, cacaueteiro, mamoneira, coqueiro, pinha, videira, guaranazeiro, goiabeira, meloeiro, mamoeiro, maracujazeiro, pinhão-manso, gravioleira e melancia (COSTA et al., 2010; MACHADO; PINHO; PEREIRA, 2014; NETTO et al., 2014; CORREIA et al., 2016, COUTINHO et al., 2016).

O controle da morte descendente e de outras doenças associadas à Botryosphaeriaceae torna-se difícil devido a capacidade desses fungos de infectar uma ampla gama de hospedeiros e por sua capacidade endofítica (PEREIRA;

SILVA; RIBEIRO, 2006; SLIPPERS; WINGFIELD, 2007; LIMA et al., 2013). O uso de produtos químicos muitas vezes é ineficaz, principalmente em plantas de porte arbóreo, ocorrendo o acúmulo de resíduos tóxicos na planta, a perda da eficácia e com o decorrer do tempo o possível desenvolvimento de resistência dos patógenos aos químicos se usados de forma irracional (PEREIRA et al., 2012).

O controle genético, com o uso de variedades resistentes é um método de controle sustentável e uma alternativa limpa que pode auxiliar a redução da incidência de doenças por Botryosphaeriaceae (CARDOSO et al., 2010). Porém são escassos os programas de melhoramento genético de fruteiras lenhosas tropicais. Assim a forma de controle mais recomendada e satisfatória para as doenças por esses fungos é o controle de caráter preventivo evitando a entrada do patógeno no campo com a adoção de práticas culturais, mantendo as plantas bem nutridas e vigorosas, eliminando aquelas com sintomas aparentes de doenças, e realizando a pulverização com fungicidas, protegendo feridas de podas que podem servir como porta de entrada do patógeno (FREIRE; JUNIOR; MESQUITA, 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e obtenção dos isolados

Ramos de plantas de jambeiro vermelho apresentando sintomas de morte descendente foram coletados nos meses de março e abril de 2016 nas cidades de Teresina (PI) e São Domingos do Azeitão (MA).

Fragmentos de ramos de aproximadamente de 5 mm de comprimento foram obtidos da área de transição do tecido doente e sadio. Em seguida os fragmentos foram desinfestados com etanol 70% durante 1 min e hipoclorito de sódio 2% também durante 1 min e, posteriormente, lavados três vezes com água destilada estéril durante 30 s. O excesso de água dos fragmentos desinfestados foi removido usando papel filtro esterilizado, e três fragmentos foram transferidos para placas de Petri de 90 mm contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA). As placas foram incubadas a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas durante três a quatro dias. Colônias fúngicas emergidas de cada fragmento foram repicadas para novas placas de Petri com meio de cultura BDA e incubadas a 25 °C.

Os isolados foram preservados pelo método do palito, no qual fragmentos de 2 cm de palitos estéreis foram depositados na superfície de colônias fúngicas crescidas em meio de cultura. Após o crescimento do fungo sobre os palitos, estes foram retirados do meio de cultura e preservados em microtubos de 2 mL contendo sílica e mantidos a 4 °C. Os isolados foram enviados para depósito na coleção de fungos fitopatogênicos Professora Maria Menezes sediada na Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife (PE).

3.2 Caracterização morfocultural

Os isolados foram caracterizados quanto à morfologia da colônia e características dos conídios. Discos de 5 mm de meio de cultura BDA, contendo estruturas do fungo, foram retirados da área periférica das colônias com sete dias de crescimento e transferidos para placas de Petri de 90 mm com meio de cultura BDA e incubadas em câmara B.O.D a 28 ± 1 °C. A medição do crescimento das colônias foi feita com o uso de régua milimétrica a cada 24 horas, medindo-se o diâmetro da colônia, em dois sentidos perpendiculares entre si. As medições foram feitas até que

o fungo atingisse a borda da placa. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com dois tratamentos (dois isolados) e cinco repetições, cada placa constituindo uma unidade experimental.

Para a caracterização cultural, discos de micélio com aproximadamente 5 mm de diâmetro, retirados da zona periférica de colônias aos sete dias de cultivo foram transferidos para placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo meio BDA. As placas foram incubadas a 25 °C, no escuro, durante 15 dias. Durante esse período avaliou-se o aspecto visual quanto a coloração predominante da colônia. (SLIPPERS et al., 2005).

As características dos conídios foram observadas em meio de cultura BDA acrescido de acículas de pinheiro autoclavadas, as placas com os isolados foram incubadas durante quatro semanas a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas para induzir o desenvolvimento de picnídios. O comprimento e largura de 20 conídios de cada isolado foram mensurados usando microscópio óptico com câmera digital e dispositivo de imagem Moticam 2.0. As medidas médias dos conídios, incluindo a razão comprimento e largura (C/L), foram obtidas usando o programa STATISTIX v. 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA).

3.3 Patogenicidade em plantas

Para avaliar a patogenicidade dos isolados em plantas, foram utilizadas mudas de jameiro vermelho (*S. malaccense*), pitangueira (*S. uniflora* L.), mangueira (*Mangifera indica* L.) e goiabeira (*Psidium guajava* L.) com cerca de três a quatro meses de idade. As plantas foram inoculadas na região mediana do caule, cujo diâmetro era de aproximadamente 8 mm. Cada isolado foi inoculado em quatro plantas de cada espécie e duas plantas de cada espécie foram utilizadas como controle não inoculado.

Os isolados foram inoculados utilizando a metodologia descrita por Gonçalves et al. (2015) com modificações. Um corte, com o auxílio de estilete esterilizado, foi feito no caule possibilitando o deslocamento da casca e a exposição do lenho. Em cada corte foi depositado um disco de meio de cultura BDA de 5 mm de diâmetro contendo estruturas vegetativas do fungo, previamente incubado por seis dias. Em cada inoculação, buscou-se o contato do disco contendo estruturas do patógeno com o lenho da planta. Em seguida, o inóculo foi coberto com a casca retirada

anteriormente, e envolvido com parafilme. A testemunha foi inoculada apenas com um disco estéril de meio de cultura BDA de 5 mm de diâmetro. O desenvolvimento dos sintomas foi acompanhado durante todo o período do experimento, com observações periódicas das plantas.

Noventa dias após a inoculação, as plantas foram levadas ao laboratório para avaliação de presença de lesões internas. Os caules foram cortados longitudinalmente com auxílio de um estilete. Fragmentos de tecidos sintomáticos foram submetidos ao procedimento descrito no item 3.1 para isolamento indireto do patógeno. Fragmentos de tecido caulinar das plantas controle também foram submetidos a tentativa de isolamento. Os isolados fúngicos recuperados em meio BDA foram comparados com os isolados originais após cultivo em meio ágar-água contendo acículas de pinheiro estéreis para permitir a esporulação e confirmar a identidade do fungo inoculado. Os fungos reisolados tiveram seu DNA extraído, amplificado e sequenciado conforme descrito no item 3.5, visando completar os postulados de Koch.

3.4 Patogenicidade em frutos de manga

Foram utilizadas frutos de mangueira da cv. Tommy Atkins no estágio “3” de maturação, apresentando casca com coloração amarela e polpa alaranjada (MORAIS et al., 2002). Os frutos foram lavados com água corrente e detergente neutro, e em seguida submetidos a uma desinfestação com solução de hipoclorito de sódio a 1,5% durante cinco minutos e, posteriormente, lavados com água destilada esterilizada e secados à temperatura ambiente.

Os isolados fúngicos CMM3314 e CMM3315 utilizados nas inoculações foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA por período de cinco dias a temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$. As inoculações foram realizadas depositando-se discos de 5 mm de diâmetro de meio de cultura BDA contendo estruturas fúngicas sob um ferimento feito na região mediana do fruto com estilete esterilizado. A testemunha foi inoculada com um disco de meio de cultura BDA estéril, sem o fungo. Após a inoculação, os frutos foram colocados em bandejas plásticas (seis frutos por bandeja) e submetidos à câmara úmida por 24 horas, e mantidos em sala de incubação a temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ (MARQUES et al., 2013).

Foram utilizados oito frutos por tratamento, cada tratamento constituído por um dos isolados fúngicos, tendo como unidade experimental um fruto de manga. Para o tratamento controle também foram usados oito frutos. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com três tratamentos e oito repetições para cada tratamento, totalizando 24 frutos. As medições dos diâmetros das lesões foram realizadas a intervalos de 24 horas durante seis dias, mensurando-se o comprimento da lesão no sentido longitudinal e transversal do fruto com o auxílio de uma fita métrica flexível. Os dados foram utilizados para o cálculo do diâmetro da lesão em frutos (SevF) e a taxa de progresso da doença em frutos (TPDF).

3.5 Análise filogenética

O DNA dos isolados foi extraído utilizando Wizard Genomic DNA PurificationKit® (Promega, Madison, WI, USA). Os fragmentos dos genes que codificam a região ITS e o fator de enlogação-1 α (EF-1 α) dos isolados foram amplificadas utilizando os primers ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990) e EF1-688F e EF1-1251R (ALVES et al., 2008), respectivamente.

