JOSÉ FÁBIO FERREIRA DE SOUZA

NOVOS AGENTES ETIOLÓGICOS CAUSADORES DA PODRIDÃO DE FRUTOS E MORTE DESCENDENTE EM CUPUAÇUZEIRO E JAQUEIRA

TERESINA – PI

2024

NOVOS AGENTES ETIOLÓGICOS CAUSADORES DA PODRIDÃO DE FRUTOS E MORTE DESCENDENTE EM CUPUAÇUZEIRO E JAQUEIRA

JOSÉ FÁBIO FERREIRA DE SOUZA

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

Profº. Dr. Maruzanete Pereira Melo

Orientador

Profº. Dr. Francisco de Alcântara Neto

Coorientador

TERESINA – PI

2024

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial CCA
Serviço de Representação Temática da Informação

S725n Souza, José Fábio Ferreira de.
Novos agentes etiológicos causadores da podridão de frutos e morte descendente em cupuaçuzeiro e jaqueira / José Fábio Ferreira de Souza. -- 2023.
55 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2024.
"Orientador: Prof. Dr. "Maruzanete Pereira Melo."

1. *Botryosphaeriaceae.* 2. *Theobroma grandiflorum. 3. Artocarpus heterophyllus.* 4. Podridão pós-colheita. 5. Taxonomia de fungos . I. Melo, Maruzanete Pereira. II. Título.

CDD 576.163

Bibliotecário: Rafael Gomes de Sousa - CRB3/1163

JOSÉ FÁBIO FERREIRA DE SOUZA

NOVOS AGENTES ETIOLÓGICOS DE PODRIDÃO DE FRUTOS E MORTE DESCENDENTE EM CUPUAÇUZEIRO E JAQUEIRA.

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

APROVADA em 22 de fevereiro de 2024

Comissão Julgadora:

José Evando Aguiar Beserra Júnior
Assinado de forma digital por José Evando Aguiar Beserra Júnior
Dados: 2024.10.09 19:54:00 -03'00'

Prof. Dr. José Evando Aguiar Beserra Júnior – UFPI/Membro Interno

gov.br
Documento assinado digitalmente
FRANCISCO DE ALCANTARA NETO
Data: 09/10/2024 07:41:22-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Francisco de Alcântara Neto – UFPI/Membro Interno

gov.br
Documento assinado digitalmente
ENAYRA SILVA SOUSA
Data: 08/10/2024 22:50:58-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profª. Drª. Enayra Silva Sousa – UFPI/Membro Externo

gov.br
Documento assinado digitalmente
MARUZANETE PEREIRA DE MELO
Data: 09/10/2024 19:47:13-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Maruzanete Pereira de Melo – UFPI/Presidente
(Orientador)

TERESINA - PI

2024

Dedico à Deus por me dar força em todos os momentos desse processo do mestrado. À toda minha família e amigos, em especial meu filho Antônnyo Fellyp Façanha de Souza, aos meus pais, Francisco Aragão de Souza e Osmilda Ferreira de Souza, minha esposa Engenheira Florestal Rosilene Soares Façanha. Aos meus irmãos Francismar Ferreira de Souza, Antônio Fagner Ferreira de Souza, Raimundo Franque Ferreira de Souza, Francileia Ferreira de Souza e à comissão de orientação, professores Profº Dr. Maruzanete Pereira de Melo e Dr. Francisco de Alcântara Neto.

Agradecimentos

Primeiramente, expresso minha gratidão a Deus, provedor da vida, por me fortalecer nos momentos difíceis e nunca me abandonar, pois tenho a certeza de que ele esteve sempre comigo.

À minha família em geral e, em especial, ao meu filho Antônnyo Fellyp Façanha de Souza, que é o meu grande incentivo e motivo para ser um exemplo. Expresso profunda gratidão aos meus pais, Francisco Aragão de Souza e Osmilda Ferreira de Souza, cujo orgulho busco incessantemente; à minha dedicada esposa, Engenheira Florestal Rosilene Soares Façanha, pelo apoio constante ao longo deste processo; aos meus irmãos Francismar Ferreira de Souza, Antônio Fagner Ferreira de Souza, Raimundo Franque Ferreira de Souza, Francileia Ferreira de Souza, cuja presença e apoio são inestimáveis. A vocês, meu sincero agradecimento por tudo que fizeram e fazem por mim. Aos meus queridos sobrinhos Mayla Francynne Cardoso de Souza, Ynna Maysa Cardoso de Souza, Anna Flavia Ferreira de Souza, Fernando Ferreira de Souza, Antonio Italo Ferreira da Cunha, Isabely Calmon de Souza, João Vitor, agradeço pelo carinho dedicado a mim e sempre acreditaram em mim, estiveram ao meu lado e jamais me abandonaram. Obrigado por tudo.

Aos meus colegas de curso de Pós Graduação em Agronomia, seja no Mestrado ou Doutorado, em particular ao Felipe Sousa Queiroz Barbosa, Marline da Silva Almeida, Ynayanna Nariza Medeiros Silva, pelo apoio inestimável nas atividades das disciplinas do curso. Sem a colaboração deles, este trabalho e minha jornada acadêmica não teriam alcançado a concretude que apresentam. Expresso minha profunda gratidão ao comitê de orientação, composto pelos professores Dr. Maruzanete Pereira de Melo e Francisco de Alcântara Neto, pela orientação dedicada, paciência e conhecimentos transmitidos. Aos meus professores de graduação, em especial à Dra. Jorcely Gonçalves Barroso, ao Dr. José Genivaldo do Vale Moreira, ao Dr. Givanildo Pereira Ortega, ao Carlos Adolfo Bantel, ao Dr. Rafael de Azevedo Calderon, ao Dr. Josimar Bastista Ferreira, incluindo a memória do saudoso professor Dr. Gleisson de Oliveira Nascimento, cuja dedicação foi crucial emmomentos necessários. Expresso minha gratidão a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram e torceram por minha jornada acadêmica até este ponto.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela ajuda financeira pela a bolsa, sendo fundamental para eu concluir o curso.

Resumo

O cupuaçuzeiro e a jaqueira são frutíferas arbóreas que se destacam pelo seu significativo potencial econômico, especialmente em indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticos. Entretanto, com a expansão dos cultivos, problemas fitossanitários de etiologia fúngica têm sido observados em diferentes regiões produtoras. Dentre os problemas fitossanitários encontrados com maior frequência nas culturas do cupuaçu e da jaca estão a morte descendente e podridão dos frutos, tendo como patógeno principal *Lasiodiplodia theobromae*. O presente estudo foi desenvolvido para testar a hipótese de que poderiam existir outros agentes etiológicos causadores da morte descendente e podridão de frutos em cupuaçuzeiro e jaqueira além da espécie fúngica *Lasiodiplodia theobromae.* A hipótese foi testada a partir do desenvolvimento de três etapas: a coleta de material assintomático em área de cultivo, a análise de marcadores morfológicos e filogenético e o teste de patogenicidade. A primeira etapa foi realizada em visitas fitossanitárias em área de cultivo do cupuaçuzeiro e jaqueira em plantas com sintomas das doenças seca dos ponteiros e podridão dos frutos, com o objetivo de obter isolados fúngicos da família Botryosphaeriaceae*.* A segunda etapa ocorreu em laboratório, através da analíse de marcadores morfológicos e da análise filogenética dos isolados fúngicos obtidos, a fim de adquirir marcadores morfológicos nos isolados semenhantes ou iguais as espécies fúngicas da família Botryosphaeriaceae e a correta identificação dos agentes etiológicos causadores da podridão de frutos e morte descendente em cupuaçuzeiro e jaqueira. Na terceira etapa foi realizado o teste de patogenicidade, que ocorreu por meio da inoculação dos isolados fúngicos no tecido lenhoso nas plantas de cupuaçu e nas plantas de jaca e em cascas dos frutos de jaca, com o objetivo de comprovar a patogenicidade dos isolados obtidos em visitas fitossanitárias em cupuaçuzeiros e jaqueiras e em frutas de jaca. O capítulo I apresenta o primeiro relato de *Lasiodiplodia venezuelensis e Pseudofussicoccum* sp causando seca dos ponteiros em cupuaçuzeiro. De acordo com os dados da pesquisa mostra que as plantas de cupuaçuzeiro nos estados do Acre e Amazonas com sintomas da morte descendente ou seca dos ponteiros sucedeu no isolamento de espécies fúngicas do gênero *Lasiodiplodia e Pseudofusiccocum.* Os isolados foram cultivados em aveia ágar com fragmentos de acículas de pinheiro para estimular a formação de picnídios. Tanto isolados de *Lasiodiplodia* quanto de *Pseudofussicoccum* formaram picnídios e acículas de Pinus, onde foram observados esporos imaturos unicelulares e hialinos. Os picnídios maduros foram identificados conídios bicelulares, escuros e com estrias longitudinais. Os conídios do isolado de *Pseudofussicoccum* apresentaram morfologia de formato cilíndrico com base truncada. Na identificação dos isolados de *Lasiodiplodia*, realizou a extração de DNA de dois isolados,

acompanhado pela realização de reação em cadeia da polimerase dos genes ITS e Fator de Elongação. A análise filogenética mostrou que esses isolados se agruparam com um isolado de referência de *Lasiodiplodia venezuelensis*. Ambos isolados induziram sintomas de cancro e escurecimento do tecido lenhoso em mudas de cupuaçuzeiro. O capítulo II, na forma de artigo, relata que em três regiões geográficas no Brasil, no período de 2019 a 2023, presenciou-se frutos de jaca com alta incidência de podridão negra. Além desse problema fitossanitário observou-se árvores de jaqueira com sintomatologia da doença seca dos ponteiros. Os isolados obtidos em visitas fitossanitárias em área de cultivo de jaqueira, em plantas com sintomas das doenças seca dos ponteiros e podridão dos frutos, foram espécies fungícas do gênero *Lasiodiplodia*, os mesmos formaram picnídios em acículas de *Pinus*, em que foi possível observar esporos imaturos unicelulares, hialinos e bicelulares. Ao realizar análise filogenética, os isolados agruparam com isolados de referência de *L*. *theobromae* e *L. brasiliense*. No teste de patogenicidade todos isolados causaram podridão de frutos e seca dos ponteiros em planta de jaca. Os fungos inoculados foram reisolados, apresentando os mesmos marcadores morfológicos. Este é o primeiro relato de *L. theobromae* e *L. brasiliense* causando podridão de frutos e seca dos ponteiros em jaca no Brasil.

Palavras-Chave: Botryosphaeriaceae, *Theobroma grandiflorum, Artocarpus heterophyllus*, podridão pós-colheita e taxonomia de fungos.

Abstract

Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) and jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) are economically significant tree fruits, particularly in the food, pharmaceutical, and cosmetics industries. However, the expansion of their cultivation has led to phytosanitary problems, predominantly of fungal etiology, in various producing regions. Among the most prevalent issues in cupuaçu and jackfruit crops are dieback and fruit rot, with *Lasiodiplodia theobromae* identified as a major pathogen. This study aimed to investigate whether other etiological agents besides *Lasiodiplodia theobromae* could also cause dieback and fruit rot in these fruits. The hypothesis was tested through a three-stage process: the collection of asymptomatic material from cultivation areas, analysis of morphological and phylogenetic markers, and pathogenicity testing. In the first stage, phytosanitary visits were conducted to cupuaçu and jackfruit cultivation areas exhibiting symptoms of dieback and fruit rot, and fungal isolates from the Botryosphaeriaceae family were collected. The second stage involved laboratory analysis of these isolates, including morphological and phylogenetic examinations, to identify the fungi and determine if they were similar to or identical to known Botryosphaeriaceae species. In the third stage, pathogenicity testing was performed by inoculating the fungal isolates into the woody tissue of cupuaçu and jackfruit plants and into the skins of jackfruit fruits to confirm their pathogenicity. Chapter I reports the first identification of *Lasiodiplodia venezuelensis* and *Pseudofusicoccum s*p. as causes of dieback in cupuaçu. In the states of Acre and Amazonas, cupuaçu plants with dieback symptoms yielded fungal isolates from the genera *Lasiodiplodia* and *Pseudofusicoccum*. These isolates formed pycnidia on oatmeal agar with pine needle fragments, producing dark, bicellular conidia with longitudinal striations. The conidia of the *Pseudofusicoccum* isolate were cylindrical with a truncated base. DNA extraction and polymerase chain reaction of the ITS and Elongation Factor genes identified the isolates as *Lasiodiplodia venezuelensis*. Both isolates caused canker and darkening of woody tissue in cupuaçu seedlings. Chapter II presents data from three regions in Brazil from 2019 to 2023, where jackfruit fruits exhibited a high incidence of black rot, and trees showed symptoms of dieback. The isolates from these areas were identified as *Lasiodiplodia* species, forming pycnidia with similar morphological characteristics. Phylogenetic analysis grouped these isolates with reference isolates of *L. theobromae* and *L. brasiliense*. Pathogenicity tests confirmed that all isolates caused fruit rot and dieback in jackfruit plants, and the reisolated fungi showed consistent morphological markers. This is the first report of *L. theobromae* and *L. brasiliense* causing fruit rot and dieback in jackfruit in Brazil.

Keywords: Botryosphaeriaceae, *Theobroma grandiflorum*, *Artocarpus heterophyllus*, post-harvest rot, fungal taxonomy.

Lista de Figuras

Capítulo I

Figura 1: a. A-B-C-D: Sintomas de seca dos ponteiros e cancro em árvore de cupuaçuzeiro. E. Resultado de patogenicidade de *L. venezuelensis*. F. Resultado de patogenicidade de *Pseudofusicoccum* sp. G. Cancro causado por *L. venezuelensis* e *Pseudofusicoccum* sp 36

Figura 2: A-B: Conídios de *Lasiodiplodia venezuelensis*. C. Cirros de conídios de *Pseudofusiccocum* sp. D. Conídios de *Pseudofusicoccum* sp 37

Figura 3. Árvore de Inferência Bayesiana resultante do alinhamento de dados tef1. Valores de bootstrap maiores que 70 são indicados nos nós. A árvore tem raízes com *Botryosphaeria stevensii* (CMW 7060). 38

Figura 4. Árvore de Inferência Bayesiana resultante do alinhamento dos dados do ITS. Valores de bootstrap superiores a 70 são indicados nos nós. A árvore tem raízes com *Botryosphaeria stevensii* (CMW 7060). 39

Figura 5. Árvore de Inferência Bayesiana resultante do alinhamento de dados tef1 e ITS. Valores de bootstrap superiores a 70 são indicados nos nós. A árvore tem raízes com *Botryosphaeria stevensii* (CMW 7060). 40

Lista de Figuras

Chapter II

Fig. 1. Symptoms in *Artocarpus heterophyllus*. **A-B**. Jackfruit exhibiting symptoms of fruit rot. **C.** Sectioned fruits showing colonization of both pulp and seeds. **D.** Jackfruit tree displaying symptoms of dieback. **E.** Jackfruit tree showing symptoms of gummosis. **F-G**. Trunk tissue with dark-colored colonization 48

Fig. 2. Morphological markers of *Lasiodiplodia theobromae* (COUFAL 522) and *L. brasiliense* (COUFAL 517). **A-B.** Characteristics of *L*. *theobromae* colonies. **C-D.** Immature and mature conidia of *L. theobromae*. **E-F.** Characteristics of *L*. *brasiliense* colonies. **G-H.** Mature and immature conidia of *L. brasiliense*. **I-J.** Pycnidia formed on pine needles in PDA. K. Cirrus of conidia. Scale bar: 40 µm 50

Fig. 3. Pathogenicity test in fruit and seedlings of *Artocarpus heterophyllus***. A-B.** Asymptomatic jackfruit seedlings (negative control). **C.** Jackfruit seedlings showing symptoms of dieback. **D.** Presence of mycelium and pycnidia in inoculated seedlings. **E-F.** Tissue with dark-colored colonization. **G.** Asymptomatic jackfruit fruit (negative control). **H**-**I.** Fruits exhibiting symptoms of rot 51

Fig. 4. Bayesian phylogenetic tree of *Lasiodiplodia* spp. isolates from *Artocarpus heterophyllus*. The tree was constructed using concatenated sequences of the ITS, *TEF-1α*, and *TUB2* genes. Bayesian posterior probability values ≥ 0.90 are indicated above the nodes. Sequences generated in this study are highlighted in bold. The tree is rooted in *Diplodia mutila* 52

Lista de Tabela

Chapter II

Table 1: Collection details and GenBank accession numbers of isolates included in this study. * = ex-type culture. Strains collected and sequences generated for this study are in bold.....49

SUMÁRIO

Introdução Geral 15
1 Revisão Bibliográfica..... 18
1.1. A cultura do cupuaçu distribuição e importância econômica 18
1.1.1. A cultura da jaca, distribuição e importância econômica..... 18
1.1.2. Principais doenças na cultura do cupuaçu 19
1.1.3. Principais doenças na cultura da jaca..... 20
2.3. *Lasiodiplodia*: Morfológia, sintomatologia e gama de hospedeiro 21
2.4. Filogenia do fungo *Lasiodiplodia*..... 23
2.4.1. A importância da pesquisa..... 23
Referências 24
Capítulo I 29
Primeiro relato de *Lasiodiplodia venezuelensis e Pseudofussicoccum* sp causando seca dos ponteiros em cupuaçuzeiro 29
Resumo 29
Abstract..... 30
Introdução..... 31
2. Material e Métodos..... 32
2.1. Coleta e obtenção dos isolados..... 32
2.2. Caracterização morfocultural 33
2.3. Teste de patogenicidade..... 34
2.4 Análise filogenética 34
2 Resultados 35
3 Discussão..... 41
4 Conclusão 43
6. Referências 44

SUMÁRIO

Chapter II **47**

Lasiodiplodia theobromae and *Lasiodiplodia brasiliense* causing dieback and rot fruit of jackfruit tree in Brazil 47

Abstract **47**

1. Introduction **47**

2 Materials and methods **48**

2.1. Sample collection and isolation 48

2.2. Morphology and cultural characteristics 48

2.3 Pathogenicity Testing 49

2.4 DNA extraction, PCR, and sequencing 49

2.5 Phylogenetic analysis 49

3 Results **50**

4 Discussion **51**

6. Acknowledgements **53**

7. References **53**

Anexo I **54**

Anexo II **55**

1. Introdução Geral.

Dentre as espécies frutíferas, o cupuaçuzeiro e a jaqueira destacam-se pelo seu significativo potencial econômico, especialmente devido ao seu uso na produção de polpa de fruta. O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.) é nativo da Amazônia Oriental Brasileira, sendo apreciado pela população local devido ao fato de seus frutos servirem como matéria prima para as indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica (ALVES et al., 2022). Nos últimos anos tem-se observado uma significativa demanda pela polpa dessas frutas, resultando na expansão das áreas de cultivos. Estima-se que essas áreas ultrapassaram 30 mil hectares e os maiores estados produtores dessa cultura são Amazonas e Pará, localizados na região norte do Brasil (MATA et al., 2022). Com a expansão dos cultivos, problemas fitossanitários de etiologia fúngica têm sido observados em diferentes regiões produtoras. Dentre as doenças mais significativas, destacam-se a vassoura de bruxa (*Moniliophora perniciosa)* (MATA et al., 2022) e seca dos ponteiros ou morte descendente (*Lasiodiplodia theobromae*) (LIMA et al., 1991). Recentemente, foi identificado o patógeno quarentenário Moniliase (*Moliniophora roreri*) em áreas de produção de cupuaçuzeiro no Acre. Diante dessa situação, o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) atua na região para impedir a disseminação de material infectado para outras regiões produtoras de cupuaçu e cacau (MAPA, 2022).

A jaqueira (*Artocarpus heterophyllus* Lam.), originária da Índia, se encontra cultivada no Brasil, predominantemente, nas regiões litorâneas, desde o sul do estado da Bahia até a Paraíba (ADIKARAM et al., 2020; SOUSA et al., 2021), com uma produção anual estimada variando de 200 a 500 frutas (SOUSA et al., 2021). A expressiva produtividade dessa fruta apresenta um considerável potencial econômico para a indústria alimentícia e agroindustrial (SWAMI; KALSE, 2018), onde a polpa é consumida *in natura*, além de ser utilizada para a produção de sucos, refrigerantes e geleias (SWAMI; KALSE, 2018). Entretanto, a produtividade da jaqueira pode ser afetada por patógeno de etiologia fúngica, sendo a podridão mole uma das doenças importantes (TIZANADO et al., 2018), cujo agente etiológico é o fungo *L. theobromae* (NI et al., 2008).

O fungo *Lasiodiplodia theobromae*, é conhecido como patógeno de ocorrência em vários hospedeiros, merecendo destaque para plantas arbóreas frutíferas. Dentre

estas plantas destacam-se: mangueira (*Mangifera indica* L.), cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), abacateiro (*Persea americana* Mill.), citros (*Citrus* spp.), goiabeira (*Psidium guajava* L.), gravioleira (*Annona muricata* L.). Os principais sintomas causados por esse patógeno são: seca dos ponteiros, cancro, resinose, queima das folhas e podridão de frutos (TAVARES, 2002, MARQUES et al., 2013; NETTO et al., 2014; COUTINHO et al., 2017).

Lasiodiplodia theobromae era anteriormente considerado um patógeno secundário, devido à sua baixa incidência e severidade. No entanto, em áreas de produção de frutíferas como a mangueira, tem-se observado elevada incidência do patógeno, que têm causado a morte das extremidades de galhos de plantas adultas (LINS et al., 2013). Relatos de danos severos em áreas de cultivo de coqueiro e mamão têm sido registrados na região nordeste do Brasil (NETTO et al., 2014; COUTINHO et al., 2017). Além da seca dos ponteiros, o fungo demonstra a capacidade de induzir mais de um sintoma em um mesmo hospedeiro. Por exemplo, em árvores de mangueira, foram observados cancro, resinose e podridão de frutos. Essa variação de sintomas pode confundir técnicos e produtores ao tentarem identificar corretamente a doença (MARQUES et al., 2013, COUTINHO et al., 2017).

A família Botryosphaeriaceae abrange diversos gêneros de fungos de importância agrícola, com destaque para *Lasiodiplodia*, *Fusicoccum*, *Neofusicoccum* e *Pseudofusicoccum*, todos reconhecidos como agentes etiológicos em diversas plantas arbóreas. A taxonomia destes gêneros, baseada exclusivamente na morfologia dos marcadores, mostra-se inadequada devido à semelhança nos marcadores morfológicos das espécies de ambos os gêneros (YANG et al., 2017, PHILLIPS et al., 2018).

No Brasil, o pioneirismo na identificação da ocorrência de *Lasiodiplodia theobromae* foi registrado em plantios de mangueira no Vale do São Francisco, Pernambuco. Inicialmente, por meio de diagnose visual, acreditava-se erroneamente que o patógeno causador dos sintomas fosse *Ceratocystis fimbriata*, devido à semelhança dos sintomas entre esses dois patógenos (TAVARES et al., 1991). Com o aumento do problema fitossanitário seca dos ponteiros em árvores de mangueira, foi necessário recorrer a ferramentas de biologia molecular. Essa abordagem revelou que, associado ao patossistema da seca dos ponteiros, diversas espécies de *Lasiodiplodia* e outros gêneros da família Botriopheraceae estavam presentes. Além

disso, outros gêneros dessa família, como *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Neocytalidium* e *Pseudofusicoccum*, também foram identificados (MARQUES et al., 2013).

Portanto, devido à escassez de estudos conclusivos sobre a identificação dos agentes etiológicos das doenças, como a morte descendente em cupuaçuzeiro e jaqueira, bem como a podridão em frutos de jaca, este estudo se propôs realizar uma investigação abrangente. Por meio da caracterização morfológica, sequenciamento de DNA e testes de patogenicidade, buscou-se elucidar quais espécies de fungos da família Botriospheraceae estão associadas aos sintomas de morte descendente e podridão de frutas em jaqueira e cupuaçuzeiro.

2. Revisão Bibliográfica.

2.1. A cultura do cupuaçu distribuição e importância econômica.

O cupuaçuzeiro, pertencente à família Malvaceae, é uma árvore frutífera nativa da Amazônia, cultivada nos estados do trópico úmido amazônico brasileiro (ALVES et al., 2022). Essa frutífera possui significativa importância socioeconômica, sendo amplamente cultivada para a produção de sucos e geleias. Na região amazônica, destaca-se como uma das principais frutíferas, com ênfase nos Estados do Pará e Amazonas, que concentram a maior produção de frutos (SILVA; PIERRE, 2021).

O fruto dessa espécie pode ser aproveitado de diversas formas, destacando- se a polpa e as amêndoas encontradas no seu interior. A polpa é particularmente notável com características de uma essência intensa, acidez marcante, aroma ativo e sabor muito agradável. É amplamente apreciada pela população local e representa uma valiosa matéria prima para a indústria alimentícia, sendo utilizada na produção de sucos, compotas, tortas,sorvetes, bolos, cremes, geleias, licores, picolés, iogurtes, entre outros (PUGLIESE et al., 2013; ALVES et al., 2022).

Com a crescente demanda pela polpa do cupuaçu, foram adotadas técnicas de propagação mais eficientes que permitiram a expansão da cultura para diversas localidades. Esse movimento transformou a fruteira, antes vinculada ao sistema extrativista, em uma monocultura (CRUZ, 2007; NASCIMENTO et al., 2018). Esse incentivo à expansão da cultura refletiu-se nos números de produção, alcançando, no Brasil, em 2017, um valor da produção de R$ 54,822,00, em uma área colhida que totalizava 13,504 hectares e uma produção anual de 21,240 toneladas. O estado da Bahia se destacou como o maior produtor, atingindo 6.297 toneladas (IBGE, 2017).

2.1.1. A cultura da jaca, distribuição e importância econômica.

A jaqueira (*Artocarpus heterophyllus* Lam.), pertencente à Família Moraceae, é originária da Índia (ADIKARAM et al., 2020) e encontra-se amplamente distribuída em várias regiões da Índia. Além disso, é comumente encontrada em residências e cultivada em países tropicais e subtropicais, destacando-se o Brasil, Indonésia, Tailândia, Sri Lanka, Bangladesh, Birmânia, Filipinas e Malásia (MADRUGA, et al., 2014; ZHANG et al., 2017; ADIKARAM et al., 2020; SREEJA DEVI et al., 2021).

A jaqueira encontra-se distribuída em várias partes do Brasil, desde a região Sudeste até a região Norte (MADRUGA et al., 2014.; SOUZA, et al., 2020), sendo mais comum no Nordeste, principalmente nos estados da Bahia até a Paraíba (SOUSA et al., 2021). A produtividade dessa frutífera é considerada alta, atingindo até 25,71 t ha^{-1} (LOIZZO et al., 2010), o que confere um significativo potencial econômico para a indústria alimentícia e agroindustrial (SWAMI; KALSE, 2018). A polpa do fruto é utilizada na produção de sucos, refrigerantes, geleias, sendo também consumida *in natura* (SOUSA et al., 2021).

Dentre as frutas consumidas mundialmente, a jaca ainda busca sua aceitação entre os consumidores pelo seu sabor vigoroso (LOIZZO et al., 2010) e, devido a esse cenário, não há dados oficiais sobre a produção dessa fruta em alguns estados brasileiros (SOUSA et al., 2021). Morfologicamente, a jaca apresenta numerosas pontas resistentes (BALIGA, et al., 2011), são espinhosas e têm formato oval (HAQUE et al., 2015), podem alcançar pesos elevados, isto é, até 50 quilogramas (LOIZZO et al., 2010; SREEJA DEVI et al., 2021). A comercialização desses frutos para o consumidor final ocorre predominantemente de maneira informal, em feiras livres ou mesmo à beira de estradas. A jaca atrai devido ao seu sabor e aroma envolventes, além de ser uma excelente fonte de nutrientes, proteínas, sais minerais, vitaminas e fibras, em comparação outras frutas (BALIGA, et al., 2011, SOUSA et al., 2021).

2.1.2. Principais doenças na cultura do cupuaçu.

Um dos desafios significativos enfrentados pelos produtores da agricultura extensiva e intensiva está relacionado aos problemas causados por fatores bióticos e abióticos. A maneira como a cultura do cupuaçuzeiro é plantada e manejada pode influenciar a ocorrência de doenças associadas a fatores bióticos *(*ALVES et al., 2018*).* As técnicas de manejo físico, como a podas das plantas, podem criar ferimentos na estrutura das plantas, tornando-as vulneráveis e abrindo caminho para a entrada de patógenos. Os ferimentos no caule, em particular, representam uma das vias de entrada para os fungos do gênero *Lasiodiplodia*, causadores de infecção e seca dos ponteiros em cupuaçuzeiro *(*ALVES et al., 2018; SOUZA, 2007).

Com a expansão contínua da cultura cupuaçu, os problemas fitossanitários causados por fungos têm ocorrido com mais intensidade. Dentre as doenças mais importantes, destaca-se a vassoura de bruxa (*Moniliophora perniciosa*), que causa

danos significativos na produção comercial da cultura do cupuaçu (MATA et al., 2022). Nas áreas de produção de cupuaçuzeiro, têm-se observado dados expressivos, indicando que essa doença é considerada uma das mais relevantes para essa fruteira (OLIVEIRA et al., 2013). Em árvores de cupuaçuzeiro, têm sido identificadas plantas com sintomas de seca dos ponteiros, às vezes acompanhados por sintomas de cancro (ALVES et al., 2018). Recentemente, foi detectado o patógeno quarentenário Moniliase (*Moliniophora roreri*) em áreas de produção de cupuaçuzeiro no Estado do Acre. Isso demanda a adoção de medidas de controle, como a fiscalização para impedir a disseminação do patógeno, além da eliminação de plantas com sintomas, seguida pela queima dos restos vegetais (MAPA, 2022).

A morte progressiva ou seca dos ponteiros do cupuaçu foi inicialmente identificada no Estado do Amazonas, atribuindo o patógeno responsável como *L. theobromae* (LIMA et al., 1991). No entanto, técnicos e produtores frequentemente confundem a seca dos ponteiros, pois os sintomas se manifestam inicialmente na região meristemática da planta. No início, essa doença era considerada secundária, mas, ao longo da década de 1990, tornou-se um problema fitossanitário significativo em áreas de cultivo de cupuaçu, refletindo em prejuízos econômicos. O aumento na incidência da doença pode estar relacionado às mudanças climáticas, pois é sabido que estresses hídrico e térmico favorecem a ocorrência e severidade de doenças causadas por fungos da família Botryosphaeriaceae. Portanto, é difícil determinar se as condições ambientais locais podem influenciar a patogenicidade do fungo. No entanto, foi comprovado que plantas submetidas a estresse, como déficit hídrico e alta temperaturas, tornam-se predispostas a infeções por fungos da família Botriospheraceae (ALVES et al., 2018; GHINI, 2007).

2.2. Principais doenças na cultura da jaca.

Apesar de a cultura da jaqueira representar uma importante fonte de alimentos, principalmente para pequenos produtores, ela enfrenta desafios fitossanitários significativos. No Brasil, existe registro de problemas bióticos com a cultura, sendo a morte descendentes um desses problemas. Tanto em culturas agrícolas quanto florestais, a produtividade pode ser afetada por fatores abióticos e bióticos.

A jaqueira, uma árvore frutífera (BALIGA et al., 2011), é uma espécie hospedeira de diversos patógenos fúngicos. Durante seu processo fenológico de

floração e frutificação da planta, as espécies fúngicas *Rhizopus stolonifer, R. oryzae* ou *R. artocarpi* são os agentes causais da podridão dos frutos de *Rhizopus*. Essa condição é mais prevalente em regiões com condições quentes e úmidas. Nos estágios avançados da doença, os frutos afetados apresentam coloração preta, encolhidos e, ocasionalmente, mumificados (ADIKARAM et al., 2020).

A podridão causada pelo *Rhizopus* é um sério problema fitossanitário na cultura da jaca, resultando em perdas significativas na produtividade e no rendimento dos frutos. A espécie fúngica *R. artocarpi* é identificada como a responsável por afetar aproximadamente 80% das áreas estudadas, levando à queda de frutos imaturos (KHAN et al., 2021). Além disso, o *Lasiodiplodia theobromae* foi registrado na jaqueira, causando podridão em frutos de jaca em Taiwan (NI et al., 2008). Outros fungos, como o *Rhizopus arrhizus* e *Sclerotinia*, são agentes causais de podridão mole. Para esses dois últimos, a identificação é relativamente fácil de ser realizada, uma vez que ambos produzem estruturas visíveis. O agente etiológico da podridão mole se manifesta na epiderme dos frutos, apresentando sintomas de amarelecimento no pericarpo antes de atingirem a maturação fisiológica completa (TIZANADO et al., 2018).

2.3. *Lasiodiplodia*: Morfologia, sintomatologia e gama de hospedeiro.

O gênero *Lasiodiplodia* apresenta diferentes variações culturais, sendo que a maioria das espécies apresenta crescimento rápido. O micélio inicial é branco, tornando-se cinza escuro com o envelhecimento. As características distintivas de *Lasiodiplodia* incluem picnídios simples ou em grupos, estomáticos, estiolados, subovoides para elipsoides- oblongos, com paredes espessas e base truncada. Após a extrusão dos picnídios, há a liberação de massas de esporos de coloração negra. Os conídios maduros de *L. theobromae* são bicelulares, de coloração negra e possuem estrias longitudinais. Quando presentes, as paráfises são hialinas e cilíndricas. Os conídios imaturos são hialinos, com paredes duplas e formato oblongo (LIMA et al., 2013; LIMA et al., 2014).

Embora a caracterização morfológica seja necessária na identificação de isolados de *Lasiodiplodia*, essa técnica não é precisa para discriminar as espécies, devido à semelhança dos marcadores morfológicos na maioria delas (COUTINHO et al., 2017). Além disso, outro gênero da família Botriopheraceae, como é o caso do

gênero *Neidhiquedonia*, apresenta características morfológicas semelhantes aos conidios de *Lasiodiplodia* (PHILLIPS et al., 2013).

Lasiodiplodia theobromae é o agente etiológico responsável pela seca de ponteiros, gomose e resinose em várias espécies arbóreas, especialmente em plantas frutíferas. Na cultura do cajueiro, essa doença tornou-se um dos principais problemas fitossanitários na região semiárida do nordeste brasileiro, devido aos danos e perdas associados (NETTO et al., 2014). Além disso, observou-se que esse fungo causa sintomas como podridão de frutos em diferentes espécies de fruteiras, destacando-se a podridão em frutas do mamoeiro (NETTO et al., 2014). Em espécies de interesse florestal, foi observada a associação de cancros (ÚRBEZ-TORRES et al., 2016). Apesar de menos comuns, outros sintomas, como manchas foliares e crestamento, foram observados, sendo causados por espécies de *Lasiodiplodia*.

Lasiodiplodia theobromae é uma espécie fúngica conhecida por causar infecções e doenças em diversas plantas frutíferas e arbóreas. Inicialmente, era considerado um patógeno com baixa severidade em seus hospedeiros. No entanto, alguns estudos demostraram que ele se tornou um dos principais patógenos em espécies arbóreas, resultando em doenças como cancro, gomose, lesões necróticas, morte de galhos, queda de caules, amarelecimento da folhagem, apodrecimento de sementes e frutos. Essas lesões podem levar à obstrução dos tecidos vasculares, resultando na mortalidade das plantas infectadas ou na diminuição da produtividade das frutíferas tropicais no Brasil (ABDOLLAHZADEH et al. 2010; COUTINHO et al., 2017; MARQUES et al., 2013; NETTO et al., 2014).