As reações de PCR foram realizadas no termociclador MyCycler™ (BIO-RAD), com as seguintes condições: 94 °C por 1 min; 34 ciclos: 94 °C por 30 s, 62 °C por 45 s, 72 °C por 1 min; 72 °C por 5 min (O'DONNELL et al., 1998). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed (Biotium), com posterior visualização em transiluminador. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando-se o Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Brasil) e preparados para sequenciamento de DNA.

Os produtos da amplificação foram sequenciados, nas direções senso e antisenso, em sequenciador automático no Instituto Biológico de São Paulo. Os eletroferogramas gerados foram analisados visualmente no programa SeqAssem ver. 07/2008 (SequentiX – Digital DNA Processing, Klein Raden, Alemanha) (HEPPERLE, 2011) e as sequências editadas foram comparadas na base de dados GenBank, National Center for Biotechnological Information – NCBI, por meio da ferramenta BLAST*n*.

A Inferência Bayesiana foi realizada utilizando o programa MrBayes v 3.2.6 (RONQUIST; HUELSENBECK., 2003). O programa MrModelTest v 2.3 foi utilizado para a determinação dos modelos de substituição nucleotídica mais apropriados ao

alinhamento das sequências nucleotídicas individuais do genes ITS e EF1- α . As análises foram realizadas empregando o método de Monte Carlo via Cadeia de Markov (MCMC) - para gerar árvores filogenéticas com probabilidade posterior. As árvores foram amostradas ao acaso a cada 1000 gerações e 25% das árvores iniciais foram descartadas. As árvores foram editadas pelo programa Figtree 3.1 (RAMBAU,2009). As sequências de referências das regiões ITS e EF-1 α de espécies da Botryosphaeriaceae, disponíveis no GenBank, foram incluídas nas análises.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Quadro sintomatológico da morte descendente em jameiro

O quadro sintomatológico inicia-se com o escurecimento do lenho da planta (Figura 1A), seguido de murcha e morte de ramos terminais e laterais que se desenvolve de forma unilateral ou generalizada por toda a copa das árvores (Figura 1B). As folhas ficam secas, retorcidas e com halo escuro nas bordas e pecíolo escurecido. Ocorre desfolha de ramos atacados devido à morte e queda das folhas. O escurecimento vascular é extenso em ramos e caule (Figura 1A), a casca (epiderme) do caule se apresenta mais facilmente destacável, ficando solta do lenho. O escurecimento vascular se faz presente mesmo em plantas com sintomas externos ausentes.

A doença foi observada durante todo o ano, porém nota-se que a severidade aumenta no segundo semestre, podendo ser desencadeada pela condição de aumento da temperatura que pode favorecer o desenvolvimento do patógeno. Situação semelhante foi observada na incidência de morte descendente causada por *Neofusicoccum parvum* em *Syzygium paniculatum* na Flórida, onde a doença geralmente se desenvolvia durante o verão e se tornava menos frequente quando as temperaturas caíam no final do outono e inverno (PLOETZ et al., 2009a).

Em amostragem realizada neste estudo notou-se que 86% (26 plantas sintomáticas de 30 plantas avaliadas) dos jameiros encontrados em praças e ruas na cidade de Teresina-PI, apresentavam sintomas da doença. Dessas plantas, 53,3% estavam mortas, evidenciando a ameaça que a doença representa para o cultivo da espécie.

Fatores abióticos influenciam nas relações entre fungos endofíticos e seus hospedeiros. *Diplodia mutila* é um endófito comum em plantas de *Iriarteia deltoidea*, espécie que preferencialmente se desenvolve sob condições de sombra. Em condições de baixa luz o fungo se desenvolve como endosimbionte, porém, sob condições de elevada luminosidade, há ativação da fase patogênica, e a doença causada por *D. mutila* se expressa. A patogenicidade de *D. mutila* é associada a produção de H₂O₂ pelo fungo, induzida pela elevada luminosidade, resultando em reação de hipersensibilidade, morte celular e necrose tecidual (ALVAREZ-LOAYZA et al., 2011).

Mudanças ambientais, mesmo discretas, podem induzir uma relação comensal entre fungos e seus hospedeiros, podendo evoluir para uma relação patogênica. O impacto dessas mudanças pode resultar em diferentes níveis de virulência em novos hospedeiros. A temperatura modula a produção de proteínas extracelulares de *L. theobromae* relacionadas a patogenicidade (FELIX et al., 2016).

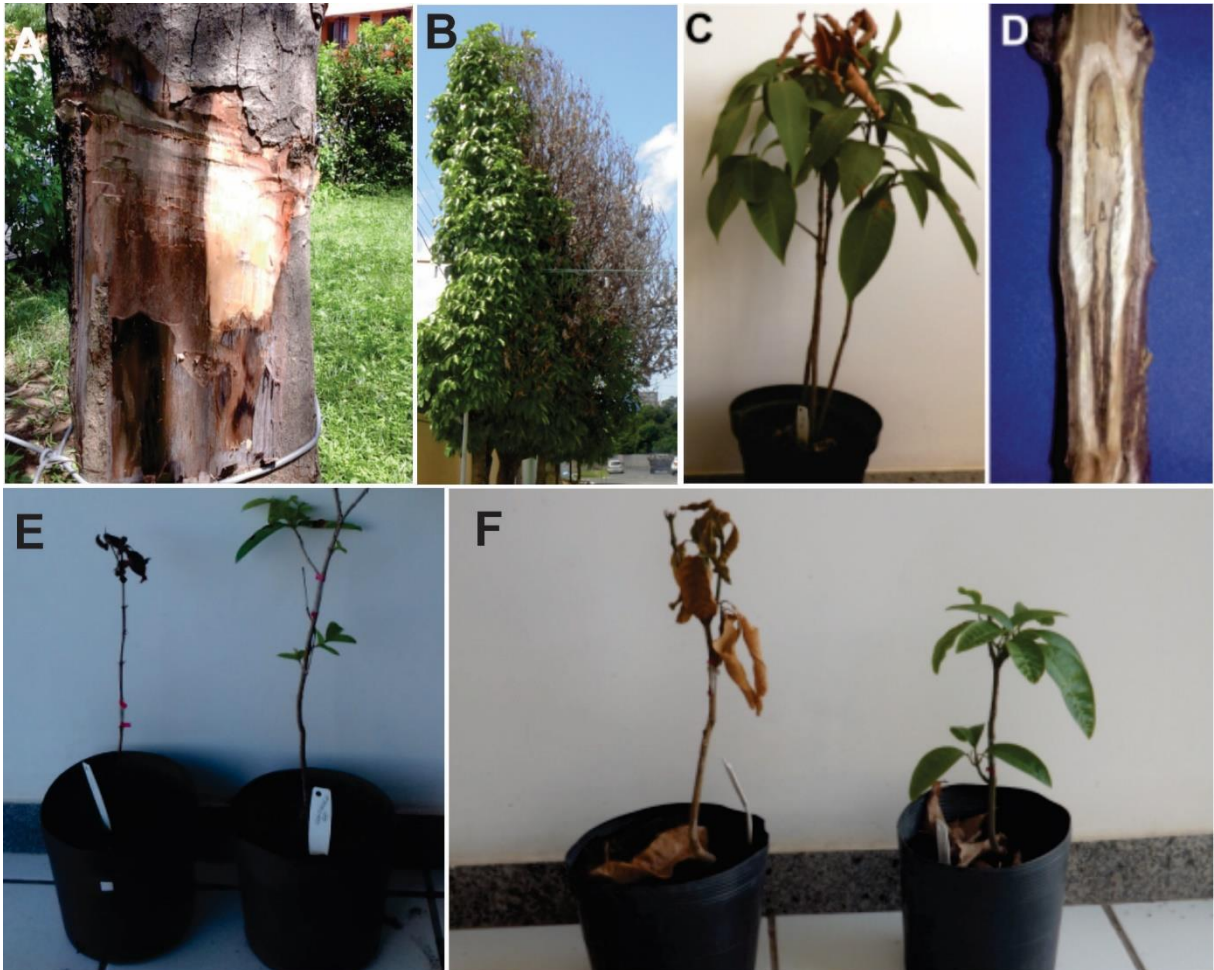


Figura 1. A e B. Morte descendentes em Jambeiro vermelho (*Syzygium malaccense*); C. Muda de jambeiro inoculada, apresentando seca dos ponteiros; D. Presença de escurecimento do lenho em jambeiro inoculado; E. Muda de manga inoculada, sintomática a esquerda e muda de manga controle, assintomática a direita; F. Muda de goiaba inoculada, sintomática à esquerda e muda de goiaba controle, assintomática a direita.

4.2 Caracterização morfocultural

Ambos os isolados cresceram rapidamente, cobrindo totalmente a superfície do meio de cultura no terceiro dia de incubação. O micélio se apresentou

inicialmente branco passando para cinza, com reverso preto, aos quatro dias de crescimento (Figura 2).