Lasiodiplodia theobromae é um patógeno amplamente distribuído em regiões tropicais e subtropicais, caracterizando-se por causar infecções com alto índice de severidade em quase 500 plantas hospedeiras. Sua natureza polífaga e cosmopolita o torna prevalente em diversas localidades (BURGESS et al. 2006; MARQUES et al., 2013). Estudos filogenéticos realizados em plantas do gênero *Spondias* demonstram que o fungo *L. theobromae* é capaz de causar infecções em todas as espécies cultivadas, apresentando uma heterogeneidade nos níveis de severidade da doença, variando de acordo com a suscetibilidade do hospedeiro (COUTINHO et al., 2017; LIMA et al., 2013).

O gênero *Lasiodiplodia* engloba várias espécies fúngicas que foram identificadas em (*Mangifera indica*) em vários países. A espécie fúngica *L.*

theobromae, em particular, foi identificada nos Estados Unidos da América, África do Sul, Austrália, Irã, Egito e no Brasil (MARQUES et al., 2013).

2.4. Filogenia do gênero *Lasiodiplodia.*

A filogenia molecular desempenha um papel crucial e contribui significativamente para as estratégias de taxonomia no gênero *Lasiodiplodia*. Estudos iniciais aplicaram o sequenciamento do gene ITS, permitindo, assim, a distinção entre *L. theobromae* de *L. gonubiensis* por meio de análise filogenética (PAVLIC el al., 2004). Dada a diversidade de espécies dentro da família *Botryosphaeriaceae* e as espécies crípticas do gênero *Lasiodiplodia*, o sequenciamento gênico é fundamental para a construção de filogenias multigênicas. Sequências de DNA dos espaçadores transcritos internos (ITS) do rDNA genômico (ALVES et al., 2008; PAVLIC et al., 2004), juntamente com genes codificadores de proteínas, como o fator de alongamento de tradução 1-α (*TEF1*-α) e β-tubulina (βtub), são utilizadas para distinguir de forma confiável as espécies do gênero *Lasiodiplodia* (BURGESS et al. 2006; ALVES et al. 2008; PAVLIC et al. 2008; ABDOLLAHZADEH et al. 2010; URBEZ-TORRES et al., 2012; MARQUES et al., 2013; PHILLIPS et al., 2013; NETTO et al., 2014). Exemplo disso foi a identificação pela filogenia multilocus de seis espécies de *Lasiodiplodia* causadoras de seca dos ponteiros e resinose em cajueiro, quando acreditava-se inicialmente que a espécie envolvida fosse *L. theobromae* (NETTO et al., 2017).

2.4.1. A importância da pesquisa.

No Brasil, estudos relacionados à identificação de fitopatógenos de etiologia fúngica no cupuaçuzeiro e jaqueira são escassos. Mesmo assim, as pesquisas que abordam a identificação de fitopatógenos foram conduzidas por meio de caracterização morfológica, uma técnica considerada falha e imprecisa na correta identificação. Nos últimos anos, em alguns patossitemas causados por fungos da família Botriopheraceae, observou-se a presença de mais de um patógeno associado a um determinado sintoma. Diante disso, esta pesquisa tem como objetivo identificar os agentes etiológicos responsáveis pela podridão de frutos e seca de ponteiros na jaqueira, bem como a seca dos ponteiros em cupuaçuzeiro através da analíse de marcadores morfológicos e da análise filogenética dos isolados fúngicos obtidos na pesquisa.

3. Referências.

ABDOLLAHZADEH, J.; JAVADI, A.; GOLTAPEH, E. M.; ZARE, R.; PHILLIPS, A. J. L. 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.

ADIKARAM, N., MANAWADU, L., JAYASINGHE, L., YAKANDAWALA, D. First report of *Lasiodiplodia theobromae* rot in ripe jack fruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) in Sri Lanka. **Indian Phytopathology**, v. 73, n. 3, p. 583-585, 2020.

ALVES, A.; CROUS, P.W.; CORREIA, A.; PHILLIPS, A. J. L. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. **Fungal diversity**, v. 28, p. 1-13, 2008.

ALVES, J. L. F.; DA SILVA, J. C. G.; MUMBACH, G. D.; DI DOMENICO, M.; BOLZAN, A.; MACHADO.; R. A. F.; MARANGONI, M. Evaluating the bioenergy potential of cupuassu shell through pyrolysis kinetics, thermodynamic parameters of activation, and evolved gas analysis with TG/FTIR technique. **Thermochimica Acta**, v. 711, p. 179-187, 2022.

ALVES, R. M.; CHAVES, S. F. DA. S.; NEGRÃO, L. M. V. Viabilidade técnica do uso de *Swietenia macrophylla* e *Theobroma grandiflorum* em sistema agroflorestal. **Ciência Florestal**, v. 32, p. 617-636, 2022.

ALVES, R. M.; RUTH LINDA BENCHIMOL, R. L.; OLIVEIRA, R. P. DE.; CHAVES, S. F. DA. S. Resistência de genótipos de cupuaçuzeiro a *Lasiodiplodia theobromae*. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2018b. (Embrapa Amazônia Oriental. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 128). **Available at:< Available at: https://ainfo. cnptia. embrapa. br/digital/bitstream/item/187910/1/TC-04-18-BPD-128-V03. pdf>. Accessed on: Nov**, v. 18, p. 19, 2020.

BALIGA, M. S.; SHIVASHANKARA, A. R.; HANIADKA, R.; DSOUZA, J.; BHAT, H. P. Phytochemistry, nutritional and pharmacological properties of *Artocarpus heterophyllus* Lam (jackfruit): A review. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1800-1811, 2011.

BURGESS, T. I.; BARBER, P. A.; MOHALI S.; PEGG. G.; CERVEJA, G. DE.; WINGFIELD, M. J. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. **Mycologia**, v. 98, n. 3, p. 423-435, 2006.

CIPRIANO, A. K. L.; GONDIM, D. M. F.; VASCONCELOS, I. M.; MARTINS, J. A. M.; MOURA, A. A.; MORENO, F. B.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; MELO, J. G. M.; CARDOSO, J. E.; PAIVA, A. L. S.; OLIVEIRA, J. T. A. Proteomic analysis of responsive stem proteins of resistant and susceptible cashew plants after *Lasiodiplodia theobromae* infection. **Journal of proteomics**, v. 113, p. 90-109, 2015.

COUTINHO, I. B. L.; FREIRE, F. C. O.; LIMA, C. S.; LIMA, J. S.; GONÇALVES, F. J. T.; MACHADO, A. R.; SILVA, A. M. S.; CARDOSO, J. E. Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. **Plant Pathology**, v. 66, n. 1, p. 90-104, 2017.

CRUZ, E. D. Secagem e germinação de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Wiild. ex Spreng.) Schum.-sterculiaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, p. 197-201, 2007.

HAQUE, M. A.; BEGUM, R.; SHIBLY, A. Z.; SULTANA, M. M.; KHATUN, A. Influence of jackfruit pulp on the quality and shelf life of jackfruit cake. **Journal of Environmental Science and Natural Resources**, v. 8, n. 1, p. 59-64, 2015.

IBGE. Produção de Cupuaçu, 2017. Disponivel em: https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/cupuacu/br. Acesso em 11de novembro. 2022

KHAN, A. U.; CHOUDHURY, M. A. R.; MALEQUE, M. A.; DASH, C. K.; TALUCDER, M. S. A.; MAUKEEB, A. R. M.; EMA, I. J.; ADNAN, M. Management of insect pests and diseases of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* L.) in agroforestry system: A review. **Acta Entomology and Zoology**, v. 2, n. 1, p. 37-46, 2021.

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, n. 2, p. 81-88, 2013.

LIMA, J. S.; ALVES, E. S.; MELO, J. G. M.; MOREIRA, R. C.; MARTINS, M. V. V.; VIANA, F. M. P.; CARDOSO, J. E. Caracterização cultural e patogenicidade de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* em plantas de cajaraneira. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 13, n. 4, p. 296-302, 2014.

LIMA, M. I. P. M.; DE SOUZA, A. DAS G. C.; GASPAROTTO, L.; GUIMARAES, R. R. Morte progressiva do cupuaçuzeiro. **EMBRAPA-CPAA**, n. 02, p.1-3, 1991.

LOIZZO, M. R.; TUNDIS, R.; CHANDRIKA, U. G.; ABEYSEKERA, A. M.; MENICHINI, F.; FREGA, N. G. Antioxidant and antibacterial activities on foodborne pathogens of *Artocarpus heterophyllus* Lam. (Moraceae) leaves extracts. **Journal of food Science**, v. 75, n. 5, p. M291-M295, 2010.

MADRUGA, M. S.; ALBUQUERQUE, F. S. M. DE.; SILVA, I. R. A.; AMARAL, D. S. DO.; MAGNANI, M.; NETO, V. Q. Chemical, morphological and functional properties of Brazilian jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* L.) seeds starch. **Food chemistry**, v. 143, p. 440-445, 2014.

MANAWASINGHE, I. S.; PHILLIPS, A. J. L.; HYDE, K.D.; CHETHANA, K. W. T.; ZHANG, W.; ZHAO, W. S.; YAN, J. Y.; LI, X. H. Mycosphere Essays 14: Assessing the aggressiveness of plant pathogenic Botryosphaeriaceae. **Mycosphere**, v. 7, n. 7, p. 883-892, 2016.

MARQUES, M. W.; LIMA, N. B.; MORAIS JUNIOR, M. A. DE.; BARBOSA, M. A. G.; SOUZA, B. O.; MICHEREFF, S. J.; PHILLIPS, A. J. L.; CÂMARA, M. P. S. Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, v. 61, n. 1, p. 181-193, 2013.

MATA, R. R. DA.; **SANTOS, G. A. N. DOS.; PINHEIRO, E. C. M.; SANTOS, S. I. DOS.** Severidade da vassoura-de-bruxa em Cupuaçuzeiro em condições de campo: Severity of witches' broom on Cupuaçu under field conditions. **Brazilian Journal of Development**, v.8, n.11, p. 74102-74115, 2022

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

MAPA. Mapa declara quarentena ao estado do Amazonas para conter a monilíase do cacaueiro. **Disponivel em: Mapa declara quarentena ao estado do Amazonas para conter a monilíase do cacaueiro — Ministério da Agricultura e Pecuária (www.gov.br)**. Acesso em 10 de agosto de 2022.

NASCIMENTO, E. P.; CAMPOS, M. C. C.; ALHO, L. C.; SILVA, D. M. P.; WECKHER, F. C.; MANTOVANELLI, B. C.; CUNHA, J. M. Crescimento das mudas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) sob efeito de diferentes composições debiofertilizantes. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 15, n. 2, p. 861-870,2018.

NI, H. F.; CHEN, R. S.; CHANG, S. F.; YANG, H.R. First report of *Lasiodiplodia* fruit rot of jackfruit in Taiwan. **Plant Disease**, v. 92, n. 7, p. 1137-1137, 2008.

NETTO, M. S. B.; ASSUNÇÃO, I. P.; LIMA, G. S. A.; MARQUES, M. W.; LIMA, W. G.; MONTEIRO, J. H. A.; BALBINO, V. Q.; MICHEREFF, S.J.; PHILLIPS, A. J. L.; CÂMARA, M. P. S. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. **Fungal Diversity** 67, 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**, v. 121, n. 4, p. 437-451, 2017.

OLIVEIRA, M. L. DE.; NIELLA, A. R. R.; SILVA, V. R.; LIMA, L. C. Murcha de *ceratocystis*, nova doença do cupuaçuzeiro, **Agrotrópica**, v. 25, p. 33 – 38, 2013.

PAVLIC, D.; WINGFIELD, M. J.; BARBER, P.; SLIPPERS, B.; HARDY, G. E. S. J. H.; BURGESS, T. I. Seven new species of the Botryosphaeriaceae from baobab and other native trees in Western Australia. **Mycologia**, v. 100, n. 6, p. 851-866, 2008.

PHILLIPS, A. J. L., HYDE, K. D., ALVES, A., LIU, J. K., J. Families in Botryosphaeriales: a phylogenetic, morphological and evolutionary perspective. **Fungal diversity, v.** 94, p. 1-22, 2018.

PHILLIPS A. J. L.; ALVES A.; ABDOLLAHZADEH J.; B. SLIPPERS4, M.J. WINGFIELD, J.Z. GROENEWALD, CROUS, P. W. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. **Studies in Mycology, v.** 76, p. 51–167, 2013.

PUGLIESE, A. G.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; TRUCHADO, P.; GENOVESE, M. I. Flavonoids, proanthocyanidins, vitamin C, and antioxidant activity of *Theobroma grandiflorum* (Cupuassu) pulp and seeds. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 11, p. 2720-2728, 2013.

SILVA, L. S.; PIERRE, F. C. Aplicabilidade do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (willd. Ex spreng.) Schum.) em produtos e subprodutos processados. **Tekhne e Logos**, v. 12, n. 1, p. 19-33, 2021.

SOUSA, A. P. M. DE.; CAMPOS, A. R. N.; GOMES, J. P.; COSTA, J. D.; MACEDO, A. D. B. DE.; SANTANA, R. A. C. DE. Cinética de secagem de resíduos de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). Research, **Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e31510212610-e31510212610, 2021.

SOUZA, A. G. C. Boas práticas agrícolas da cultura do cupuaçuzeiro. Manaus: **Embrapa Amazônia Ocidental**, p. 56, 2007.

SOUZA, H. M. DOS S.; SILVA, E. M. DA.; SOUZA, T. R. DE. L.; MENDES, M. L. M.; MESSIAS, C. M. B. DE. O. Potencialidade da polpa e dos resíduos da jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) na elaboração de um doce sustentável. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 11, p. 87251-87269, 2020.

SREEJA DEVI, P. S.; KUMAR, N. S.; SABU, K. K. Phytochemical profiling and antioxidant activities of different parts of *Artocarpus heterophyllus* Lam. (Moraceae): A review on current status of knowledge. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, p. 1-7, 2021.

SWAMI, S. B.; KALSE, S. B. Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*): Biodiversity, Nutritional Contents, and Health. **Bioactive molecules in food**, p. 1-23, 2018.

TAVARES, S. C. C de H. Epidemiologia e manejo integrado de *Botryodiplodia theobromae*-situação atual no Brasil e no mundo. **Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE). Fitopatologia Brasileira, Brasília, DF**, v. 27, p. 46-52, 2002.

TAVARES, S. C. C. H.; MENEZES, M.; CHOUDHURY, M .M. Infecção da mangueira por *Botryodiplodia theobromae* Lat. na região semiárida de Pernambuco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 13, n.4, p.163-166. 1991.

TIZNADO, M. DE L. A. M.; ESQUIVEL, G. L.; CAMPOS, O. J. C.; GUERRERO, L. G. R.; VELASCO, C. R. *Lasiodiplodia theobromae* agente causal de la pudrición blanda de frutos de *Artocarpus heterophyllus* Lam. en Nayarit, México. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, p. e-018, 2018.

YANG, T.; GROENEWALD, J. Z.; CHEEWANGKOON, R.; JAMI, F.; ABDOLLAHZADEH, J.; LOMBARDO, L.; CROUS, P. W. Families, genera, and species of Botryosphaeriales. **Fungal Biology**, v. 121, n. 2, p. 322-346, 2017.

ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; XU, F.; WU, G.; TAN, L. Molecular structure of starch isolated from jackfruit and its relationship with physicochemical properties. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 13423, 2017.

Capítulo I

Primeiro relato de *Lasiodiplodia venezuelensis e Pseudofussicoccum* sp causando seca dos ponteiros em cupuaçuzeiro

Resumo

Em árvores de cupuaçuzeiro, é frequente a observação de plantas com sintomas de seca dos ponteiros e cancros. Entre os gêneros de fungos que provocam estes sintomas, vale destacar os fungos da família Botriospheraceae, sendo *Lasiodiplodia* um patógeno comum associado, causando ambos os sintomas. Os fungos que causam a seca dos ponteiros, geralmente, colonizam as extremidades dos ramos, migrando posteriormente para a região inferior do ramo. Esses sintomas tendem a diminuir o desenvolvimento das plantas, principalmente em períodos com baixa precipitação. Ramos de plantas de cupuaçuzeiro com sintomas de seca dos ponteiros foram coletados, resultando no isolamento de *Lasiodiplodia e Pseudofusiccocum.* Os isolados foram cultivados em aveia ágar com fragmentos de acículas de pinheiro para induzir a formação de picnídios. Tanto os isolados de *Lasiodiplodia* quanto de *Pseudofussicoccum* produziram picnídios em acículas de Pinus, nos quais foram observados esporos imaturos unicelulares e hialinos. Já nos picnídios maduros, foram identificados conídios bicelulares, escuros e com estrias longitudinais. Os conídios do isolado de *Pseudofussicoccum* apresentaram formato cilíndrico com base truncada. Para a identificação dos isolados de *Lasiodiplodia*, foi extraído o DNA de dois isolados, seguido pela realização de PCR dos genes ITS e Fator de Elongação. A análise filogenética revelou que esses isolados se agruparam com um isolado de referência de *Lasiodiplodia venezuelensis*. Todos os isolados induziram sintomas de cancro e escurecimento do lenho em mudas de cupuaçuzeiro. Este é o primeiro relato de *Lasiodiplodia venezuelensis* e *Pseudofusicoccum* sp. causando seca dos ponteiros em cupuaçu no Brasil.

Palavras-chave: Botriospheraceae; *Lasiodiplodia, Theobroma grandiflorum*;

Chapter I

First Report of *Lasiodiplodia venezuelensis* and *Pseudofusicoccum* sp. Causing Tip Blight and Cankers in *Theobroma grandiflorum* (Cupuaçu) in Brazil

Abstract

In cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) trees, tip blight and cankers are commonly observed symptoms. Fungi from the family Botryosphaeriaceae are notable pathogens responsible for these symptoms, with *Lasiodiplodia* being a frequent culprit. These fungi typically colonize the tips of branches and later spread to the lower parts. Such symptoms can adversely affect plant development, particularly during periods of low precipitation. In this study, branches from cupuaçu plants exhibiting tip blight were collected, leading to the isolation of *Lasiodiplodia* and *Pseudofusicoccum*. The isolates were cultured on oatmeal agar with pine needle fragments to induce pycnidia formation. Both *Lasiodiplodia* and *Pseudofusicoccum* isolates produced pycnidia on *Pinus* needles, with unicellular, hyaline, immature spores observed. Mature pycnidia contained dark, bicellular conidia with longitudinal striations. The conidia of the *Pseudofusicoccum* isolate were cylindrical with a truncated base. DNA extraction from two *Lasiodiplodia* isolates followed by PCR of the ITS and Elongation Factor genes revealed that these isolates clustered with a reference isolate of *Lasiodiplodia venezuelensis*. All isolates induced canker symptoms and darkening of the wood in cupuaçu seedlings. This is the first report of *Lasiodiplodia venezuelensis* and *Pseudofusicoccum* sp. causing tip blight in cupuaçu in Brazil.

Keywords: Botryosphaeriaceae; *Lasiodiplodia*, *Theobroma grandiflorum.*

1. Introdução.

O Cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) é uma fruteira nativa da Amazônia (ALVES et al., 2022), apreciada pela população local devido aos seus frutos, que são matéria-prima para a produção de sucos, sorvetes, geleias e iogurtes (PUGLIESE et al., 2013). O expressivo aumento na procura pela polpa do fruto tem impulsionado o crescimento da cultura ao longo dos anos (CRUZ, 2007; NASCIMENTO et al., 2018). Atualmente, já se observa a presença de pomares comerciais nos estados do Pará e Amazonas (ALVES et al., 2022). Com o crescimento da cultura, surgiram problemas fitossanitários causados por fungos, sendo a vassoura de bruxa (*Moniliophora perniciosa*) e a morte descendente, conhecida com outros nomes como seca dos ponteiros (*Lasiodiplodia theobromae*), as doenças mais preocupantes. Recentemente, a temida Moniliase (*Moliniophora roreri*) foi detectada em áreas de produção de cupuaçuzeiro no Acre (MAPA, 2022).

A morte progressiva ou seca descendente do cupuaçu foi inicialmente detectada no estado do Amazonas, onde os pesquisadores reconheceram o patógeno como *L. theobromae*. No entanto, é importante ressaltar que a identificação do patógeno foi realizada por meio da avaliação de marcadores morfológicos (LIMA et al., 1991). Com frequência, técnicos e produtores confundem a morte descendente devido aos sintomas que surgem primeiramente na região meristemática. Nos registros iniciais dessa condição, ela era classificada como secundária; no entanto, atualmente, emergiu como uma preocupante questão fitossanitária em regiões de cultivo de cupuaçu, acarretando prejuízos econômicos. O aumento na evolução da doença está provavelmente associado a mudanças climáticas. Consequentemente, torna-se difícil compreender se o ambiente local poderá afetar a patogenicidade do fungo de forma direta ou indireta, dependendo das condições climáticas. Normalmente, os patógenos fúngicos causam doenças nas plantas quando estas enfrentam algum tipo de estresse, seja por alterações ambientais ou deficiência nutritiva (ALVES et al., 2018).

Diversas frutíferas de grande importância econômica no Brasil e em todo o mundo servem como hospedeiras para o fungo *L. theobromae*, incluindo: mangueira (*Mangifera indica* L), cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), abacate (*Persea americana* Mill.), acerola (*Malpighia glabra* L.), banana (*Musa* spp.), citrinos (*Citrus* spp.), goiabeira (*Psidium guajava* L.), gravioleira (*Annona muricata* L.), mamoeiro

(*Carica papaya* L.), maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims) e melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) (MARQUES et al., 2013; COUTINHO et al., 2017, NETTO et al., 2014; TAVARES, 2002).

No Brasil, o primeiro registro da ocorrência de seca dos ponteiros foi feito em árvores de *M. indica*, sendo identificado *Botryodiplodia theobromae* (Sin: *L. theobromae* (TAVARES et al.,1991). Posteriormente, através do uso de ferramentas de biologia molecular, foi confirmado que o agente da seca dos ponteiros da mangueira é representado por um complexo de espécies de *Lasiodiplodia*, identificadas como: *Lasiodiplodia crassispora*, *Lasiodiplodia egyptiacae*, *Lasiodiplodia hormozganesis*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Lasiodiplodia pseudotheobromae* e uma nova linhagem filogenética (MARQUES et al., 2013). Além disso, outros gêneros da família Botriospheraceae, como *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Neocytalidium* e *Pseudofusicoccum*, também foram identificados (MARQUES et al., 2013).

Devido à relevância da seca dos ponteiros ser uma ocorrência comum em áreas de cultivo de cupuaçuzeiro e, considerando que, até o momento, a etiologia do agente causador não foi completamente compreendida, esta pesquisa tem como objetivo identificar o verdadeiro patógeno associado às árvores de cupuaçuzeiro. Utilizando avaliações de marcadores morfológicos, análise filogenética e testes de patogenicidade, busca-se esclarecer a natureza do agente etiológico dessa doença.

2. Material e Métodos.

2.1. Coleta e obtenção dos isolados.

No período de 2021 a 2023, foram coletados ramos de plantas de cupuaçuzeiro que apresentavam sintomas da seca dos ponteiros em áreas de produção de cupuaçu, localizadas nos municípios de Cruzeiro Sul - AC, Mâncio Lima – AC, Rodrigues Alves - AC e Guajará - AM.

Foram obtidos fragmentos de ramos com aproximadamente 5 mm de comprimento, da região de transição entre o tecido doente e o tecido saudável. Esses fragmentos foram desinfestados utilizando etanol 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio a 2,0% por 1 minuto, seguido por três lavagens com água destilada estéril. O excesso de água dos fragmentos desinfestados foi removido usando papel filtro esterilizado. Em seguida três fragmentos foram transferidos para placas de Petri de 90,0 mm contrnfo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA).

As placas foram incubadas a 25ºC, com um fotoperíodo de 12 horas, durante três a quatro dias. Após a incubação, fragmentos de micélio foram transferidos para uma nova placa contendo BDA e incubadas a 25ºC, com um fotoperíodo de 12 horas.

Os isolados foram preservados pelo método castelanni, no qual discos contendo meio BDA contendo estruturas vegetativas e reprodutivas do fungo foram armazenados em água destilada esterilizada, em microcubos de 2 ml. Após a caracterização, os isolados foram enviados para depósito na coleção de fungos fitopatogênicos Maria Menezes (CMM), na Universidade Federal Rural de Pernambuco.

2.2. Caracterização morfocultural.

Os isolados foram caracterizados quanto à morfologia da colônia, incluindo aspectos como micélio, coloração e produção de picnídios. Discos de 5,0 mm do meio de cultura BDA, contendo estruturas do fungo, foram retirados da periferia das colônias após sete dias de crescimento. Esses discos foram transferidos para placas de petri de 90 mm contendo meio de cultura BDA e incubados em câmara B.O.D à 25 ± 1°C. O crescimento das colônias foi medido a cada 24 horas com o auxilio de uma régua milimetrada, avaliando o diâmetro em dois sentidos perpendiculares entre si. As medições foram realizadas até que o fungo atingisse a borda da placa. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, composto por dois tratamentos (dois isolados) e cinco repetições, sendo cada placa considerada uma unidade experimental (SLIPPERS et al., 2005).

Para avaliar as características de conídios e picnídios, os isolados foram cultivados em meio de cultura aveia-ágar, com fragmentos de acículas de *Pinus* sobre a superfície do meio. Um disco de BDA contendo micélio do fungo foi transferido para o centro da placa. As características dos conídios foram observadas em meio de cultura BDA acrescido de acículas de pinheiro autoclavadas; as placas com os isolados foram incubadas por quatro semanas a 25ºC, com um fotoperíodo de 12 horas para induzir o desenvolvimento de picnídios (NETTO et al., 2014). O comprimento e largura de 20 conídios de cada isolado foram mensurados utilizando um microscópio ótico com câmera digital e o 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, EUA).

2.3. Teste de patogenicidade.

Para avaliar a patogenicidade dos isolados, foram utilizadas mudas de cupuaçu com seis meses de idade. As plantas foram inoculadas na região mediana do caule, cujo diâmetro era de aproximadamente 8,0 mm. Cada isolado foi inoculado em quatro plantas, e duas plantas foram utilizadas como controle não inoculado. A inoculação dos isolados seguiu a metodologia descrita por Gonçalves et al. (2016). Um corte, realizado com estilete esterilizado, permitiu o deslocamento da casca e a exposição do lenho no caule. Em cada corte, foi inserido um disco de meio de cultura BDA de 5,0 mm de diâmetro contendo estruturas vegetativas do fungo, previamente incubado por seis dias. Durante cada inoculação, procurou-se garantir o contato do disco contendo estruturas do patógeno com o lenho da planta. Em seguida, o inóculo foi coberto com a casca removida anteriormente e envolvido com parafilme. A testemunha foi inoculada com um disco estéril de meio de cultura BDA de 5,0 mm de diâmetro. O desenvolvimento dos sintomas foi avaliado ao longo de todo o período do experimento.

Após 75 dias da inoculação, as plantas foram avaliadas para verificar a presença de lesões internas. Os caules foram cortados longitudinalmente com o auxílio de um estilete. Fragmentos de tecidos sintomáticos foram submetidos ao procedimento descrito no item 2.1 para o isolamento indireto do patógeno. Fragmentos de tecido caulinar das plantas controle também foram submetidos à tentativa de isolamento. Os isolados fúngicos recuperados em meio BDA foram comparados com os isolados originais após o cultivo em meio de cultura ágar-água, contendo acículas de pinheiro estéreis para permitir a esporulação e confirmar a identidade do fungo.

2.4 Análise filogenética.

O DNA dos isolados foi extraído utilizando Wizard Genomic DNA Purification Kit® (Promega, Madison, WI, EUA). As regiões gênicas espaçador transcrito interno (ITS) e fator de enlogação-1α (EF-1α) dos isolados foram amplificadas utilizando os primers ITS1 e ITS4 e EF1-688F e EF1-1251R (ALVES et al., 2008), respectivamente. As reações de PCR foram conduzidas em um termociclador MyCycler TM (BIO-RAD), com as seguintes condições: 94°C por 1 min.; 34 ciclos: 94° por 30 s, 62°C por 45 s, 72°C por 1 min.; e uma etapa final de extensão final a 72°C por 5 min. (O'DONNELL et al., 1998). Os produtos da PCR foramsubmetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed (Biotium) e visualizados em um transiluminador. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando o Kit Wizard SV Gel and PCR Clean- Up System (Promega Brasil) e preparados para o sequenciamento de DNA. Os produtos da amplificação foram

sequenciados em ambas as direções, senso e antisenso, utilizando um sequenciador automático fornecido pela empresa ATCGene-LUDWIG. Os eletroferogramas resultantes foram visualmente analisados no programa SeqAssem ver. 07/2008 (SequentiX -Digital DNA Processing, Klein Raden, Alemanha) (HEPPERLE, 2011). As sequências editadas foram comparadas na base de dados do GenBank, National Center for Biotechnological Information – NCBI, por meio da ferramenta BLAST*n*. A Inferência Bayesiana foi conduzida por meio do programa MrBayes v 3.2.6 (RONQUIST; HUELSENBECK., 2003). O programa MrModelTest v 2.3 foi empregado para determinar os modelos de substituição nucleotídica mais apropriados para o alinhamento das sequências nucleotídicas individuais das regiões gênicas ITS e EF1-α. As análises foram realizadas utilizando o método de Monte Carlo via Cadeia de Markov (MCMC) - para gerar árvores filogenéticas com probabilidade posterior. As árvores foram amostradas aleatoriamente a cada 1000 gerações, descartando 25% das árvores iniciais. A edição das árvores foi realizada por meio do programa Figtree 3.1 (RAMBAUT, 2009). As sequências de referências das regiões ITS e EF-1α de espécies *de* Botryosphaeriaceae, disponíveis no GenBank, foram incorporadas nas análises.

3. Resultados

Em visitas fitossanitárias em áreas de cultivo de cupuaçuzeiro, foram observadas árvores com sintomas inicias de seca dos ponteiros, além disso, foram observados sintomas de cancros em árvores mais velhas. Ao seccionar ramos de árvores com sintomas de seca dos ponteiros, observou-se escurecimento do lenho (Figura 1).

As culturas de *Lasiodiplodia* isoladas inicialmente exibiram uma coloração branca que se transformou em tons de cinza escuro após sete dias de incubação. O crescimento inicial das culturas foi esparsamente distribuído, evoluindo para uma aparência cotonosa. Após 25 dias de incubação, foi observada a formação de picnídios nas acículas de *Pinus.* Aos 35 dias, notou-se a exsudação de esporos com coloração negra. Os conídios imaturos apresentaram características distintas, sendo hialinos, paredes duplas e unicelulares, com dimensões de 22-24 x 3,7-5-5 µm. Os conídios maduros, por sua vez, eram bicelulares, escuros, com presença de estrias longitudinais e medindo 23-26 x 4-6 µm. Por outro lado, a cultura de *Pseudofussicoccum* sp exibiu uma coloração inicialmente branca, que se transformou em cinza com o avançar da idade, acompanhada de um crescimento ralo. Os picnídios formados sobre as acículas de *Pinus* assumiram características semelhantes a estromas (Figura 2).

Todos os isolados inoculados, incluindo C01, C02, JF 01, JF 02, JF 04, MP 131 e MP 132, demonstraram a indução de sintomas de cancro e escurecimento do lenho 75 dias após a inoculação. Não foram observados sintomas de morte descendentes. Os sintomas evidenciados no teste de patogenicidade assemelham-se aos observados em árvores no campo (Figura 1). O reisolamento dos fungos foi realizadoa partir do tecido doente, e os isolados foram identificados, cumprindo, assim, as etapas dos postulados de Koch.

De acordo com pesquisas realizadas no Blast, as sequências dos dois isolados revelaram uma similaridade de 100% com *L. velezuelensis*. A análise filogenética indicou que os isolados C01 e C02 foram agrupados com os isolados tipo de *L. venezuelensis* (CBS 118739), conforme ilustrado na Figura 5.



Figura 1: A-B-C-D: Sintomas de seca dos ponteiros e cancro em árvore de cupuaçuzeiro. E. Resultado de patogenicidade de *L. venezuelensis*. F. Resultado de patogenicidade de *Pseudofusicoccum* sp. G. Cancro causado por *L. venezuelensis* e *Pseudofusicoccum* sp.

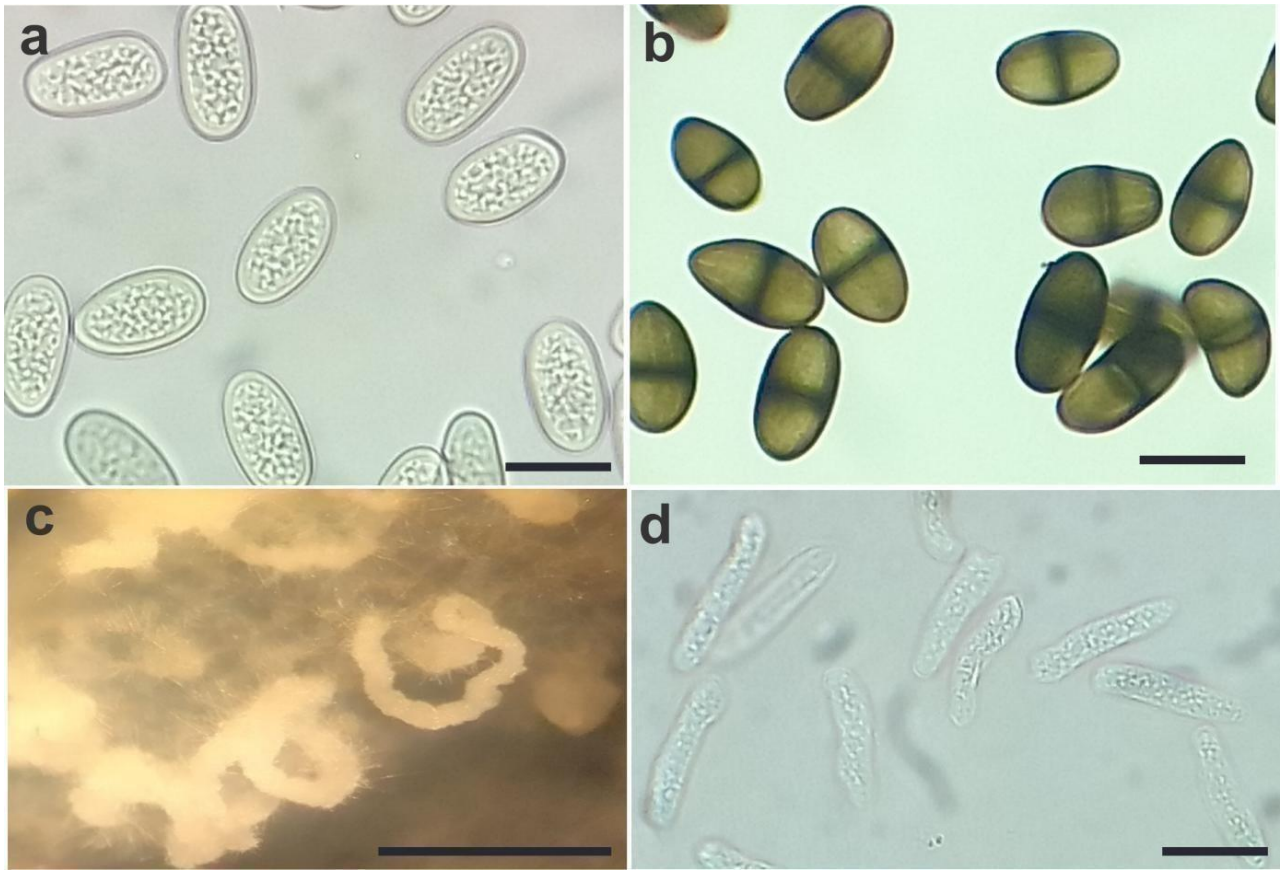


Figura 2: A-B: Conídios de *Lasiodiplodia venezuelensis*. C. Cirros de conídios de *Pseudofusiccocum* sp. D. Conídios de *Pseudofusicoccum* sp.