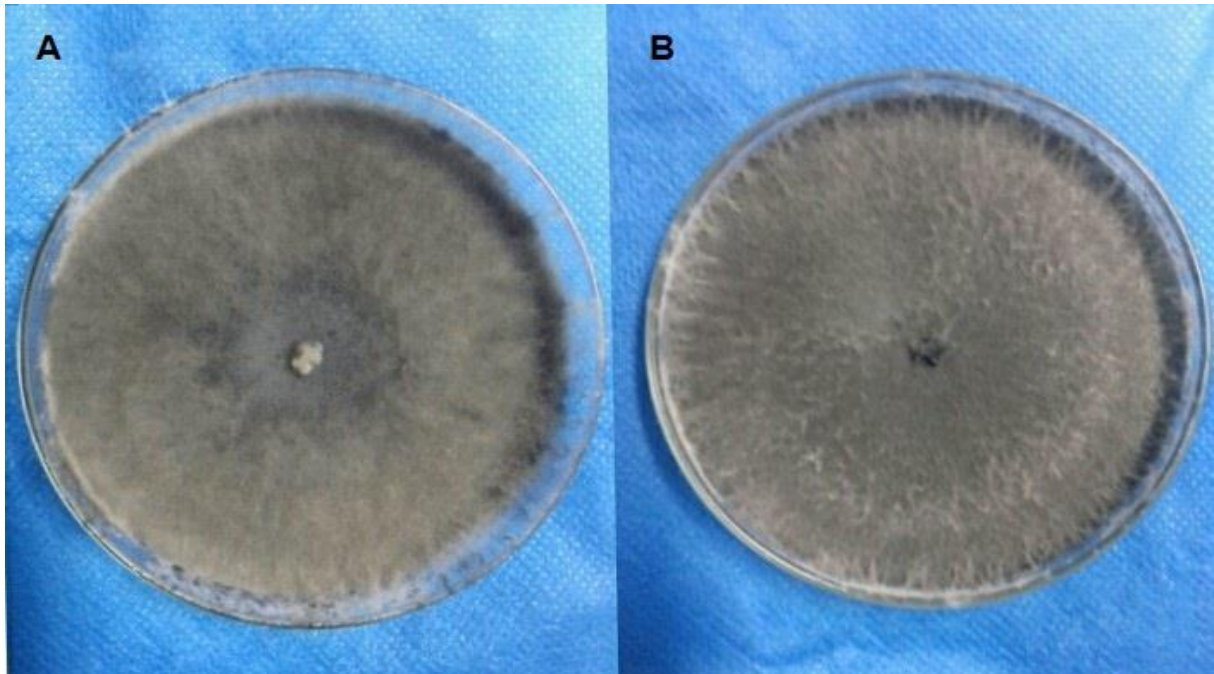


Figura 2. Colônias dos isolados CMM3314 (A) e CMM3315 (B) crescidas em meio de cultura batata-dextrose-ágar aos 15 dias de incubação no escuro com temperatura de 25 °C.

Os resultados das taxas de crescimento micelial (IVCM) para o isolado CMM3314 foi de 5,23 cm dia⁻¹. Valores de 5,54 cm dia⁻¹ foram encontrados para isolados de *L. theobromae* associados às fruteiras tropicais (LIMA et al., 2013). O IVCM do isolado CMM3315 foi de 3,39 cm dia⁻¹, diferindo daqueles encontrados para isolados associados a mangueiras no nordeste do Brasil, onde o IVCM médio foi de 2,49 cm dia⁻¹ (MARQUES et al., 2013). Devido ao caráter cosmopolita, polífago e a grande variabilidade fenotípica que esses fungos apresentam variações das características entre isolados da mesma espécie são comuns, dependendo das condições estudadas (ABDOLLAHZADEH et al., 2010).

Ambos os isolados produziram estruturas anamórficas após duas a quatro semanas de incubação em meio de cultura BDA acrescido de acículas de pinheiro. Estruturas sexuais não foram observadas no decorrer do estudo. As médias de comprimento, largura e da razão comprimento/largura dos conídios foram obtidas e comparadas com as descrições morfológicas de espécies de Botryosphaeriaceae descritas na literatura (Tabela 1).

Tabela 1. Dimensões e razão comprimento/largura (C/L) de conídios de isolados obtidos de jameiro vermelho (*Syzygium malaccense* L.) causadores da morte descendente, em comparação com isolados obtidos de outras espécies de Botryosphaericeae citadas na literatura. Teresina, PI, 2017

Isolado	Dimensões conidiais (µm)	Razão C/L	Referências
CMM3314	17,7-22,5 x 10,9-13,5	1,51	Neste estudo
	18,1-30,9 x 10,6-15,8	1,52	Lima et al. (2013)
	22,1-28,8 x 10,5-14,7	1,8	Urbez-Torres et al. (2008)
CMM3315	14,4-24,7 x 5,0-6,8	3,28	Neste estudo
	20-2 x 6,3-7,0	4,0	Mohali et al. (2006)
	22,2-24,3 x 6,3-7,0	4,0	Marques et al. (2013)

As duas espécies apresentaram características típicas para seus respectivos gêneros. Os conídios do isolado CMM3314 apresentaram-se hialinos, arredondados, ovóides e asseptados inicialmente, tornando-se, na fase de maturação, pigmentados e com um septo mediano transversal (Figura 3B). O isolado CMM3315 apresentou conídios hialinos, alongados, asseptados e de paredes delgadas (Figura 3E). Presença de estrias longitudinais na superfície do conídio maduro (bicelular). Esta característica é o principal marcador morfológico para diferenciar *L. theobromae* das demais espécies do gênero.

Os conídios produzidos pelos isolados no presente estudo apresentaram dimensões semelhantes àquelas descritas na literatura para espécies de *Lasiodiplodia* sp. e *Pseudofusicoccum* sp. Os conídios do isolado CMM3314 apresentaram dimensões médias de 18,64 (17,77-22,54) µm x 12,27 (10,94-13,59) µm. A relação comprimento/largura média foi de 1,51. O isolado CMM3315 apresentou conídios com dimensões médias de 19,20 (14,49-24,79) µm x 5,85 (5,05-6,86) µm, com relação C/L média de 3,28 (Tabela 1).

As medidas encontradas no presente estudo corroboram com aquelas encontradas por Mohali et al. (2006) para isolados de *P. stromaticum* associados a *Acacia* e *Eucalyptus* primeiramente descritos na literatura (Tabela 1). Conídios de dimensões variando de 22,2-24,3 x 6,3-7,0 µm, com relação C/L de 4,0, foram encontradas para botriosferáceos associados à mangueiras no Brasil (MARQUES et al., 2013).