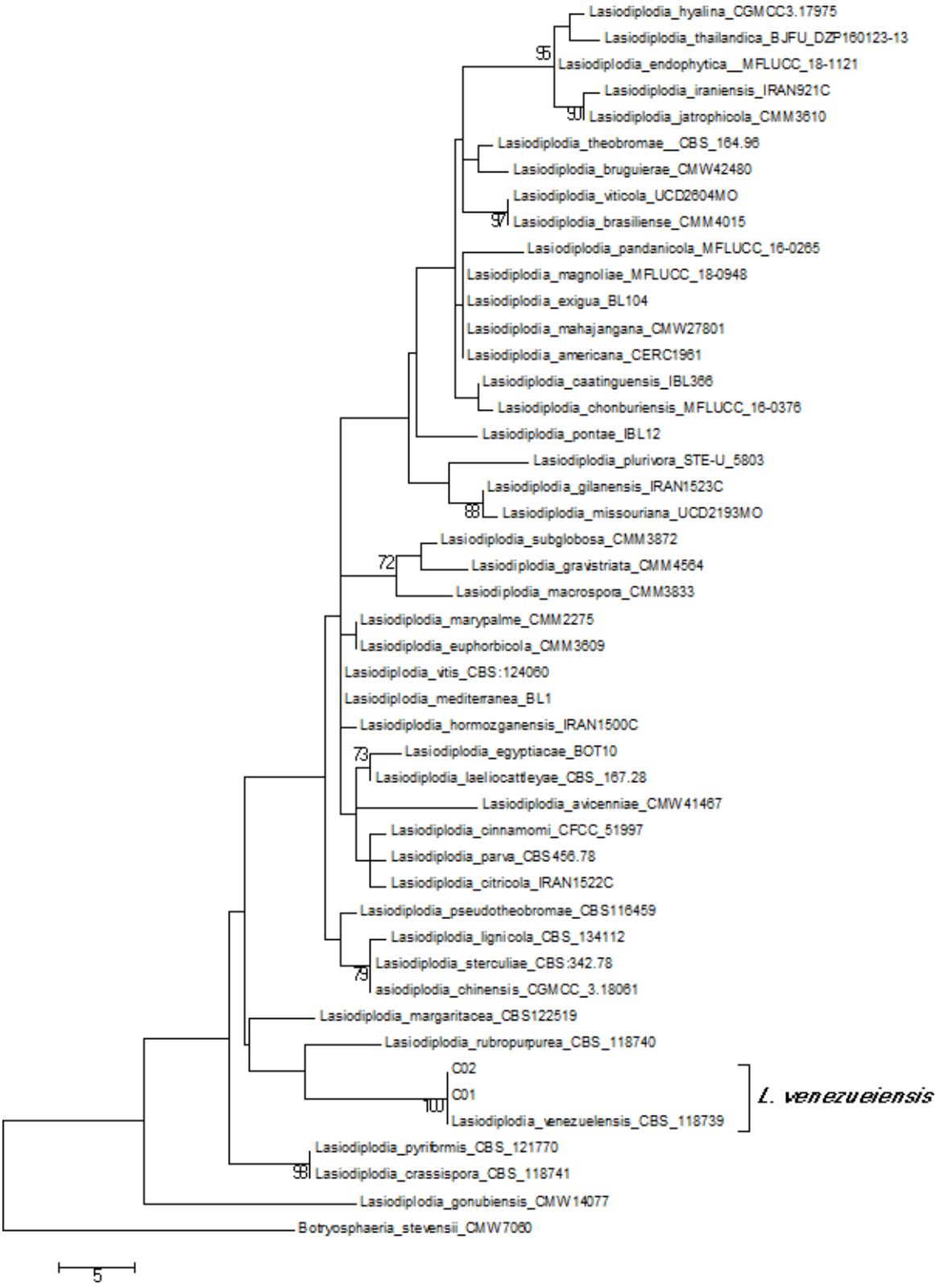


Figura 3. Árvore de Inferência Bayesiana resultante do alinhamento de dados tef1. Valores de bootstrap maiores que 70 são indicados nos nós. A árvore tem raízes com *Botryosphaeria stevensii* (CMW 7060).

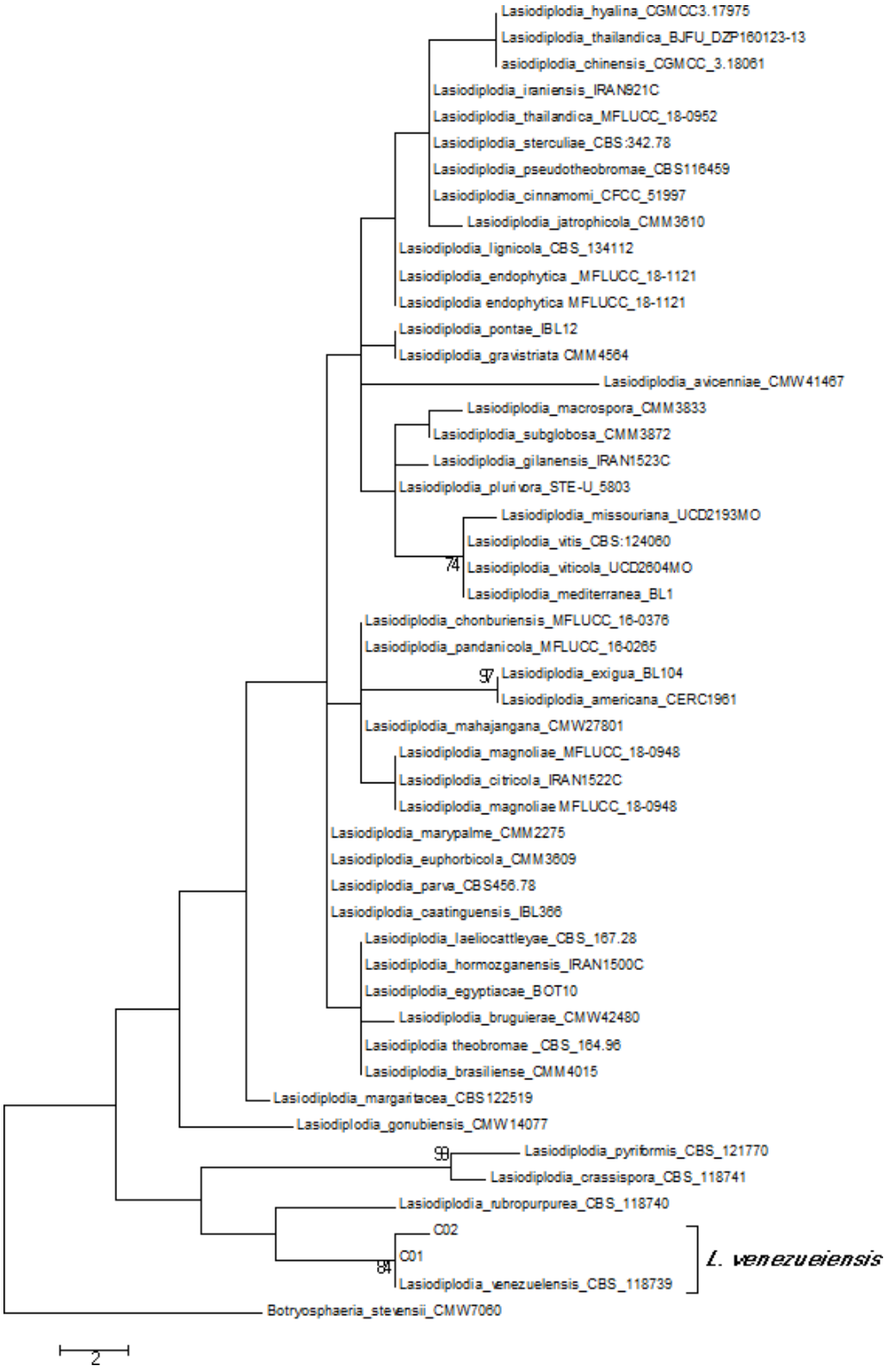


Figura 4. Árvore de Inferência Bayesiana resultante do alinhamento dos dados doITS. Valores de bootstrap superiores a 70 são indicados nos nós. A árvore tem raízes com *Botryosphaeria stevensii* (CMW 7060).

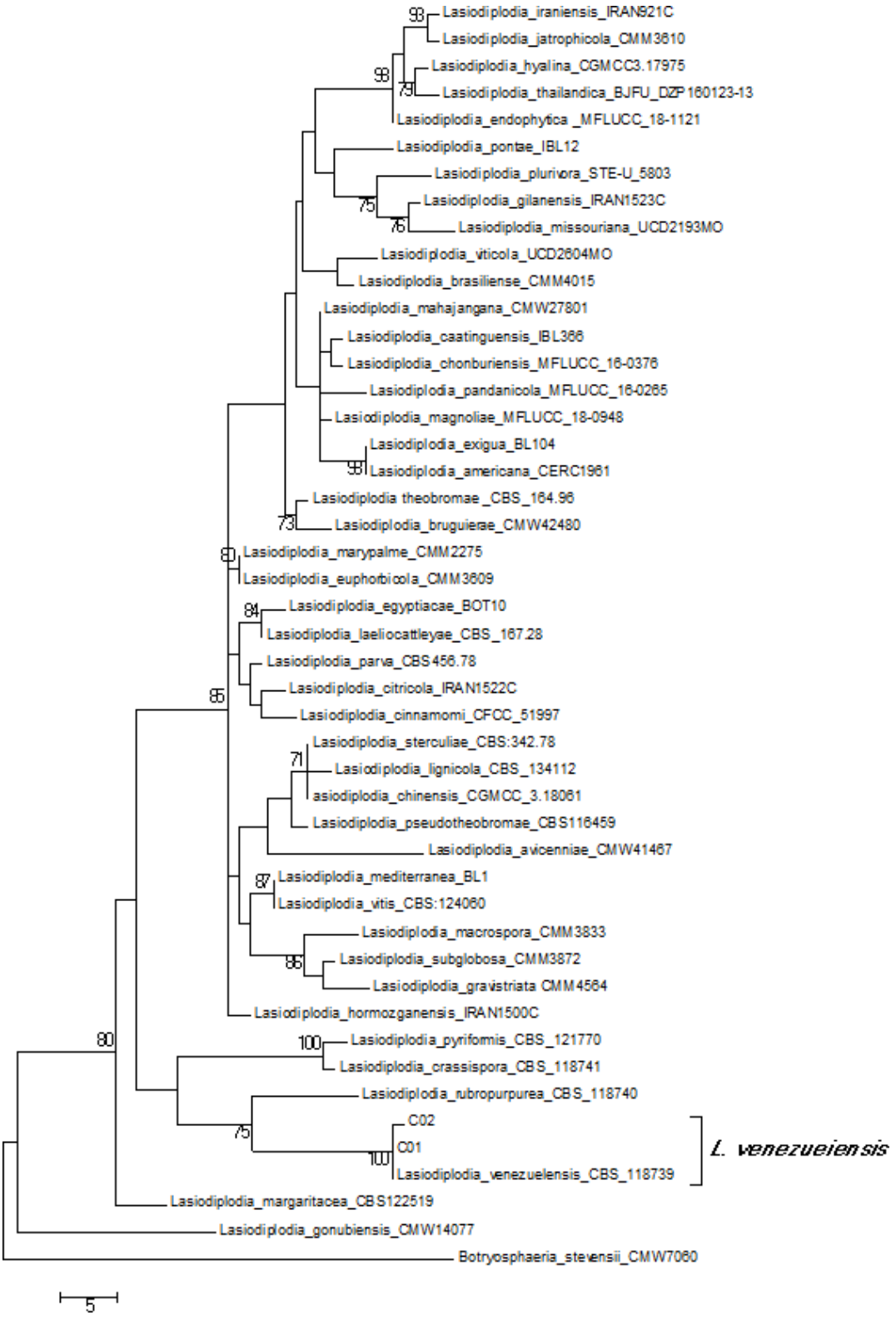


Figura 5. Árvore de Inferência Bayesiana resultante do alinhamento de dados tef1 e ITS. Valores de bootstrap superiores a 70 são indicados nos nós. A árvore tem raízes com *Botryosphaeria stevensii* (CMW 7060).

4. Discussão.

A seca dos ponteiros é um problema fitossanitário comumente identificada em árvores adultas de cupuaçuzeiro, acarretando impactos consideráveis no desenvolvimento pleno dessas plantas. O declínio de árvores adultas tem sido observado como uma consequência direta dessa enfermidade, resultando na redução de folhas na planta. Essa redução compromete o processo fotossintético da planta, afetando, por conseguinte, o transporte eficiente de nutrientes. Com base na incidência recorrente da seca dos ponteiros, esses dados reforçam a possibilidade de os patógenos responsáveis representarem uma ameaça significativa na produção de cupuaçu no Brasil.

Utilizando uma abordagem morfológica e filogenética, este estudo confirma que *L. venezuelensis e Pseudofussicoccum* sp são as espécies fúngicas responsáveis por causar a seca dos ponteiros em cupuaçuzeiro no Brasil. A espécie fúngica *L. venezuelensis* é uma espécie pouco comum no mundo, tendo sido registrada anteriormente em árvores de *Acacia mangium* e *Pinus caribaea* var *hondurensis* na Venezuela. Desde a descrição inicial da espécie, este fungo tem sido relatado exclusivamente na Venezuela (ÚRBEZ-TORRES et al., 2016).

Acredita-se que está espécie seja pouco comum, exibindo uma distribuição geográfica limitada, uma vez que, nos últimos anos, vários estudos científicos têm sido conduzidos e não têm sido observados a presença desta espécie. Em contraste, outras espécies, como *L. theobromae* e *L. pseudotheobromae*, são consideradas cosmopolitas, apresentando uma ampla gama de hospedeiros e uma distribuição geográfica extensa (ÚRBEZ-TORRES et al., 2016).

Pesquisas relacionadas ao gênero fúngico *Pseudofusicoccum* relata como um agente etiológico endófitos ou saprófitas em diversas espécies florestais e culturas agrícolas lenhosas em diferentes regiões geográficas (FARR; ROSSMAN, 2023). Estudos recentes relatam espécies fúngicas desse gênero causando esses problemas fitossanitários em *Acacia mangium*, *Eucalyptus* spp., *Pinus massoniana* e *Cunninghamia lanceolata* na China (LI et al., 2023). No Brasil, associado a doença cancro, podridão do caule, podridão dos frutos e morte da planta de *Mangifera indica*, anteriormente atribuído como agente etiológico desses problemas fitossanitários era a espécie fúngica *L. theobromae.* Com o avanço das pesquisas e uso de métodos

moleculares foi relatada a presença de outras espécies fúngicas, causando esses problemas fitossanitários em *Mangifera indica*, sendo espécies fúngicas pertencentes ao gênero *Pseudofussiccocum* (MARQUES et al., 2013). As principais sintomatologias do patossistema associado a *Pseudofussiccocum* e hospedeiro são o cancro, podridão do caule, podridão dos frutos e morte semelhantes ao encontrado em visitas fitossanitárias em cultivo de cupuaçu (Figura 1) (SLIPPERS et al., 2009; BANDAMARAVURI et al*.,* 2022; LI et al., 2023).

O primeiro relato da seca dos ponteiros em cupuaçu no Brasil remonta à década de 90, sendo o agente causal identificado como *L. theobromae* (LIMA et al., 1991). No entanto, associado aos sintomas de seca dos ponteiros em árvores de cupuaçuzeiro, tem sido registrada a presença de *L. theobromae*. É importante ressaltar que essa identificação do agente etiológico pode ser considerada falha, uma vez que nos estudos realizados a identificação ocorreu por meio de avaliações exclusivas com marcadores morfológicos.

Através das observações dos sintomas, muitos técnicos associam a seca dos ponteiros como sendo problemas abióticos como falta de água e altas temperaturas, além disso, apenas observando os sintomas de seca de ponteiros, não é possivel identificar corretamente o agente etiológico. É necessário o isolamento seguido de caracterização morfológica para identificar o gênero e de técnicas de sequenciamento e análise filogenética para identificar a espécie. Como exemplo, cita-se a seca dos ponteiros e resinose do cajueiro, ao realizar diagnose baseado nas avaliações do quadro sintomatológico e caracterização morfológica. Agente de ambos os sintomas era denominado de *L. theobromae*, mais tarde, com uso de ferramentas de biologia molecular, revelou-se que existem seis espécies de *Lasiodiplodia* e duas espécies de *Pseudofussiccocum* (NETTO et al., 2017).

Apesar da baixa amostragem, este estudo revela a presença de uma espécie ainda não registrada no Brasil (*L. venezuelensis*) e *Pseudofusicoccum* sp, sugerindo que, associado a este sintoma, pode existir uma ampla diversidade de fungos da família Botryospheraceae.

5. Conclusão.

Este é o primeiro relato de *L. Venezuelensis* e *Pseudofusiccocum* sp. causando a seca dos ponteiros em cupuaçu no Brasil. Ambos os isolados induziram sintomas de cancro e escurecimentos dos tecidos lenhoso.

6. Referências.

ALVES, A.; CROUS, P.W.; CORREIA, A.; PHILLIPS, A. J. L. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. **Fungal Diversity**, v. 28, p. 1-13, 2008.

ALVES, R. M.; CHAVES, S. F. DA. S.; NEGRÃO, L. M. V. Viabilidade técnica do uso de *Swietenia macrophylla* e *Theobroma grandiflorum* em sistema agroflorestal. **Ciência Florestal**, v. 32, p. 617-636, 2022.

ALVES, J. L. F.; DA SILVA, J. C. G.; MUMBACH, G. D.; DI DOMENICO, M.; BOLZAN, A.; MACHADO.; R. A. F.; MARANGONI, M. Evaluating the bioenergy potential of cupuassu shell through pyrolysis kinetics, thermodynamic parameters of activation, and evolved gas analysis with TG/FTIR technique. **Thermochimica Acta**, v. 711, p. 179187, 2022.

ALVES, R. M.; RUTH LINDA BENCHIMOL, R. L.; OLIVEIRA, R. P. DE.; CHAVES, S. F. DA. S. Resistência de genótipos de cupuaçuzeiro a *Lasiodiplodiatheobromae***. Embrapa Amazônia Oriental-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, v. 18, p. 19, 2018.

BURGESS, B.; B, T.; PAVLIC, D.; AHUMADA, R.; MALEME, H.; MOHALI, S.; RODAS, C.; WINGFIELD, M. A diverse assemblage of Botryosphaeriaceae infect *Eucalyptus* in native and non-native environments. ***South. For***, v. *71*, p, 101–110*.* 2009.

BANDAMARAVURI, A.S.; NISHAD, I.; SHARMA, B.; SAHU, S.; SINHA, A.K.; BANDAMARAVURI, K.B. Stem and root rot disease of *Artemisia annua* caused by *Pseudofusicoccum adansoniae* in India. **J. Plant Pathol***,* v. *104*, p, 1563– 1564. 2022

COUTINHO, I. B. L.; FREIRE, F. C. O.; LIMA, C. S.; LIMA, J. S.; GONÇALVES, F. J. T.; MACHADO, A. R.; SILVA, A. M. S.; CARDOSO, J. E. Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. **Plant Pathology**, v. 66, n. 1, p. 90-104, 2017.

CRUZ, E. D. Secagem e germinação de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Wiild. ex Spreng.) Schum.-sterculiaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 3, p. 197- 201, 2007.

FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. Fungal Databases. U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Available online: **https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases**, 2023.

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

HEPPERLE, D. DNA Dragon 1.4. 1-DNA sequence contig assembler software. **Available at: www. dna-dragon. com. Accessed on November**, v. 25, p. 2010, 2011.

LI, G.; WU, W.; LU, L.; CHEN, B.; CHEN, S. Characterization of *Pseudofusicoccum* Species from Diseased Plantation-Grown *Acacia mangium*, *Eucalyptus* spp., and *Pinus massoniana* in Southern China. **Pathogens**, v. 12, n. 4, p. 574, 2023.

LIMA, M. I. P. M.; DE SOUZA, A. DAS G. C.; GASPAROTTO, L.; GUIMARAES, R. R. Morte progressiva do cupuaçuzeiro. **EMBRAPA-CPAA**, n. 02, p.1-3, 1991.

MAPA. Mapa declara quarentena ao estado do Amazonas para conter a monilíase do cacaueiro, 2022. Disponivel em: Mapa declara quarentena ao estado do Amazonas para conter a monilíase do cacaueiro, Ministério da Agricultura e Pecuária (www.gov.br). Acesso em 10 de agosto de 2022.

MARQUES, M. W.; LIMA, N.B.; MORAIS JR, M. A.; BARBOSA, M. A. G.; SOUZA, B.O.; MICHEREFF, S.J.; PHILLIPS, A.J.L.; CÂMARA, M.P.S. Species of *Lasiodiplodia*
associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, v. 61, n.5, p.181-193, 2013.

NETTO, M. S. B.; ASSUNÇÃO, I. P.; LIMA, G. S. A.; MARQUES, M. W.; LIMA, W. G.; MONTEIRO, J. H. A.; BALBINO, V. Q.; MICHEREFF, S.J.; PHILLIPS, A. J. L.; CÂMARA, M. P. S. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. **Fungal Diversity,** v. 67, 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**, v. 121, n. 4, p. 437-451, 2017. http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2016.07.006

O'DONELL, K.; CORBY KISTLER, H.; CIGELNIK, E.; PLOETZ, R.C. Multiple evolutiomary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 5, p. 2044-2049, 1998.

PUGLIESE, A. G.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; TRUCHADO, P.; GENOVESE, M. I. Flavonoids, proanthocyanidins, vitamin C, and antioxidant activity of *Theobroma grandiflorum* (Cupuassu) pulp and seeds. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 11, p. 2720-2728, 2013.

RAMBAUT, A. (2009) Fig tree 1.2.2. Available at: http://tree.bio.ed.ac.uk/ software/figtree/ accessedon march 20, 2016.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.

SLIPPERS, B.; BURGESS, T.; PAVLIC, D.; AHUMADA, R.; MALEME, H.; MOHALI,

S.; RODAS, C.; WINGFIELD, M. A diverse assemblage of *Botryosphaeriaceae* infect *Eucalyptus* in native and non-native environments. **Southern Forests**, v. *71*, p. 101–110. 2009.

SLIPPERS, B.; JOHNSON, G. I.; CROUS, P. W.; COUTINHO, T. A.; INGFIELD, 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.

TAVARES, S. C. C de H. Epidemiologia e manejo integrado de *Botryodiplodiatheobromae* situação atual no Brasil e no mundo. **Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE). Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 46-52, 2002.

TAVARES, S. C. C. H.; MENEZES, M.; CHOUDHURY, M .M. Infecção da mangueira por *Botryodiplodia theobromae* Pat. na região semiárida de Pernambuco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 13, n.8, p.163-166. 1991.

ÚRBEZ-TORRES, J. R.; CASTRO-MEDINA, F.; GUBLER, W. D. Botryosphaeriaceae species associated with cankers and dieback symptoms of *Acacia mangium* and *Pinuscaribaea var. hondurensis* in Venezuela. **Plant Disease**, v. 100, n. 12, p. 2455-2464, 2016.

YANG, T.; GROENEWALD, J. Z.; CHEEWANGKOON, R.; JAMI, F.; ABDOLLAHZADEH, J.; LOMBARDO, L.; CROUS, P. W. Families, genera, and species of Botryosphaeriales. **Fungal Biology**, v. 121, n. 2, p. 322-346, 2017.

Contents lists available at ScienceDirect

Crop Protection

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cropro

Lasiodiplodia theobromae and *Lasiodiplodia brasiliense* causing dieback and rot fruit of jackfruit tree in Brazil

José Fábio Ferreira de Souza [a], Kevison Romulo da Silva França [b], Mayra Machado de Medeiros Ferro [b], Iraíldes Pereira Assunção [b], Gaus Silvestre de Andrade Lima [b], Antonio Roberto Gomes de Farias [c], Francisco de Alcântara Neto [a], Maruzanete Pereira de Melo [a,*]

[a] Universidade Federal de Alagoas, Campus de Engenharias e Ciˆencias Agr´arias, Rio Largo, 57000-100, AL, Brazil
[b] Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciˆencias Agr´arias, Teresina, PI, 64049-905, Brazil
[c] Center of Excellence in Fungal Research, Mae Fah Luang University, Chiang Rai, 57100, Thailand

ARTICLEINFO

Keywords:
Botryosphaeriaceae
Dieback and postharvest

ABSTRACT

The jackfruit tree (*Artocarpus heterophyllus*) is a tropical species of significant importance, widely distributed in various geographical regions of Brazil, where its fruits, known as jackfruit, are consumed fresh. Between 2019 and 2023, in three distinct geographical regions of Brazil, a 100% incidence of black rot was observed in jackfruit fruits. Additionally, symptoms of dieback were identified in jackfruit trees in these regions. Faced with this issue, the present study aims to identify the etiological agents associated with these two symptoms, employing morphological characterization, nucleotide sequencing, and inoculations in fruits and seedlings. Through sequencing of the ITS, *TEF*, and *TUB2* regions, the isolates were grouped with references of *Lasiodiplodia theo- bromae* and *L. brasiliense*. The inoculated fungi were reisolated, maintaining the same morphological charac-teristics. This study constitutes the first report of *L. theobromae* and *L. brasiliense* as causative agents of fruit rotand dieback in jackfruit in Brazil.

1. Introduction

The jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam; Moraceae) is a fruit tree originating from South India, known for producing the largest edible fruits (Sangchote et al., 2003). Due to its high productivity, this crop holds significant economic potential for the agro-industrial sector (Swani and Kalse, 2019). The species is found in tropical and subtropical Asian countries such as Indonesia, Malaysia, Sri Lanka, Bangladesh, Burma, and the Philippines (Zhang et al., 2017; Sreeja Devi et al., 2021). In Brazil, the jackfruit proliferates spontaneously and is primarily cultivated in the Amazon and tropical coastal areas. Additionally, it is commercially exploited in some states of the Northeast (Souza et al., 2009).

Research involving the identification of post-harvest pathogens in jackfruit fruits is scarce. In Brazuk, recently, *Gilbertella persicaria* has been identified causing postharvest rot (Souza et al., 2024). On a global scale, records point to *Sclerotium rolfsii* as the causative agent of post-harvest rot in China (Yi et al., 2023), *Sclerotinia sclerotionum* in Bangladesh (Raham et al., 2015), and *Rhizopus stolonifer* in Mexico (Garcia-Estrada et al., 2009).

In various regions of Brazil, rot symptoms were identified in jackfruit fruits associated with plants that exhibited symptoms of dieback and gummosis (Fig. 1-d-e). Initially, the fruits showed small dark spots, progressing to a black-colored rot (Fig. 1-a-b). Internally, a dark coloration was observed in the fruits, indicating the colonization of the pulp and seeds (Fig. 1-c). On the peduncle, there was the growth of gray-colored mycelium, along with the formation of pycnidia. Adult plants displayed symptoms of dieback, with longitudinal cuts revealing the darkening of the wood (Fig. 1-f-g). The disease incidence varied from 5 to 100%.

Although postharvest rot and dieback are commonly observed in jackfruit, the etiological agents associated with these diseases have not been correctly identified. Therefore, this study aimed to identify, through morphological and phylogenetic analyses, as well as pathogenicity tests, the causative agents of fruit rot and symptoms of dieback in jackfruit.

* Corresponding author.
E-mail address: fitomaru@gmail.com (M.P. de Melo).

https://doi.org/10.1016/j.cropro.2024.106763
Received 10 February 2024; Received in revised form 15 May 2024; Accepted 25 May 2024

2. Materials and methods

2.1. Sample collection and isolation

Between 2019 and 2023, jackfruit fruits with symptoms of rot and dieback were collected in the Brazilian municipalities of Cruzeiro do Sul (Acre), Tiangua´ (Ceara´), and Altos (Piauí). A total of 12 isolates of *Lasiodiplodia* were obtained from 100 fruits with rot symptoms, where 6 were selected for characterization. Right away, colonized tissue fragments from the fruit peel and branches were removed using a scalpel. Subsequently, these fragments were superficially disinfected, which involved immersion in 70% alcohol for 30 s, a 1% sodium hypochlorite (NaOCl) solution for 1 min, followed by washing in sterile distilled water (SDW) for 30 s. The fragments were then dried, cultured on Potato Dextrose Agar (PDA) medium, and incubated at 25 °C in the dark for five days, in dark, and then transferred to water agar (WA) to obtain pure cultures, by hyphae typ method. The isolates obtained from these cultures were appropriately cataloged and deposited in the phytopathogenic fungi collection at the Federal University of Alagoas (COUFAL)).

2.2. Morphology and cultural characteristics

To assess the culture coloration and mycelial appearance, isolates COUFAL 517, COUFAL 518, COUFAL 519, COUFAL 520, COUFAL 521 and COUFAL 522 were cultivated on PDA at 25 °C and incubated in the dark for 14 days. For pycnidium production, the isolates were cultivated on oat agar with *Pinus* needles, and the plates were incubated for 25 days under a 12-h photoperiod at 28 °C.

For microscopic analysis, conidial cirri collected from pycnidia were transferred to glass slides containing a drop of lactoglycerol. The structures were observed under a Zeiss microscope equipped with a Nikon Eclipse camera. Thirty conidia were measured for analysis. Then, the pycnidia were sectioned and fragments from these pycnidia were

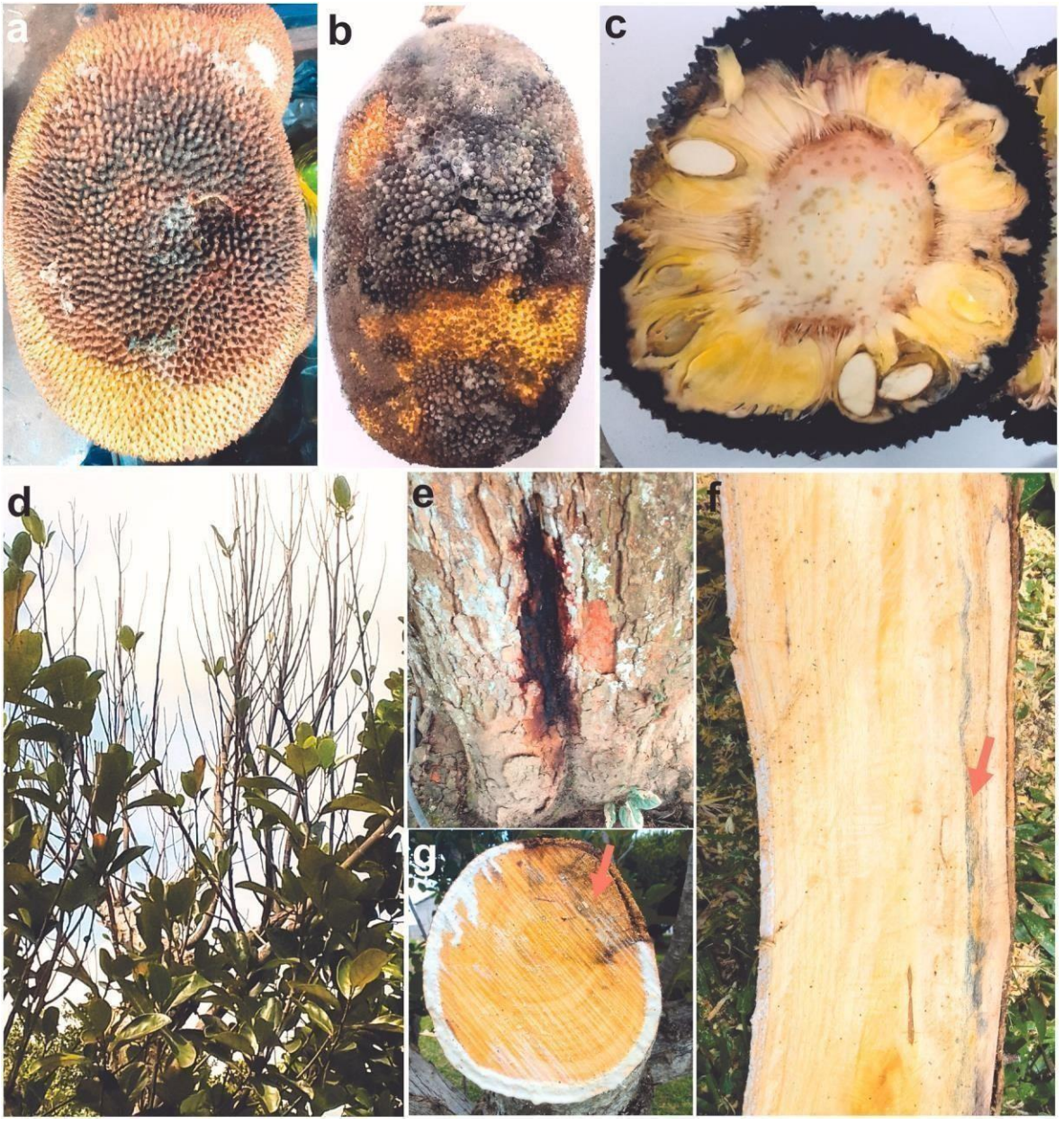


Fig. 1. Symptoms in *Artocarpus heterophyllus*. **A-B** Jackfruit showing symptoms of rot fruit. **C.** Sectioned fruits showing colonization of pulp and seeds. **D.** Jackfruit tree showing symptoms of dieback. **E.** Jackfruit tree showing symptoms of gummosis. **F-G:** Trunk tissue with dark-colored colonization.

Table 1
Collection details and GenBank accession numbers of isolates included in this study.

* = ex-type culture.
Strains collected and sequences generated for this study are in bold.

Lasiodiplodia species	Accession number	Host	Country	ITS	TEF-1α	TUB2
L.brasiliense	**COUFAL 517**	***Artocarpus heterophyllus***	**Brazil**	**OR733554**	**PP175226**	**PP175232**
L. brasiliense	**COUFAL 518**	***Artocarpus heterophyllus***	**Brazil**	**OR733556**	**PP175227**	**PP175233**
L. theobromae	**COUFAL 519**	***Artocarpus heterophyllus***	**Brazil**	**OR733557**	**PP175228**	**PP175234**
L. theobromae	**COUFAL 520**	***Artocarpus heterophyllus***	**Brazil**	**OR733558**	**PP175229**	**PP175235**
L.theobromae	**COUFAL 521**	***Artocarpus heterophyllus***	**Brazil**	**OR733555**	**PP175230**	**PP175236**
L.theobromae	**COUFAL 522**	***Artocarpus heterophyllus***	**Brazil**	**OR733553**	**PP175231**	**PP175237**
L.brasiliense	CMM 1325 T	*Carica papaya*	Brazil	KY783475	KY848612	KY848556
L. brasiliense	CMW 36231	*Andasonia digitata*	Botswana	KU887187	KU887063	KU887494
L.bruquierae	CMW 41470 T	*Bruguiera gymnorrhiza*	South Africa	KP860832	KP860677	KP860755
L. bruquierae	CMW 42408	*Bruguiera gymnorrhiza*	South Africa	KP860834	KP860679	KP860757
L. caatinguesis	CMM 1325 T	*Citrus chinensis*	Brazil	KT154760	KT008006	KT154767
L. endophytica	MFLUCC	*Magnolia acuminata*	China	MK501838	MK584572	MK550606
L. fujianensis	CGMCC 3.19593	*Vaccinium uliginosum*	China	MK802164	MK887178	MK816337
L.gilanensis	IRAN 1523C	*Citrus* sp.	Iran	GU945351	GU945342	KU887511
L. hyalinica	CGMCC 3.17975	*Acacia confusa*	China	KX499879	KX499917	KX499992
L.iranienses	CMW 36237 T	*Jatropha curcas*	Brazil	KF234544	KF226690	KF254927
L. laosensis	GuoLDO 1818	*Aquilaria crassna*	Laos	KY783471	KY848609	KY848552
L. laosensis	GuoLDO 1963	*Aquilaria crassna*	Laos	KY783450	KY848603	KY848536
L. missouriana	UCD 2193MO T	*Vitis vinifera*	USA	HQ288225	HQ288267	HQ288304
L. missouriana	UCD 2199MO	*Vitis vinifera*	USA	HQ288225	HQ288268	HQ288305
L. mognoliae	MFLUCC 18–0948 T	*Magnolia candolii*	China	MK499387	MK568537	MK521587
L. pseudotheobromae	CBS 116459 T	*Gmelina arborea*	Costa Rica	EF622077	EF622057	EU673111
L.pseudotheobromae	CGMCC 3.18047	*Pteridium aquilinum*	China	KX499876	KX499914	KX499989
L. plurivora	CBS 121103 T	*Vitis vinifera*	South Africa	AY343482	EF445396	KU887525
L. theobromae	CBS 111530 T	*Leucospermum* sp.	USA	EF622074	EF622054	KU887531
L.theobromae	CBS 164.96	-	Papua	AY640255	AY640258	KU887532
L.thailandica	CPC 22795 T	*Mangifera indica*	Thailand	KJ193637	KJ193681	KM006464
L.viticola	UCD 2553AR T	*Vitis vinifera*	USA	HQ288227	HQ288269	HQ288306
L.viticola	UCD 2604MO	*Vitis vinifera*	USA	HQ288228	HQ288270	HQ288307
D. Mutila	CMW 760 T	*Fraxinus excelsion*	Netherlands	AY236955	AY236904	AY236933

transferred to a 30% glycerin solution.