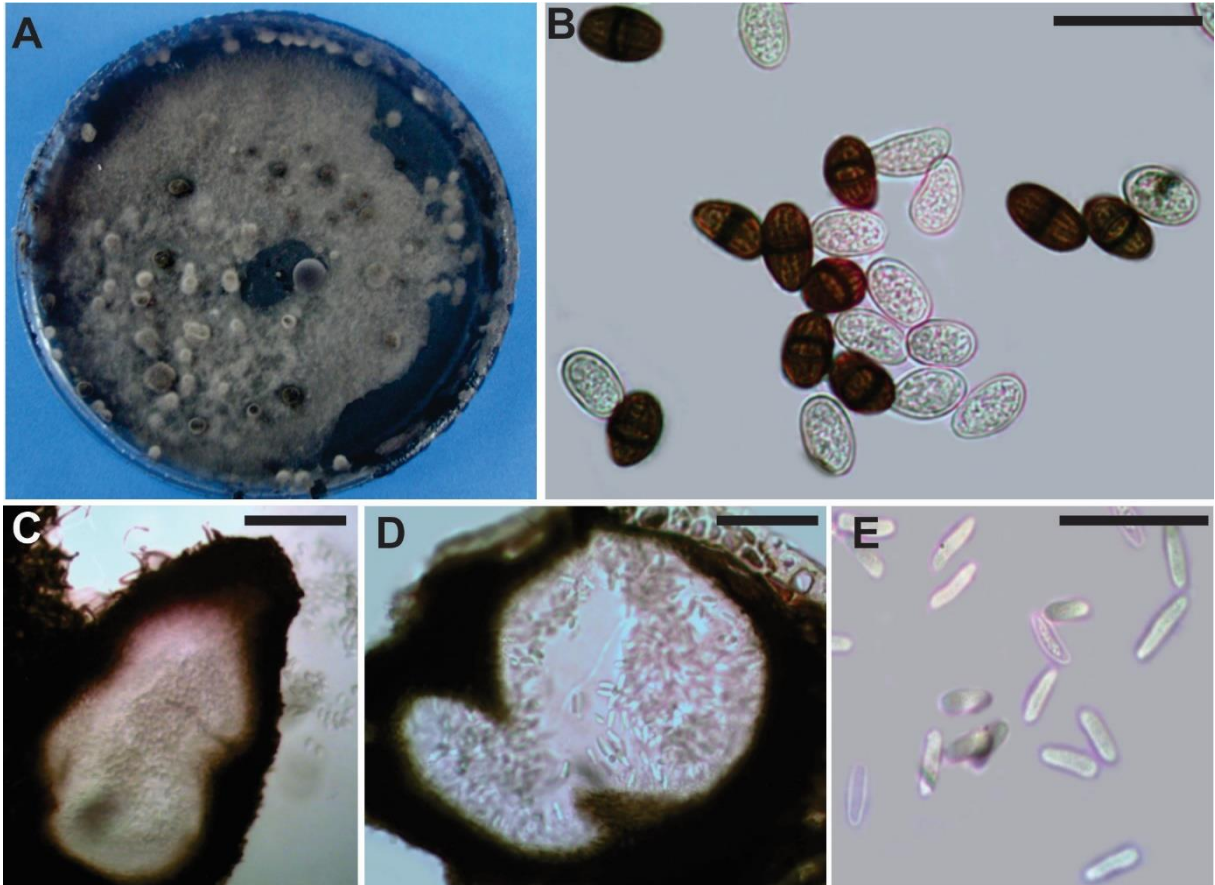


Figura 3. A. Colônia do isolado CMM3314 com desenvolvimento de primórdios picnidiais; B. Conídios jovens e em fase de maturação do isolado CMM3314; C. Picnídio do isolado CMM3314; D. Picnídio do isolado CMM3315; E. Conídios do isolado CMM3315.

4.3 Patogenicidade em plantas

Ambos os isolados (CMM3314 e CMM3315) foram capazes de colonizar e causar lesões nas mudas das quatro espécies botânicas. Os sintomas externos observados foram seca de folhas apicais (Figura 1C), que progrediram para a base até provocar a morte da planta. Os sintomas internos compreenderam escurecimento do lenho a partir do ponto de inoculação (Figura 1D). Esses sintomas refletem a colonização do fungo ao longo do lenho da planta, dificultando ou impedindo a translocação de água e sais minerais para as folhas, que em conjunto com a redução da taxa fotossintética, pode causar a morte da planta (NETTO et al., 2016).

Aos 55 dias após a inoculação foi constatada a morte de mudas de jambo inoculadas com o isolado CMM3315; a planta secou rapidamente, com as folhas

adquirindo coloração palha, característico da doença (PLOETZ et al., 2009b). As mudas apresentaram avançada colonização do lenho e sistema vascular (Figura 1D). A presença dos isolados nos tecidos lesionados foi confirmada por meio do reisolamento do fungo em meio de cultura BDA.

Para as mudas de goiaba inoculadas com o isolado CMM3314, 75% apresentaram sintomas da doença (Tabela 2), principalmente lesões escurecidas que se desenvolveram a partir do ponto de inoculação. Para o isolado CMM3315, 100% das plantas apresentaram algum dos sintomas: seca, lesão interna ou morte (Figura 1E), semelhante para as mudas de manga, que também apresentaram 100% de incidência da doença (Figura 1F). Para mangueira o isolado CMM3314 desencadeou o desenvolvimento de sintomas com menos tempo após a inoculação; cerca de 30 dias.

Tabela 2. Percentual médio de mudas sintomáticas de quatro espécies hospedeiras após inoculação com os fungos da família *Botryosphaeriaceae* (isolados CMM3314 e CMM3315) obtidos de jambeiro vermelho (*Syzygium malaccense*). Teresina, PI, 2017

Isolado	Plantas sintomáticas (%)			
	Hospedeiros			
	Jambeiro	Goiabeira	Mangueira	Pitangueira
Controle	0	0	0	0
CMM3314	100	75	100	100
CMM3315	100	100	100	33,3

Nas plantas de pitanga houve diferença entre os isolados para a porcentagem de plantas sintomáticas, o isolado CMM3314 causou doença em todas as plantas, enquanto que o isolado CMM3315 somente 30% das plantas apresentaram algum dos sintomas.

O percentual de reisolamento dos fungos inoculados nos quatros hospedeiros variou entre 75% e 100% para mudas inoculadas com o isolado CMM3314 e de 33,3% e 100% para o isolado de CMM3315 (Tabela 2). O patógeno foi reisolado de todas as mudas que apresentaram sintomas da doença. Das espécies hospedeiras avaliadas a pitangueira foi a que apresentou a menor taxa de reisolamento. Para as plantas controle das quatro espécies nenhum sintoma foi observado e os isolados não foram recuperados das plantas após a tentativa de reisolamento.

4.4 Patogenicidade em frutos de manga

Os dois isolados testados foram patogênicos em frutos de manga, com o desenvolvimento de lesões 72 horas após a inoculação (Figura 4). Inicialmente as lesões se apresentaram úmidas e com coloração marrom, avançando e provocando rachaduras e exsudação de líquidos do interior dos frutos. No quinto dia de avaliação foram observados crescimento micelial e formação de primórdios picnidiais sob a epiderme de alguns frutos, resultado semelhante foi encontrado por Junqueira et al. (1996) e Cardoso; Freire (2002).

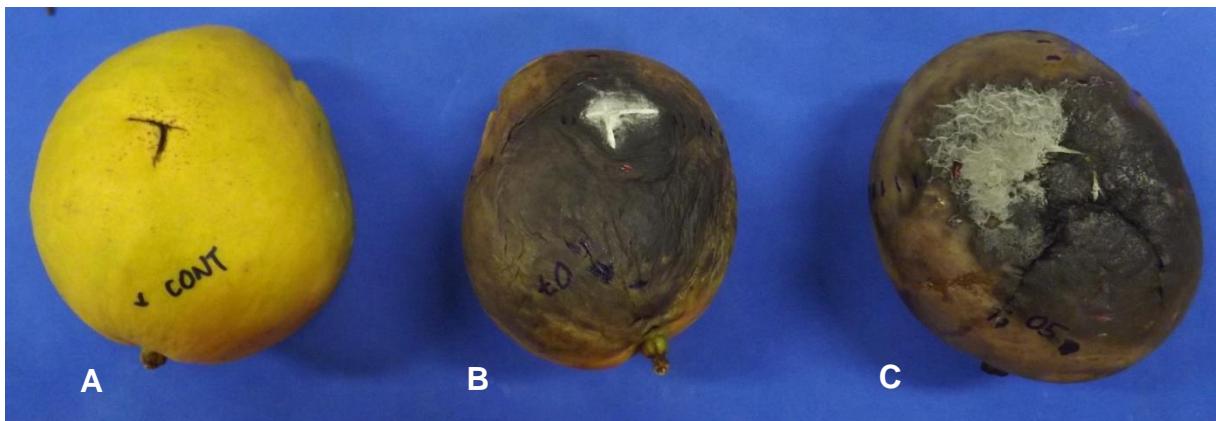


Figura 4. Mangas cv. Tommy Atkins, após seis dias de inoculação, com isolados da família Botryosphaeriaceae obtidos de jambeiro (*Syzygium malaccense* L.). A. Fruto controle não-inoculado; B. Fruto inoculado com o isolado CMM3315; C. Fruto inoculado com o isolado CMM3314.

O diâmetro da lesão em frutos (SevF) causado pelos isolados CMM3314 e CMM3315 foi avaliado durante seis dias (Tabela 3). Houve diferenças entre a severidade final da doença entre os dois isolados. Para CMM3314 a SevF média foi de 16,71 cm, mostrando-se mais agressivo em comparação com CMM3315, que apresentou SevF média de 9,5 cm. Corroborando com estes resultados, em teste de patogenicidade de espécies de Botryosphaeriaceae endofíticas de plantas da caatinga no estado do Ceará, isolados de *P. stromaticum* causaram as menores lesões em frutos de manga, quando comparados com *L. theobromae*, *L. gonubiensis*, *Botryosphaeria mamane*, *N. parvum/ribis*, *P. adansoniae* (GONÇALVES et al., 2015). Resultados semelhantes foram encontrados por Coutinho et al. (2016), nos quais *P. stromaticum* se mostrou menos agressivo do que isolados de outras espécies testadas como *Neofusicoccum hyalinum*.

Para a taxa de progresso da doença em frutos (TPDF), CMM3314 foi mais agressivo com valores de 3,57 cm dia⁻¹ enquanto CMM3315 apresentou taxa de 1,81 cm dia⁻¹ (Tabela 3). Isolados de *P. stromaticum* obtidos de mangueiras com sintomas de morte descendente apresentaram menos virulentos quando inoculados em manga, resultando em menores lesões em relação à outras espécies dos gêneros *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum* e *Neoscytalidium* (MARQUES et al., 2013).

Tabela 3. Patogenicidade em frutos de manga inoculados com isolados da família Botryosphaeriaceae obtidos de jambeiro (*Syzygium malaccense* L.) Teresina, PI, 2017

Isolado	SevF (cm)	TPDF (cm dia ⁻¹)
CMM3314	16,7 (11,6 – 28,9)	3,5 (2,6 – 5,0)
CMM3315	9,5 (5,5 – 17,2)	1,81 (1,2– 2,8)
Controle	0,00	0,00

SevF- Diâmetro da lesão em frutos de manga aos seis dias de avaliação; TPDF- Taxa de progresso da doença em frutos.

4.5 Análise filogenética

Os dois isolados foram sequenciados para as regiões ITS (ITS1 e ITS4) e TEF-1 α (EF1-688F e EF1-1251R). As sequências obtidas dos isolados neste estudo e das sequências de referências ou ex-type de espécies de Botryosphaeriaceae selecionadas do Genbank (Tabela 4) foram utilizadas para a obtenção das árvores filogenéticas (Figura 5 e 6).

As árvores filogenéticas geradas foram inferidas por análise Bayesiana, após alinhamento concatenado, composto por 43 táxons, das quais 33 táxons foram usados para na árvore do gênero *Lasiodiplodia* e 10 táxons para o gênero *Pseudofusicoccum*. Os isolados identificados neste estudo agruparam com *L. theobromae* (isolado CBS16496) (Figura 5) e com *Pseudofusicoccum stromaticum* (isolado CMW13434) (Figura 6).

Tabela 4. Isolados utilizados para a construção da árvore filogenética, com seus respectivos hospedeiros, localizações de isolamento, coletores das amostras e código de acesso as sequências ITS e TEF-1 α no bando de dados do Genbank. Teresina, Piauí, 2017

Espécie	Isolado	Hospedeiro	Localização	Coletor	ITS	TEF1-α
<i>Lasiodiplodia brasiliense</i>	CMM4015	<i>Mangifera indica</i>	Brasil	M. W. Marques	JX464063	JX464049
<i>L. viticola</i>	CBS128313	<i>Vitis vinifera</i>	EUA	R. D. Cartwright & W. D. Gubler	HQ288227	HQ288269
<i>L. theobromae</i>	CBS16496	<i>Fruto ao longo da costa de recife de corais</i>	Nova Guiné	A. Aptroot	AY640255	AY640258
<i>L. exigua</i>	CBS137785	<i>Retama raetam</i>	Tunísia	B. T. Linaldeddu	KJ638317	KJ638336
<i>L. mahajangana</i>	CBS124927	<i>Terminalia catappa</i>	Madagascar	J. Roux	FJ900597	FJ900643
<i>L. caatinguensis</i>	CMM1325	<i>Citrus sinensis</i>	Brasil	I. B.L. Coutinho/J. S. Lima	KT154760	KT008006
<i>L. iraniensis</i>	CBS124710	<i>M. indica</i>	Iran	N. Khezrinjad	GU945346	GU945334
<i>L. jatrophiicola</i>	CMM3610	<i>Jatropha curcas</i>	Brasil	A. R. Machado & O. L. Pereira	KF234544	KF226690
<i>L. thailandica</i>	CPC22795	<i>M. indica</i>	Tailândia	T. Trakunyingcharoen	KJ193637	KJ193681
<i>L. gilaniensis</i>	CBS124704	<i>Desconhecido</i>	Iran	J. Abdollahzadeh/A. Javadi	GU945351	GU945342
<i>L. missouriana</i>	CBS128311	<i>Vitis sp.</i>	USA	K. Striegler & G. M. Leavitt	HQ288225	HQ288267
<i>L. plurivora</i>	CBS120832	<i>Prunus salicina</i>	África do Sul	U. Damm	EF445362	EF445395
<i>L. pontae</i>	CMM1277	<i>Spondias purpurea</i>	Brasil	J. S. Lima & F. C. O. Freire	KT151794	KT151791
<i>L. citricola</i>	CBS124707	<i>Citrus sp.</i>	Iran	J. Abdollahzadeh & A. Javadi	GU945354	GU945340
<i>L. parva</i>	CBS45678	<i>Cassava-field soil</i>	Colômbia	O. Rangel	EF622083	EF622063
<i>L. egyptiacae</i>	CBS130992	<i>M. indica</i>	Egito	A. M. ismail	JN814397	JN814424
<i>L. euphorbicola</i>	CMM3609	<i>J. curcas</i>	Brasil	A. R. Machado & O. L. Pereira	KF234543	KF226689
<i>L. hormozganensis</i>	CBS124709	<i>Olea sp.</i>	Iran	J. Abdollahzadeh & A. Javadi	GU945355	GU945343
<i>L. subglobosa</i>	CMM3872	<i>J. curcas</i>	Brasil	A. R. Machado & O. L. Pereira	KF234558	KF226721
<i>L. macrospora</i>	CMM3833	<i>J. curcas</i>	Brasil	A. R. Machado & O. L. Pereira	KF234557	KF226718
<i>L. mediterranea</i>	CBS137783	<i>Quercus ilex</i>	Itália	B. T. Linaldeddu	KJ638312	KJ638331

Tabela 4 continua

Espécie	Isolado	Hospedeiro	Localização	Coletor	ITS	TEF1-α
<i>L. pseudotheobromae</i>	CBS116459	<i>Gmelina arborea</i>	Costa Rica	J. Carranza-Velásquez	EF622077	EF622057
<i>L. crassispora</i>	WAC12533	<i>Santalum album</i>	Austrália	T. I. Burgess/B. Dell	DQ103550	DQ103557
<i>L. Pyriformis</i>	CMW25414	<i>Acacia mellifera</i>	Namíbia	F. J. J. van der Walt & J. Roux	EU101307	EU101352
<i>L. rubropurpurea</i>	CBS118740	<i>Eucalyptus grandis</i>	Austrália	T. I. Burgess/G. Pegg	DQ103553	EU673304
<i>L. venezuelensis</i>	CBS118739	<i>Acacia mangium</i>	Venezuela	S. Mohali	DQ103547	DQ103568
<i>L. gonubiensis</i>	CBS115812	<i>Syzigium cordatum</i>	África do Sul	C. Pavlic	AY639595	DQ103566
<i>L. margaritaceae</i>	CBS122519	<i>Adansonia gibbosa</i>	Austrália	T. I. Burgess	EU144050	EU144065
<i>Diplodia Mutila</i>	CBS136015	<i>Populus alba</i>	Portugal	A. Alves	KJ361838	KJ361830
<i>D. Seriata</i>	CBS112555	<i>V. vinifera</i>	Portugal	A. J. L. Phillips	AY259094	AY573220
<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	CMW13434	<i>Eucalyptus hybrid</i>	Venezuela	S. Mohali	AY693974	AY693975
<i>P. plivaceum</i>	CBS124939	<i>Pterocarpus angolensis</i>	África	J. Roux	FJ888459	FJ888437
<i>P. adansoniae</i>	CBS122054	<i>Eucalyptus sp.</i>	Austrália	D. Pavlic	EF585332	EF585570
<i>P. ardesiacum</i>	CBS122062	<i>Adansonia gibbosa</i>	Austrália	D. Pavlic	EU144060	EU144075
<i>P. violaceum</i>	CBS124936	<i>P. angolensis</i>	África	J. Mehl & J. Roux	FJ888474	FJ888442
<i>P. artocarp</i>	CPC22796	<i>Artocarpus heterophyllus</i>	Tailândia	T. Trakunyinchaoen	KM006452	KM006483
<i>P. kimberleyense</i>	CBS122061	<i>Ficus opposita</i>	Austrália	D. Pavlic	EU144059	EU144074
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	CBS110302	<i>V. vinifera</i>	Portugal	A. J. L. Phillips	AY259092	AY573218