2.3. Pathogenicity test

The isolates COUFAL 518 and COUFAL 520 were selected for the plant pathogenicity test, while isolates COUFAL 518, COUFAL 520, and COUFAL 521 were employed in fruit tests. In the experiment, we used seedlings with a height of 60 cm and a stem diameter of 0.8 cm. Using a sterilized scalpel, a cut was made, removing the bark and part of the wood. Discs with a diameter of 0.5 cm containing pathogen structures were placed on the wood. A disc of potato dextrose agar (PDA) without fungal growth was placed for the control treatment. Subsequently, the wounds were covered with adhesive tape (Coutinho et al., 2017). The plants were then placed in a greenhouse and assessed weekly, under conditions of temperature of 30 °C and relative humidity of 30%. To check wood colonization, longitudinal cuts were made using a sterilized scalpel. The pathogen was reisolated from colonized tissues and morphologically compared with the original isolates.

For the inoculation of fruits, at the beginning of maturation, healthy fruits were selected and washed with sterilized water to remove impurities. The experiment was conducted with five repetitions, each represented by one fruit. The epicarp was pierced at two equidistant points using a knife at the ends of the fruits. Subsequently, for each isolate, 0.5 cm diameter discs of PDA, obtained from the margins of cultures with seven days of growth, were placed on the surface of the wounds. The negative control consisted of PDA discs without fungal growth. Cotton balls moistened with autoclaved distilled water were placed over the wounds to prevent desiccation of the discs. The pathogen was reisolated from colonized tissues and morphologically compared with the original isolates. In both cases, the experiment was conducted with five repetitions, where each repetition was represented by a plant, and one plant was used as a negative control. The experiment was repeated twice to ensure the accuracy of the results.

2.4. DNA extraction, PCR and sequencing

Genomic DNA was extracted according to the CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) protocol described by Doyle and Doyle (1990). The PCR reactions were performed in a total volume of 30 μL, containing 3.0 μL of 10 × buffer (100 mM KCl, 100 mM Tris–HCl pH 9.0, 1% Triton-X), 2.4 μL of 2.5 mM dNTPs, 0.9 μL 50 mM MgCl2, 0.2 μL of Taq DNA polymerase, 1.0 μL of each oligonucleotide (10 μM), 1.0 μL (50 ng) of total DNA, and 17.0 μL of PCR grade water.

PCR conditions were an initial denaturation at 95 °C for 7 min (ITS)/5 min (tef1-α and tub2), followed by 25 cycles (ITS)/35 cycles (tef1-α)/30 cycles (tub2), annealing at 50 °C for 1 min (ITS)/54 °C for 30 s (tef1-α)/55 °C for 45 s (tub2), extension at 72 °C for 1 min (ITS, tef1-α)/1 min 30 s (tub2); and final extension at 72 °C for 10 min (ITS and tub2/5 min (tef1-α). The target regions of the TEF1-α, TUB2 and ITS genes were amplified with primer pairs EF1-688F/EF1-1251R (Alves et al., 2008), Bt2a/Bt2b (White et al., 1990; Gardes and Bruns, 1993) and ITS1-F/ITS4 (Glass and Donaldson, 1995), respectively. (Phillips et al., 2018).

Polymerase chain reaction (PCR) products were purified and sequenced on an ABI 3730 xl DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) on the DNA sequencing platform located at the ACTGENE Laboratory Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil). Sequence reads were assembled into contigs and edited using the Staden package (Staden et al., 2003). Sequences generated in this study were deposited in the GenBank database (Table 1).

2.5. Phylogenetic analysis

The reads were assembled using the Staden Package (Staden et al., 2003) and blasted against the NCBI non-redundant GenBank database (Sayers et al., 2020) for selecting closely related reference strains. Except for concatenation and visualization, all the steps of phylogenetic analysis were conducted in a Windows Subsystem for Linux (Microsoft,

USA). The individual datasets were aligned using MAFFT with the *–auto* flag and automatically trimmed using TrimAl v.1.3 with the *-gt* (0.3) option (Capella-Gutierrez et al., 2009). The best-fit model was selected using ModelTest-NG v.0.1.7 with the *–template mrbayes* option (Darriba et al., 2020). The alignments were concatenated using Sequence Matrix (Vaidya et al., 2011).

Maximum likelihood (ML) trees were generated using IQ-TREE v. 2.2.2.7 (Nguyen et al., 2015), using 1000 bootstrap replications and applying a partitioned model of evolution calculated by ModelTest-NG. Bayesian inference was performed using MrBayes (Ronquist et al., 2012), with four simultaneous Markov chain Monte Carlo (MCMC) chains and four runs for four million generations, sampling trees every 400th generation. The first 25% of trees were discarded as burn-in, and posterior probabilities (PP) were calculated from the remaining trees. The consensus phylograms were visualized using FigTree v1.4.4.

3. Results

The cultures on PDA initially displayed a grayish-white coloration with moderately dense aerial mycelium and the reverse side showing olive-green (Fig. 2 a, b, e, f). The production of pycnidia on *Pinus* sp. needles was observed between three and four weeks of incubation (Fig. 2 i-j), with the exudation of a mass of white to black-colored conidia (Fig. 2 k). The isolate COUFAL 517 presented the following characteristics: Immature conidia were hyaline, aseptate, with granular content and thick cell walls, ranging in size between 22,5–27,0 x 11,0–16,0 µm (Fig. 2 c). Mature conidia had a dark brown color, 1 septum, longitudinal striations, and sizes ranging between 23 and 28 x 12,0–16 µm (Fig. 2. D). The isolate COUFAL 522 produced immature conidia, were hyaline, ranging in size between 23,0–28,0 x 12,0–16,0 µm (Fig. 2 h). Mature conidia-bicellular, color black, with longitudinal striations, with varying measurements 24,0–28,0 x 12,0–16,0 µm (Fig. 2g).

The isolates induced symptoms four days after inoculation in fruits (DPI). Initially, softening of the pulp at the inoculation point was observed, and with the progression of colonization, the peel showed a gray color, evolving to black. Eight days after inoculation, mycelial growth was observed on the fruit peel (Fig. 2-h). Internally, the pulp and seed tissues displayed a dark coloration (Fig. 2 i).

Symptoms of yellowing and leaf drop in the seedlings were observed 30 days after inoculation (dpi). Dieback symptoms developed after 50 days of inoculation (dpi) (Fig. 3-c). When cutting the branches, darkening of the wood tissue was noticed (Fig. 3 c-e-f), and externally, at the

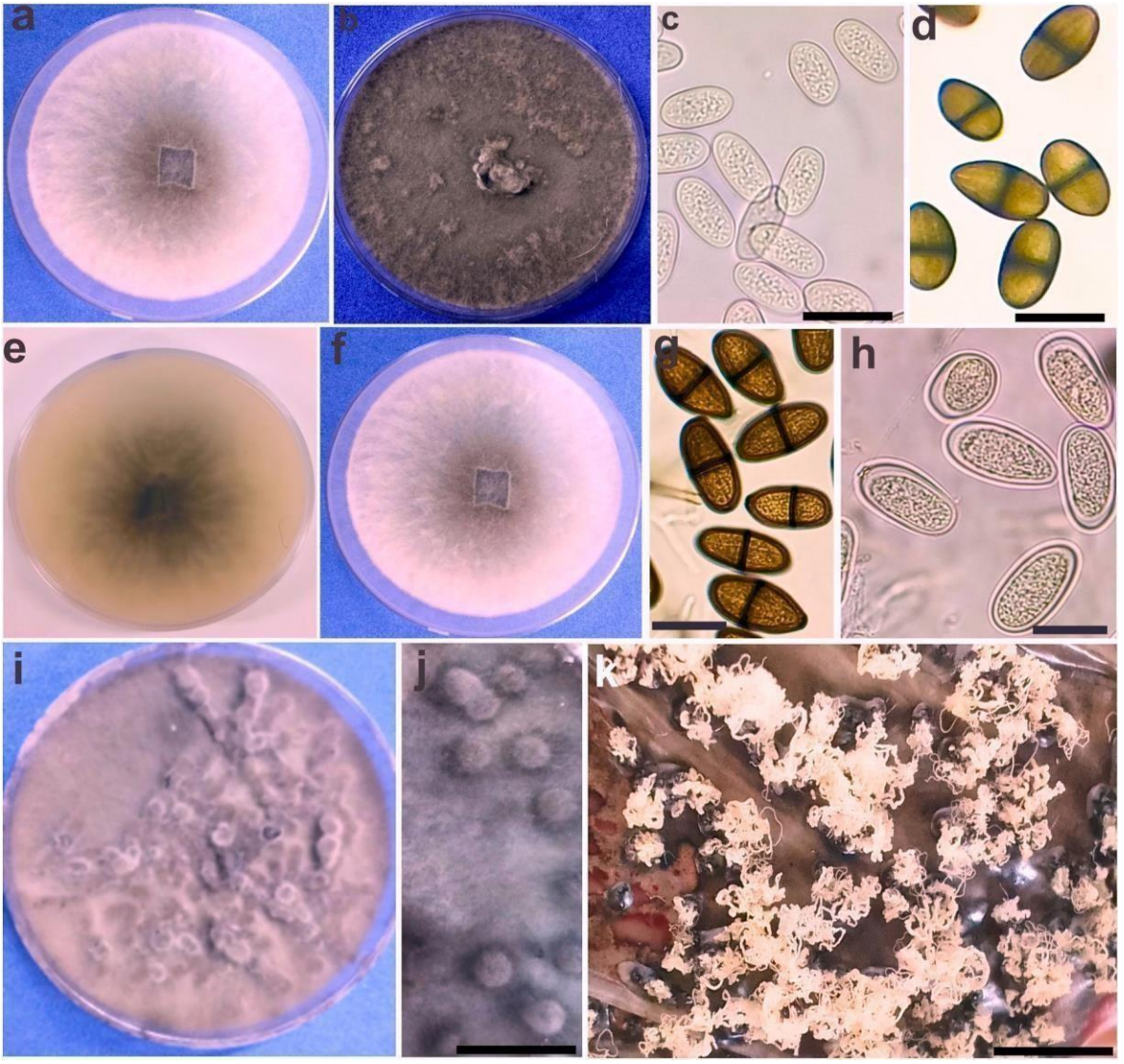


Fig. 2. Morphological markers of *Lasiodiplodia theobromae* (COUFAL 522) and *L. brasiliense* (COUFAL 517). **A-B.** Characteristics of *L. theobromae* colonies. **C-D.** Imature and mature conidia. **E-F.** Characteristics of *L. brasiliense* colonies. **G-H.** Mature and immature conidia. **I-J.** Pycnidia formed on pine needles in PDA. K: Cirrusof conidia. Scale Bar: 40 µm.

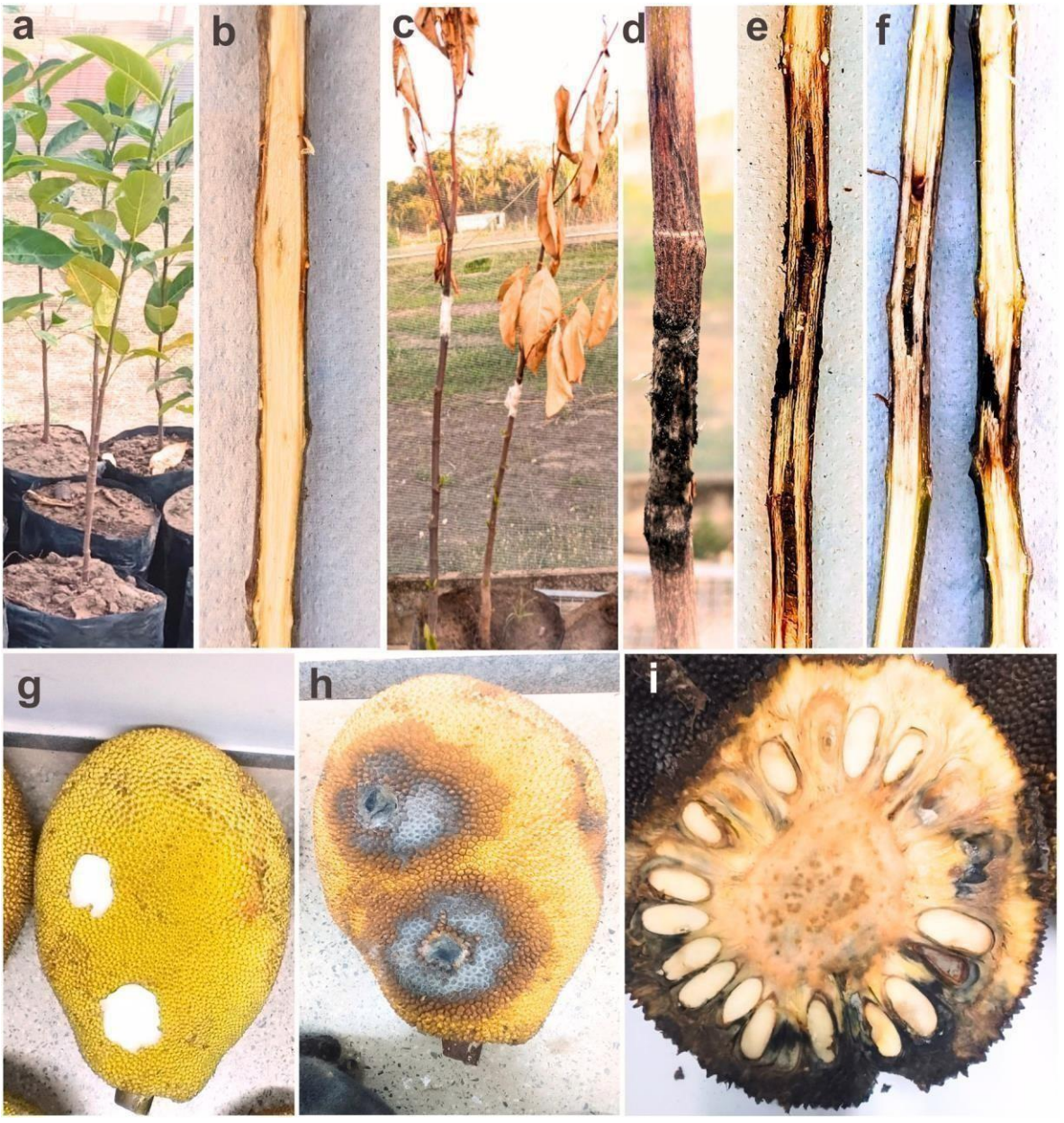


Fig. 3. Pathogenicity test in fruit and seedlings in *Artocarpus heterophyllus*. **A-B.** Asymptomatic jackfruit seedlings (negative control). **C.** Jackfruit seedlings showing symptoms of dieback. **D.** presence of mycelium and pycnidia in inoculated seedlings. **E-F.** Tissue with dark-colored colonization. **G.** Asymptomatic jackfruit fruit (negative control). **H–I.** Fruits showing symptoms of rot.

inoculation point, it was observed the development of dark-colored mycelium and pycnidia (Fig. 3 d). All inoculated fruits and plants exhibited symptoms-like those observed in *A. heterophyllus* plants in the field. Negative control plants showed no symptoms (Fig. 3 a-b-g). Fungus reisolation was carried out from the diseased tissue, and the recovered isolates were identical to the original ones, thus fulfilling the steps of Koch's postulates.

According to BLAST searches, the ITS, *TEF*, and *TUB2* sequences from *A. heterophyllus* isolates shared 98% similarity with *L. theobromae* isolates. In the phylogenetic analysis, the isolates COUFAL 519, COUFAL 520, COUFAL 521, COUFAL 522 were placed in a clade containing the ex-type and representative isolates of *L. theobromae* with 87% maximum likelihood and 1.0 Bayesian probability support and the isolates COUFAL 517 and COUFAL 518 were placed containing the ex-type of *Lasiodiplodia brasiliense* with 96% maximum likelihood support (Fig. 4).

4. Discussion

The rot in jackfruit fruits represents a significant disease due to its high incidence in the field, resulting in negative impacts on commercialization due to pulp depreciation and rotting. Through a polyphasic approach, this study confirms the occurrence of *L. theobromae* and *L. brasiliense* as causative agents of fruit rot and dieback in jackfruit. It is believed that the inoculum source of this pathosystem originates from dry branches of the jackfruit tree, as fruits with rot were observed attached to plants with symptoms of shoot dryness. Additionally, considering that the genus *Lasiodiplodia* is endophytic, it is suggested that this fungus may colonize fruits after maturation (Salvatore et al., 2020).