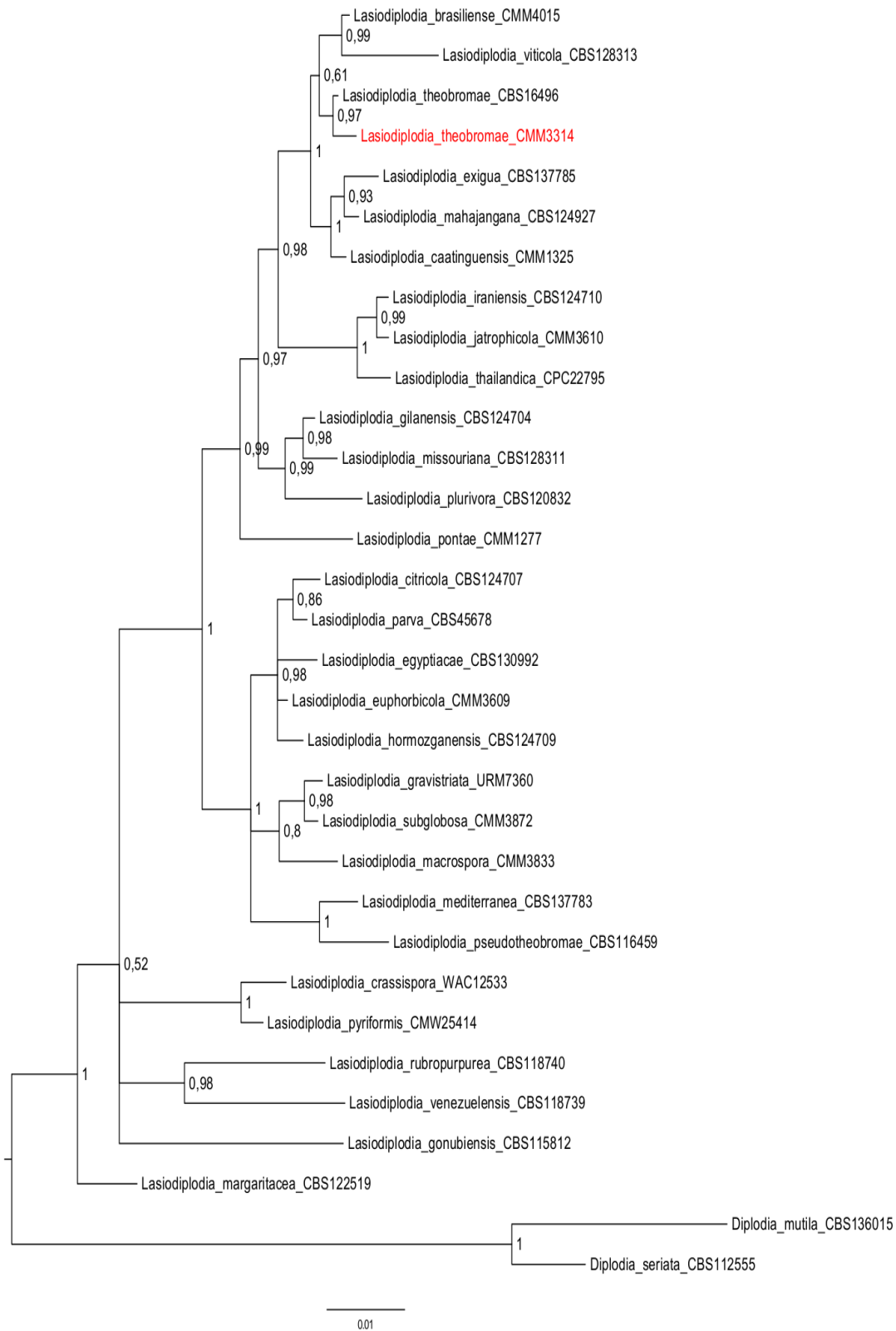


Figura 5. Árvore filogenética construída por Inferência Bayesiana de sequências das regiões ITS-5.8S rDNA e TEF-1 α mostrando a relação filogenética entre espécies de Botryosphaeriaceae. Os valores de probabilidade *a posteriori* estão representados nos entroncamentos da figura. O isolado utilizado neste estudo está destacado em vermelho. *Diplodia mutila* e *Diplodia seriata* foram utilizadas como espécies outgrup.

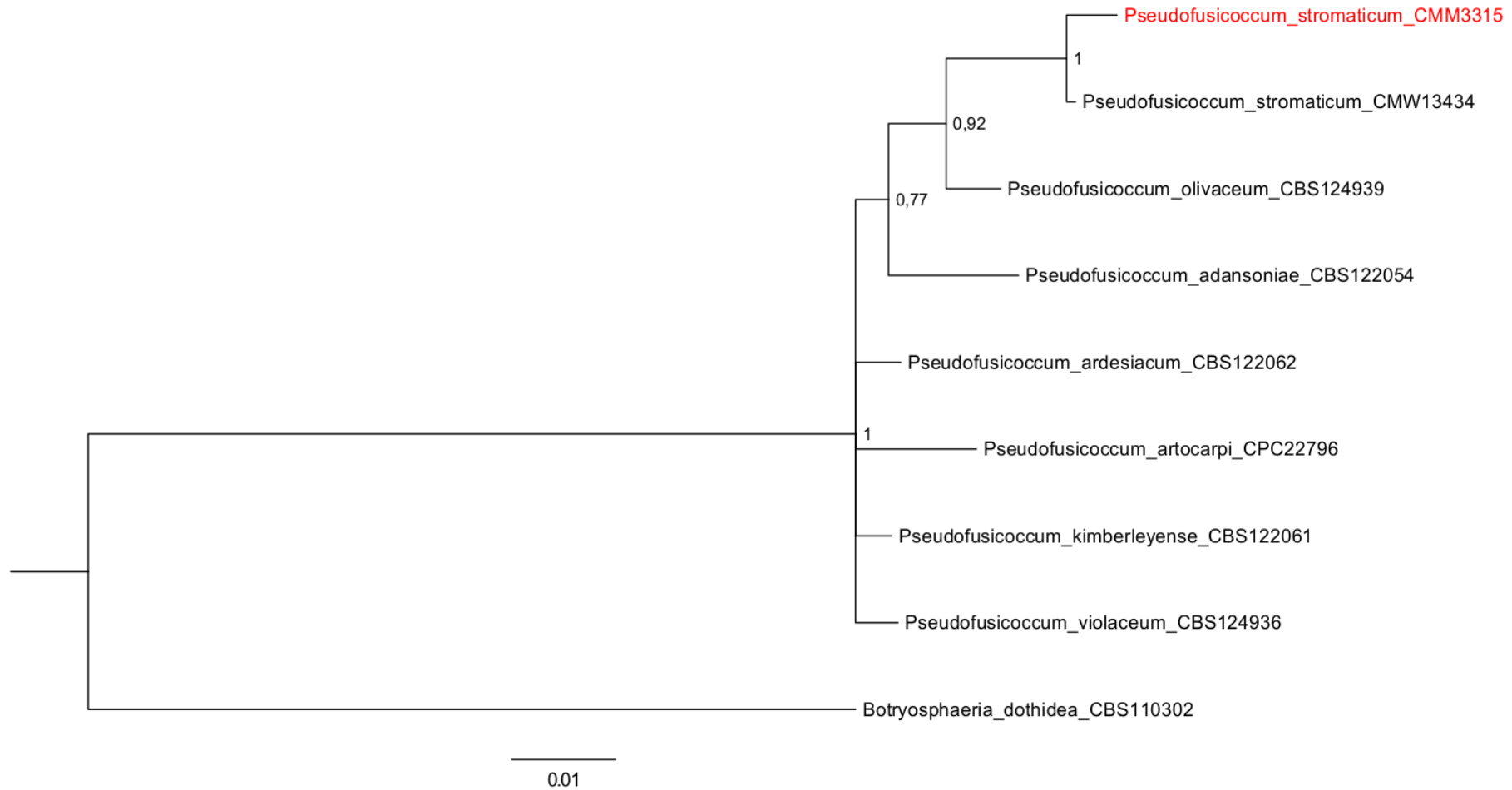


Figura 6. Árvore filogenética construída por Inferência Bayesiana de sequências das regiões ITS-5.8S rDNA e TEF-1 α mostrando a relação filogenética entre espécies de Botryosphaeriaceae. Os valores de probabilidade *a posteriori* estão representados nos entroncamentos da figura. O isolado utilizado neste estudo está destacado em vermelho. *Botryosphaeria dothidea* foi utilizada como espécie outgrup.

O concatenamento das sequências ITS e TEF-1 α foram suficientes para a definição das espécies, apresentando valores de probabilidade posterior Bayesiana de 0,97 e 1,0, respectivamente. A utilização de sequências dos genes ITS e TEF-1 α permite a distinção de espécies crípticas, que não poderiam ser separadas somente com base nos dados da sequência ITS. A análise filogenética em conjunto das sequências ITS e TEF-1 α foi útil na identificação de isolados de uma coleção que haviam sido identificados por marcadores morfológicos como *L. theobromae* (ALVES et al., 2008). A filogenia molecular tem importante papel para a identificação de novas espécies, dentre eles da família Botryosphaeriaceae, onde alguns gêneros compartilham os mesmos caracteres morfológicos (PAVLIC et al., 2004).

Lasiodiplodia theobromae é considerado uma ameaça a fruticultura mundial, sendo associado à doenças de pós-colheita em diversas culturas como goiabeira e mamoeiro (SANTANA et al., 2007; NETTO et al., 2014, COUTINHO et al., 2006, CORREIA et al., 2016). É reconhecida como importante patógeno de mangueiras e é considerada a espécie do gênero *Lasiodiplodia* mais comumente encontrada na região Nordeste do Brasil, importante polo produtor e exportador da fruta (ABDOLLAZADEH et al., 2010; COSTA et al., 2010). Devido a variada gama de hospedeiros do patógeno o controle se torna difícil. Para frutos recomenda-se a adoção de tratamentos hidrotérmico à 55 °C por cinco minutos em conjunto com o uso de fungicidas (RODRIGUES; PARADELA FILHO; TAVARES, 2004).