In Brazil, the occurrence of *L. theobromae* causing dieback in jackfruit was reported (Freire et al., 2004). However, the identification was based solely on morphological markers, which are insufficient for accurately

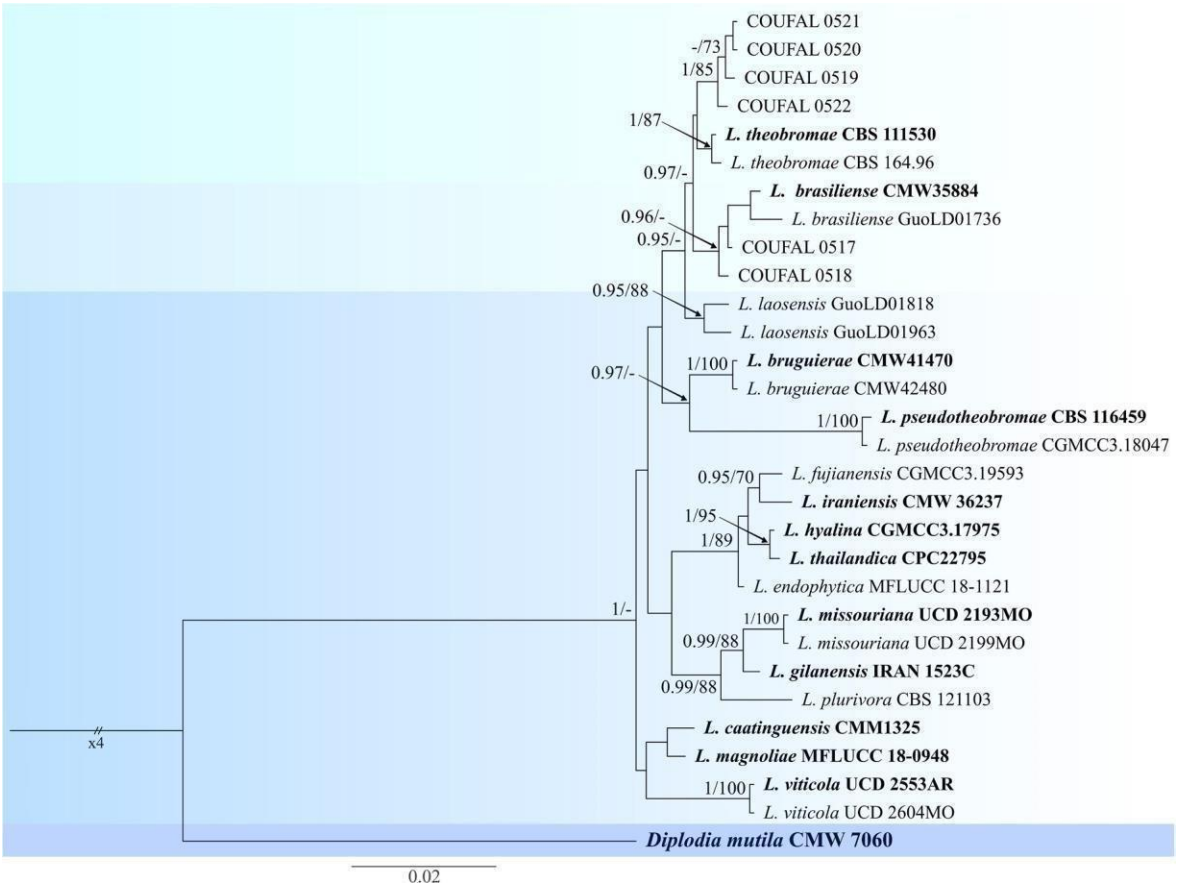


Fig. 4. Bayesian phylogenetic tree of *Lasiodiplodia* spp. isolates from *Artocarpus heterophyllus*. The tree was built using concatenated sequences of the genes ITS, *TEF-1α* and *TUB2*. Bayesian posterior probability values ≥ 0.90 are indicated above the nodes. The sequences generated in this study are highlighted in bold. This tree is rooted in *Diplodia mutila*.

identifying *Lasiodiplodia* species. Worldwide, this species has been recorded as the causal agent of fruit rot in jackfruit in countries such as Mexico (Tiznado et al., 2018), Taiwan (Ni et al., 2008), Sri Lanka (Adikaram et al., 2020), the Philippines (Taylaran et al., 2021), and more recently, in Vietnam (Thao et al., 2023).

Lasiodiplodia theobromae is a fungus that exhibits a broad range of hosts, causing gummosis, dieback, rot in roots and fruits (Coelho et al., 2022; Mello et al., 2021; Correia et al., 2016; Rosado et al., 2016). In some pathosystems, this species has shown higher aggressiveness levels than other *Lasiodiplodia* species (Rosado et al., 2016; Netto et al., 2014). *Lasiodiplodia brasiliense* was initially described in papaya (*Carica papaya*) and mango (*Mangifera indica*) plants and fruits (Netto et al., 2014). Subsequently, this fungus has been reported in other fruit species, causing gummosis symptoms in cashew (*Anacardium occidentale*) and Spanish plum (*Spondias purpurea*) (Coutinho et al., 2017), root rot in watermelon (Santos et al., 2023), and crown rot in banana fruits (Santos et al., 2023).

This result reinforces the importance of using molecular biology tools to identify *Lasiodiplodia* species. *Lasiodiplodia brasiliense* was initially described in papaya fruits and plants (*C. papaya*) in the arid region of Brazil and was later reported in other fruit trees, causing gummosis symptoms in cashew (*A. occidentale*) and Spanish plum (*S. purpurea*) (Coutinho et al., 2017). While, *L. theobromae* is a fungus with a significant number of hosts, causing various types of symptoms (Rosado et al., 2016; Netto et al., 2014).

Due to the widespread cultivation of jackfruit in Brazil, other species of *Lasiodiplodia* and other genera of the *Botryosphaeriaceae* family may be associated with rot and dieback diseases. Based on morphological and molecular characterization, we report here, for the first time, the occurrence of *L. theobromae* and *L. brasiliense* causing fruit rot and dieback in jackfruit in Brazil.

Credit authorship contribution statement

José Fábio Ferreira de Souza: Supervision, Methodology, Conceptualization. **Kevison Romulo da Silva França:** Writing – original draft, Validation, Methodology, Investigation, Conceptualization. **Mayra Machado de Medeiros Ferro:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Resources, Methodology, Investigation. **Iraíldes Pereira Assunça˜o:** Validation, Resources, Funding acquisition, Data curation. **Gaus Silvestre de Andrade Lima:** Resources, Methodology, Investigation. **Antonio Roberto Gomes de Farias:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Software, Methodology. **Francisco de Alcaˆntara Neto:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Resources, Project administration, Funding acquisition, Data curation, Conceptualization. **Maruzanete Pereira de Melo:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Validation, Supervision, Resources, Methodology, Investigation, Formal analysis, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

Acknowledgement

This study was financed in part by the Coordenaça˜o de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. We are grateful from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnolo´gico (CNPq) for the financial support (project process numbers 435363-2018/2 and 311607/2022-5) and Financiadora de Estudos e Projetos (Finep).

References

Adikaram, N., Manawadu, L., Jayasinghe, L., Yakandawala, D., 2020. First report of *Lasiodiplodia theobromae* rot in ripe jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) in SriLanka. Indian Phytopathol. 73, 583–585. https://doi.org/10.1007/s42360-020- 00243-w.

Alves, A., Crous, P.W., Correia, A., Phillips, A.J.L., 2008. Morphological and moleculardata reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. Fungal Divers. 28, 1–13.

Capella-Gutierrez, S., Silla-Martínez, J., Gabaldón, T., 2009. Trimal: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. Bioinformatics 25,1972–1973. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp348.

Coelho, I.L., Assis, T.C., Ferraz, L.G.B., Freitas, M.T.S., Balbino, V.Q., Vieira, Neves, R.P., Doyle, V.P., Camara, M.P.S., Laranjeira, D., 2022. *Lasiodiplodia* species diversity associated with coconut leaf blight and stem-end rot in Northeastern Brazil. Eur. J. Plant Pathol. 162, 45–61.

Correia, K.C., Silva, M.A., de Morais, M.A. Jr., Armengol, J., Phillips, A.J.L., Cˆamara, M. P.S., Michereff, S.J., 2016. Phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of table in the main Brazilian exporting region. Plant Pathol. 65, 92–103. https://doi.org/10.1111/ppa.12388.

Coutinho, I.B.L., Freire, F.C.O., Lima, C.S., Lima, J.S., Gonçalves, F.J.T., Machado, A.R., Silva, A.M.S., Cardoso, J.E., 2017. Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. Plant Pathol. https://doi.org/10.1111/ppa.12565.

Darriba, D., Posada, D., Kozlov, A.M., Stamatakis, A., Morel, B., Flouri, T., 2020. ModelTest-NG: a new and scalable tool for the selection of DNA and protein evolutionary models. Mol. Biol. Evol. 37, 291–294. https://doi.org/10.1093/molbev/msz189.

Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12, 13–15.

Freire, F.C.O., Viana, F.M.P., Cardoso, J.E., Santos, A.A., 2004. Novos Hospedeiros Do Fungo *Lasiodiplodia Theobromae* No Estado Do Ceara. Boletim Tecnico, 2004.

Garcia-Estrada, R.S., López-Martínez, M´arquez-Zequera, I., Cruz-Lachica, I., 2009. First Reports of *Rhizopus stolonifer* Causing Fruit Rot in Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) in México.

Gardes, M., Bruns, T.D., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-applications to the identifications of mycorrhizaea and ruts. Mol. Ecol. 2, 113–118. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x.

Glass, N.L., Donaldson, G.C., 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Appl. Environ. Microbiol. 61, 1323–1330. https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1323-1330.1995.

Mello, J.F., Brito, A.C.Q., Vieira, J.C.B., Câmara, M.P.S., Michereff, S.J., Souza-Motta, C. M., Machado, A.R., 2021. Identification and Pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with root and stem rot of sweet popato in Brazil. Plant Pathol. 70, 1601–1615. https://doi.org/10.1111/ppa.13395.

Netto, M.S.B., Assunção, I.P., Lima, G.S.A., Marques, M.W., Lima, W.G., Monteiro, J.H.A., Balbino, V.Q., Michereff, S.J., Phillips, A.J.L., Câmara, M.P.S., 2014. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. Fungal Divers. 67, 127–141. https://doi.org/10.1007/s13225-014-0279-4.

Nguyen, L.T., Schmidt, H.A., Haeseler, A., Minh, B.Q., 2015. IQ–TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximun-likelihood phylogenies. Mol. Biol. Evol. 32, 268–274. https://doi.org/10.1093/molbev/msu300.

Ni, H.F., Chen, R.S., Chang, S.F., Yang, H.R., 2008. First report of *Lasiodiplodia* fruit rot of jackfruit in taiwan. Plant Dis. https://doi.org/10.1094/PDIS-92-7-1137A.

Phillips, A.J.L., Hyde, K.D., Alves, A., Liu, J.K.J., 2018. Families in Botryosphaeriales: a phylogenetic, morphological and evolutionary perspective. Fungal Divers. 94, 1–22. https://doi.org/10.1007/s13225-018-0416-6.

Raham, M.D.M., Dey, T.P., Hossain, D.M., Nonaka, M., Harada, N., 2015. First report of white mould caused by *Sclerotinia sclerotiorum* on Jackfruit. Australas. Plant Dis. Notes 10, 1–3. https://doi.org/10.1007/s13314-014-0155-9.

Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Ho¨hna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Syst. Biol. 61, 539–542. https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029.

Rosado, A.W.C.R., Machado, A.R., Freire, F.C., Pereira, O.L., 2016. Phylogeny, identifcation and pathogenicity of *Lasiodiplodia* associated with postharvest stem-end rot of coconut in Brazil. Plant Dis. https://doi.org/10.1094/PDIS-03-15-0242-RE.

Salvatore, M.M., Andolfi, A., Nicoletti, R., 2020. The Thin line between pathogenicity and endophytism: the case of *Lasiodiplodia theobromae*. Agriculture 10, 1–22. https://doi.org/10.3390/agriculture10100488.

Sangchote, S., Wright, J.G., Johnson, G.I., 2003. Diseases of breadfruit, jakfruit and related fruit crops. In: Ploetz, R.C. (Ed.), Diseases of Tropical Fruit Crops. CAB International, Oxon, UK.

Santos, J.E.A., Silva, D.E.M., Vieira, R.F.B.S., Cordeiro, M.V.M., Almeida, M.M.M., Lima, M.A.S., Lima, C.S., Oster, A.H., Bruce, C.F.B., 2023. Firtt report *Lasiodiplodia brasiliensis* causing crown rot on Banana in Brazil. Plant Dis. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129294.

Sayers, E.W., Cavanaugh, M., Clark, K., Ostell, J., Pruitt, K.D., Karsch-Mizrachi, I., 2020. GenBank. Nucleic Acids Res. 48, D84–D86. https://doi.org/10.1093/nar/gkz956.

Souza, T.S., Chaves, M.A., Bonomo, R.C.F., Soares, R.D., Pinto, E.G.E., Cota, I.R., 2009. Desidrataç˜ao osm´otica de frutículos de jaca (*Artocarpus integrif´olia* L.): aplicaça˜o de modelos matemáticos. Acta Sci. 31, 230.

Souza, A.E.A., Santiago, A.L.C.M.A., Brito, A.C.Q., Mello, Neto, J.V.S., Souza-Motta, C. M., Machado, A.R., 2024. New reports of *Gilbertella persicaria* causing postharvest rot in different fruits in Brazil. J. Plant Dis. Prot. 131, 237–242.

Sreeja Devi, P.S., Kumar, N.S., Sabu, K.K., 2021. Phytochemical profiling and antioXidant activities of differents parts of *Artocarpus heterophyllus* Lam. (Moraceae); A review on current status of knowledge. Future journal of pharmaceutical Sciences 7, 1–30. https://doi.org/10.1186/s43094-021-00178-7.

Staden, R., Judge, D.P., Bonfield, J.K., 2003. Analyzing sequences using the Staden package and EMBOSS. In: InIntroduction to Bioinformatics: A Theoretical and Practical Approach. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 393–410.

Swani, S.B., Kalse, S.B., 2019. Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*): biodiversity, nutritional contents, and health. In: Bioactive Molecules in Food. Springer, Cham, pp. 2237–2259.

Taylaran, A.D., Bagsic-Posada, I., Cueva, F.M.D., Belendres, M.A., 2021. First report of *Lasiodiplodia theobromae* causing jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) brown rot in the Philippines. Indian Phytopathol. 74, 1151–1153. https://doi.org/10.1007/s42360-021-00392-6.

Thao, L.D., Hien, L.T., Trang, T.T.T., Trinh, P.T., Tuan, D.K., 2023. First report od *Lasiodiplodia theobromae* causing fruit rot of jackfruit in Vietnan. Indian Phytophatology 76, 1137–1140.

Tiznado, M.L.A.M., Esquivel, G.L., Campos, O.J.C., Guerrero, L.G.R., Velasco, C.R., 2018. *Lasiodiplodia theobromae* agente causal de podrida˜o mole de frutas de *Artocarpus heterophyllus* Lam. em Nayarit, Me´xico. Fruticultura 40 dx.doi.org.

Vaidya, G., Lohman, D.J., Meier, R., 2011. SequenceMatriX: concatenation software for the fast assembly of multi gene datasets with character set and codon information. Cladistics 27, 171–180. https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2010.00329.x.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S.B., Taylor, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.T. (Eds.), PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications. Academic Press, pp. 315–322.

Yi, R.H., Liao, H.Z., Li, K.Y., Feng, F., 2023. Fruit rot caused by *Athelia rolfsii* (*Sclerotium rolfsii*) on jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) in China. 107, 3314. Plant Dis. https://doi.org/10.1094/PDIS-09-22-2250-PDN.

Zhang, Y., Zhang, Y., Xu, F., Wu, G., Tan, L., 2017. Molecular structure of starch isolated from jackfruit and its relationship with physicochemical properties. Sci. Rep. 7, 13423 https://doi.org/10.1038/s41598-017-13435-8.

ANEXO I

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que realizei a revisão ortográfica e linguística de português, da dissertação intitulada "**NOVOS AGENTES ETIOLÓGICOS CAUSADORES DA PODRIDÃO DE FRUTOS E MORTE DESCENDENTE EM CUPUAÇUZEIRO E JAQUEIRA**", de autoria de **JOSÉ FÁBIO FERREIRA DE SOUZA**, do Programa de Pós- Graduação em Agronomia, da Universidade Federal do Piauí, defendida em 22 de fevereiro de 2024.

Lavras, 03 de agosto de 2024.

gov.br Documento assinado digitalmente
MARIA DA CONCEICAO GONZAGA DE RESENDE
Data: 03/08/2024 19:51:52-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Maria da Conceição Gonzaga de Resende
SIAPE: 1.867.692
Mestra em Letras pelo Programa de Pós-Graduação em Letras do Departamento de Estudos da Linguagem, da Universidade Federal de Lavras.

ANEXO II

Insightful
Linguistic Excellence in Publishing

EDITORIAL CERTIFICATE

This document certifies that the General Abstract, List of Figures, List of Tables, Summary, and Chapter 1 Abstract of the Master's Thesis listed below has been translated/edited for proper English in terms of grammar, syntax, and semantics by highly qualified professional editors at **I**nsight***ful*®**. The research content and author's intentions were not altered in any way during the translation/editing process.

The **I**nsight***ful*® guarantees the language quality of this manuscript for publication, provided that our suggestions and changes have been accepted and have not been altered after our translation/editing process.
If you have any questions about this document, please contact **I**nsight***ful*® at **info@ilepub.com**

Title:

NOVOS AGENTES ETIOLÓGICOS CAUSADORES DA PODRIDÃO DE FRUTOS E MORTE DESCENDENTE EM CUPUAÇUZEIRO E JAQUEIRA

Authors:

JOSÉ FÁBIO FERREIRA DE SOUZA

Date issued:

August 14, 2024

Certification code:

4920-2024

Insight***ful*® offers professional English language editing of manuscripts for publication in internationally reputed journals. Editors who work with **I**nsight***ful*® are guaranteed the highest qualifications to edit manuscripts in several areas of research. For further information about our group and services, please visit www.ilepub.com