No nordeste brasileiro as duas espécies estudadas já foram associadas à mesma doença na mangueira (COSTA et al., 2010; MARQUES et al., 2013). *Pseudofusicoccum stromaticum* também já foi relatada em associação endofítica com espécies nativas da caatinga no estado do Ceará (GONÇALVES et al., 2015). Até então, *P. stromaticum* somente havia sido relatada em *Eucalyptus* e *Acacia* ssp. na Venezuela (MOHALI; SLIPPERS; WINGFIELD, 2006).

Em várias famílias botânicas os sintomas de morte descendente eram associados exclusivamente à espécie *Lasiodiplodia theobromae*, porém com a utilização de identificação mais robusta com o auxílio da filogenia molecular, outras espécies e gêneros dentro da família Botryosphaeriaceae foram relatados como agentes etiológicos da doença, principalmente os gêneros *Neofusicoccum*, *Neocystalidium* e *Pseudofusicoccum* (PAVLIC et al., 2004; GONÇALVES et al., 2015).

No Brasil, apesar da recente associação de patógenos pertencentes a esses gêneros a doenças em plantas, estudos do patossistema (plantas lenhosas/ Botryosphaeriaceae) estão tornando-se cada vez mais frequentes (LOPES et al., 2014). O presente estudo caracteriza-se como o primeiro relato de *L. theobromae* e *P. stromaticum* como agentes etiológicos da morte descendente do jameiro no Brasil. Esse resultado evidencia a importância de estudos posteriores para auxiliar no entendimento sobre a ocorrência, distribuição e epidemiologia desses fungos para a cultura, buscando auxiliar a adoção de medidas de manejo da doença.

5 CONCLUSÕES

- Com base nos marcadores morfo-culturais e na filogenia dos genes TEF-1 α e ITS os isolados CMM3314 e CMM3315 foram identificados como *Lasiodiplodia theobromae* e *Pseudofusicoccum stromaticum*.
- *Lasiodiplodia theobromae* e *Pseudofusicoccum stromaticum* são agentes etiológicos da morte descendente do jameiro.
- Os isolados foram patogênicos a frutos de manga e mudas de jameiro, mangueira, goiabeira e pitangueira.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHZADEH, J.; JVADI, A.; MOHAMMADI-GOLTAPPEH, E.; ZARE, R.; PHILLIPS, A. J. L. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. **Persoonia**, v. 25, p. 1–10, 2010.
- ALVAREZ-LOAYZA, P.; WHITE JR, J. F.; TORRES, M. S.; BALSLEV, H.; KRISTIANSEN, T.; SVENNING, J. C.; GIL, N. Light converts endosymbiotic fungus to pathogen, influencing seedling survival and niche-space filling of a common tropical tree, *Iriartea deltoidea*. **PLoS one**, v. 6, p. e16386, 2011.
- ALVES, A.; CROUS, P. W.; CORREIA, A.; PHILLIPS, A. J. L. Morphological and molecular data reveal cryptic species in *Lasiodiplodia theobromae*. **Fungal Diversity**, v. 28, p. 1–13, 2008.
- AZEVEDO, J. L. **Microrganismos endofíticos**. In: Melo, I. S.; Azevedo, J. L. (Ed.). Ecologia microbiana. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998.
- BURGESS, T. I.; WINGFIELD, M. J.; WINGFIELD, B. D. Global distribution of *Diplodia pinea* genotypes revealed using simple sequence repeat (SSR) markers. **Australasian Plant Pathology**, v. 33, p. 513–519, 2004.
- BURGESS, T. I.; BARBER, P. A.; MOHALI, S.; PEGG, G.; BEER, W.; WINGFIELD, M. J. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA comparisons and morphology. **Mycologia**, v. 98, p. 423-435, 2006.
- BLODGETT, J. T.; KRUGER, E. L.; STANOSZ, G. R. *Sphaeropsis sapinea* and Water Stress in a Red Pine Plantation in Central Wisconsin. **Phytopathology**, v. 87, n. 4, p. 429–434, 1997.
- CARDOSO, J. E.; VIDAL, A. A.; FREIRE, F. C. O., VIANA, F. M. P. First report of black branch dieback of cashew caused by *Lasiodiplodia theobromae* in Brasil. **Plant Disease**, v. 86, p. 558, 2002.
- CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A.; MORAIS, M. H. **Deteção e Controle de *Lasiodiplodia theobromae* em sementes de gravioleira (*Annona muricata* L.)**. Fortaleza: Embrapa-CNPAT, 2006. 22p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 27).
- CARDOSO, J. E.; CAVALCANTI, J. J. V.; CYSNE, A. Q.; DE SOUSA, T. R. M.; CORREA, M. C. M. Interação enxerto e porta-enxerto na incidência da resinose do cajueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 847–854, 2010.
- CARVALHO, F. A. *Syzygium jambos* (L.) Alston-Uma invasora na Mata Atlântica.

Simpósio Brasileiro de Espécies Exóticas e Invasoras, 2005.

CERQUEIRA, M. D. **Estudo Fitoquímico de *Myrcia rotundifolia* (Berg.) Legrand. (Myrtaceae).** (Master), UFBA, Salvador. 2002. 119p.

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

COSTA, V. S. O.; MICHEREFF, S. J.; MARTINS, R. B.; GAVA, C. A. T., MIZUBUTI, E. S. G.; CÂMARA, M. P. S. Species of Botryosphaeriaceae associated on mango in Brazil. **Journal Plant Pathology**, v. 127, n. 4, p. 509–519, 2010.

CROUS, P. W.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; RHEEDER, J.; MARASAS, W. F. O.; OHILLIPS, A. J. L.; ALVES, A.; BURGESS, T. I.; BARBER, P. A.; GROENEWALD, J. Z. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Studies in Mycology**, v. 55, n. 1915, p. 235–253, 2006.

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

DESPREZ-LOUSTAU, M.-L.; MARÇAIS, B.; NAGELEISEN, L.-M.; PIOUS, D.; VANNINI, A. Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. **Annals of Forest Science**, v. 63, p. 597–612, 2006.

DE OLIVEIRA, R. N.; DIAS, I. J. M. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia punicifolia* (HBK) DC. de diferentes localidades de Pernambuco. **Revista Brasileira de Farmacologia** v. 15, n. 1, p. 39–43, 2005.

DUNSTAN, C. A.; NOREEN, Y.; SERRANO, G.; COX, P.A.; PERERA, P.; BOHLIN, L. Evaluation of some Samoan and Peruvian medicinal plants by prostaglandin biosynthesis and rat ear oedema assays. **Journal Ethnopharmacology** v. 57, p. 35-56, 1997.

FALCÃO, M. A.; PARALUPPI, N. D.; CLEMENT, C. R. Fenologia e produtividade do jambo (*Syzygium malaccensis*) na Amazônia Central. **Acta Amazônica**, Manaus, v.32, n.1, p. 3-8. 2002.

FELIX, C.; DUARTE, A. S.; VITORINO, R.; GUERREIRO, A. C. L.; DOMINGUES, P.; CORREIA, A. C. M.; ALVES, A.; ESTEVES, A. C. Temperature modulates the secretome of the phytopathogenic fungus *Lasiodiplodia theobromae*. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1-12, 2016.

FREIRE, F. F. C. O.; VIANA, F. M. P.; CARDOSO, J. E.; SANTOS, A. A. Novos

Hospedeiros do Fungo *Lasiodiplodia theobromae* no Estado do Ceará. **Embrapa Agroindústria Tropical**. Comunicado técnico, n. 91, 2004.

FREIRE, F. C. O.; VIANA, F. M. P. Podridões em estacas de roseira, minirosa e mussaendra no estado do Ceará. **Embrapa Agroindústria Tropical**. Comunicado técnico, 129, n. 85, p. 1–4, 2007.

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

GONÇALVES, F. J. T.; FREIRE, F. C. O.; LIMA, J. S.; MELO, J. G. M.; CÂMARA, M. P. S. Patogenicidade de espécies de Botryosphaeriaceae endofíticas de plantas da Caatinga do estado do Ceará em manga e umbu-cajá. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 1, p. 43–52, 2015.

HEPPERLE, D. DNA Dragon 1.4.1 - DNA sequence contig assembler software. <http://www.dna-dragon.com/>. Acesso em 15 de Nov. 2016.

HYDE, K. D.; SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. **Fungal Diversity**, v. 33, p. 163–173, 2008.

JANICK, J.; PAULL, R. E. **The encyclopedia of fruit & nuts**. Cambridge UK. Cambridge University Press, 2008.

JOHRI, B. N. Endophytes to the rescue of plants! **Current Science**, v. 90, n. 10, p. 1315–1316, 2006.

JUNQUEIRA, N. T. V.; CUNHA, M. M.; OLIVEIRA, M. A. S.; PINTO, A. C. Q. **Graviola para exportação: Aspectos fitossanitários**. Brasília. EMBRAPA-SPI, p. 67, 1996.

KIM, K. W.; PARKER, E. W.; KIM, Y. H.; AHN, K. K.; KIM, P. G.; KIM, K. S. Latency- and Defense-Related Ultrastructural Characteristics of Apple Fruit Tissues Infected with *Botryosphaeria dothidea*. **Phytopathology**, v. 91, n. 2, p. 165–172, 2001.

KULDAU, G. A.; YATES, I. E. Evidence for *Fusarium* endophytes in cultivated and wild plants. In **Microbial Endophytes** (C. W. Bacon & J. F. White, eds): 85-120. Marcel Dekker, New York and Basel. 2000.

KRIEL, W.-M.; SWART, W. J.; CROUS, P. W. **Foliar endophytes and Their interactions with host plants, with specific reference to the Gymnospermae** *Advances in Botanical Research*, 2000.

LAN, C. C. Diseases survey and integrated control of diseases on forcing culture on wax-apple fruit trees. **Research Bulletin of Kaohsiung District Agricultural Improvement Station**, n. 13, p. 20-29, 2001.

LIMA, J. S.; MOREIRA, R. C.; CARDOSO, J. E.; MARTINS, M. V. V.; VIANA, F. M. P. Caracterização cultural, morfológica e patogênica de *Lasiodiplodia theobromae* associado a frutíferas tropicais. **Summa Phytopathologica**, v. 39, p. 81–88, 2013.

LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T.; MENUT, C.; BESSIERE, J. M. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 27, p. 916-919, 2004.

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

LUPO, S.; TISCORNIA, S.; BETTUCCI, L. Endophytic fungi from flowers, capsules and seeds of *Eucalyptus globulus*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 18, n. 1, p. 38–41, 2001.

MA, Z.; MORGAN, D. P.; MICHAILIDES, T. J. Effects of Water Stress on *Botryosphaeria* Blight of Pistachio Caused by *Botryosphaeria dothidea*. **Plant Disease**, v. 85, p. 745–749, 2001.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N.; GUO, L. D.; CHUKEATIROTE, E.; MCKENZIE, E. H.; HYDE, K. D. A destructive new disease of *Syzygium samarangensis* in Thailand caused by the new species *Pestalotiopsis samarangensis*. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, p. 227-235, 2013.

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

MARINHO, A. M. R.; RODRIGUES-FILHO, E.; MOITINHO, M. L. R.; SANTOS, L. S. 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, n. 2, p. 280–283, 2005.

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

MOHALI, S.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J. Two new *Fusicoccum* species from *Acacia* and *Eucalyptus* in Venezuela, based on morphology and DNA sequence data. **Mycological Research**, v. 110, n. 4, p. 405–413, 2006.

MORAIS, P. L. D.; FILGUEIRAS, H. A. C.; DE PINHO, J. L. N.; ALVES, R. E. Ponto de colheita ideal de mangas 'Tommy Atkins' destinadas ao mercado europeu. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 671–675, 2002.

NETTO, M. S. B.; ASSUNÇÃO, I. P.; LIMA, G. S. A. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. **Fungal Diversity**, v. 67, p. 127–141, 2014.

NETTO, M. S. B. LIMA, W. G.; CORREIA, K. C.; DA SILVA, C. F. B.; THON, M.; MARTINS, R. B.; MILLER, R. N. G.; MICHEREFF, S. J.; CÂMARA, M. P. S. Analysis of phylogeny, distribution, and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with gummosis of *Anacardium* in Brazil, with a new species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Biology**, p. 1–15, 2016.

NOREEN, Y.; SERRANO, G.; PERERA, P.; BOHLIN, L. Flavan-3-ols isolated from some medicinal plants inhibiting COX-1 and COX-2 catalysed prostaglandin biosynthesis. **Planta Medica**, v. 15, p. 1243-1247, 1998.

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

OLIVEIRA, T. A. S.; OLIVEIRA, S. M. A.; MICHEREFF, S. J.; CÂMARA, M. P. S.; COSTA, V. S. O.; LINS, S. R. O. Efeito do estágio de maturação, tipo de inóculo e local de inoculação na severidade da podridão peduncular em manga. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 6, p. 409–414, 2008.

PARKER, K. C.; SUTTON, T. B. Susceptibility of apple fruit of *Botryosphaeria dothidea* and isolate variation. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 77, n. 33, p. 385-389, 1993.

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

PAVLIC, D.; SLIPPERS, B.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, M. J. Botryosphaeriaceae occurring on native *Syzygium cordatum* in South Africa and their potential threat to *Eucalyptus*. **Plant Pathology**, v. 56, n. 4, p. 624–636, 2007.

PAVLIC, D.; WINGFIELD, M. J.; BARBER, P.; SLIPPERS, B.; HARDY, G. E. S. T. J;

BURGESS, T. I. Seven new species of the Botryosphaeriaceae from baobab and other native trees in Western Australia. **Mycologia**, v. 100, p. 851–866, 2008.

PEREIRA, A. V. S.; MARTINS, R. B.; MICHEREFF, S. J.; DA SILVA, M. B.; CÂMARA, M. P. S. Sensitivity of *Lasiodiplodia theobromae* from Brazilian papaya orchards to MBC and DMI fungicides. **European Journal of Plant Pathology**, v. 132, n. 4, p. 489–498, 2012.

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

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

PHILLIPS, A. J. L.; ALVES, A.; PENNYCOOK, S. R.; JOHNSTON, P. R.; RAMALEY, A.; AKULOV, A.; CROUS, P. W. Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the Botryosphaeriaceae. **Persoonia**, v. 21, p. 29–55, 2008.

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

PHOTITA, W.; LUMYONG, S.; LUMBYONG, P.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D. Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens? **Fungal Diversity**, v. 16, p. 131–140, 2004.

PLOETZ, R. C. PEREZ-MARTINEZ, J. M.; PALMATEER, A. J.; TARNOWSKI, T. L. 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, 2009a.

PLOETZ, R. C.; PERZ-MARTINEZ, J. M.; PALMATEER, A. J.; CATING, R.; *Neofusicoccum parvum* causes a lethal dieback of *Syzygium paniculatum* in Florida. **Plant Pathology**, v. 58, n. 4, p. 801, 2009b.

RAMOS, L. J.; LARA, S. P.; MCMILLAN JR., R. T.; NARAYANAN, K. R. Tip dieback of mango (*Mangifera indica*) caused by *Botryosphaeria ribis*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 75, n. 3, p. 315-318, 1991.

RAMBAU, T. A. Figtree 3.1. Versão 1, 2009. Disponível em: <<http://www.softpedia.com/get/Science-CAD/FigTree-AR.shtml>>. Acesso em 30 jan. 2017.

RODRIGUES, R.; PARADELA FILHO, O.; RIBEIRO, I. J. A. Caracterização morfológica e patológica de *Lasiodiplodia theobromae*, agente causal da podridão do tronco e raízes de videira. **Summa Phytopathologica**, v. 30, p. 43-50, 2004.

RONQUIST, F.; HUELSENENCK, J. P. MrBayes3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v.19, p. 1572-1574, 2003.

SAIKKONEN, K.; WALI, P.; HELANDER, M.; FAETH, S. H. Evolution of endophyte-plant symbioses. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 6, p. 275–280, 2004.

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

SALLET, L. A. P.; TEIXEIRA, C. A. D. Efeito do extrato de sementes de *Eugenia malaccensis* (L.) sobre o crescimento micelial dos fungos associados a *Coffea canephora*, *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. p. 2002–2004, 2007.

SANTANA, E. N.; MARTINS, M. V. V.; LIMA, I. M.; COSTA, H.; VENTURA, J. A.; VIEIRA, P. Manejo das Doenças do Mamoeiro. In: Núcleo de Estudos em Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras. **Manejo integrado de doenças de fruteiras**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, p. 107-127, 2007.

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

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, p. 661–686, 2005.

SIEBER, T. N. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 2–3, p. 75–89, 2007.

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

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

SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. **Fungal Biology Reviews**,

v. 21, n. 2–3, p. 90–106, 2007.

SLIPPERS, B.; JOHNSON, G. I.; CROUS, P. W.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Phylogenetic and morphological re-evaluation of the *Botryosphaeria* species causing diseases of *Mangifera indica*. **Mycologia**, v. 97, n. 1, p. 99–110, 2005.

STANOSZ, G.; BLODGETT, J. T.; SMITH, D. R.; KRUGER, E. L. Water stress and *Sphaeropsis sapinea* as a latent pathogen of red pine seedlings. **New Phytologist**, v. 149, n. 3, p. 531–538, 2001.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673–4680, 1994.

URBEZ-TORRES, J. R.; LEAVITT, G. M.; GUERREIRO, J. C.; GUEVARA, J.; GUBLER, W. D. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. **Plant Disease**, v. 92, n. 4, p. 519–529, 2008.

VAN DER VLUGT, R. Botryosphaeriaceae from *Eucalyptus* and Native Myrtaceae in Botryosphaeriaceae aisladas de *Eucalyptus* y Mirtáceas nativas en Uruguay. **Agrociência**, v. 12, 2007, p. 22–26, 2008.

VIEIRA, T. R.; BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; PAULA, V. F.; NASCIMENTO, E. A. Constituintes químicos de *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 536–539, 2004.

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