



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
MESTRADO EM AGRONOMIA

RENATA DOURIZETE COSTA CAMPOS

**COLEÓPTEROS VETORES DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS EM PALMÁCEAS
NO BRASIL**

**TERESINA (PI)
2025**

RENATA DOURIZETE COSTA CAMPOS

**COLEÓPTEROS VETORES DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS EM PALMÁCEAS
NO BRASIL**

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.

Orientador:

Prof. Dr. Maruzanete Pereira de Melo

Coorientador:

Prof. Dr. Paulo Roberto Ramalho Silva

TERESINA (PI)

2025

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processos Técnicos

C198c

Campos, Renata Dourizete Costa.

Coleópteros vetores de fungos fitopatogênicos em palmáceas no Brasil. / Renata Dourizete Costa Campos. -- 2025.
61 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2025.

“Orientador: Prof. Dr. Maruzanete Pereira de Melo.”

1. Fungos fitopatogênicos. 2. *Metamasius hemipterus*. 3.
2. *Rhynchophorus palmarum*. I. Melo, Maruzanete Pereira de. II. Título.

CDD 589.1

Bibliotecário: Rafael Gomes de Sousa - CRB3/1163

RENATA DOURIZETE COSTA CAMPOS

**COLEÓPTEROS VETORES DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS EM
PALMÁCEAS NO
BRASIL**

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 12 de fevereiro de 2025

Comissão Julgadora:

Documento assinado digitalmente
 **SOLANGE MARIA DE FRANÇA**
Data: 13/02/2025 09:06:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Solange Maria de França – UEMA

Documento assinado digitalmente
 **ANA CARLA DA SILVA SANTOS**
Data: 12/02/2025 15:59:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Ana Carla da Silva Santos – UFPE

Documento assinado digitalmente
 **ENAYRA SILVA SOUSA**
Data: 12/02/2025 16:19:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Enayra Silva Sousa – UFPI

Documento assinado digitalmente
 **MARUZANETE PEREIRA DE MELO**
Data: 12/02/2025 14:56:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

**TERESINA-PI
2025**

A Deus, por sempre me manter confiante e firme em cada passo desta jornada. À minha mãe, Maria dos Remédios, e à minha irmã, Rebeca Maria, pelo amor incondicional e apoio nos momentos difíceis, e por serem a razão do meu esforço e dedicação. Ao meu orientador, Prof. Dr. Maruzanete, pela parceria, otimismo e constante incentivo ao longo da nossa pesquisa.

DEDICO

*“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas,
mas, ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”*
Carl Jung

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser meu refúgio e fortaleza durante todo o processo do Mestrado.

À Universidade Federal do Piauí, pela oportunidade e suporte nesta pós-graduação.

Ao secretário Silas Tavares, por toda a ajuda concedida nesta caminhada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA), pelo financiamento da bolsa.

Minha gratidão é imensa pela orientação que recebi durante esses dois anos de Mestrado. Ao meu orientador, Dr. Maruzanete Pereira de Melo, pela paciência, dedicação e por despertar em mim o interesse e o amor pela micologia. Ao meu coorientador, Dr. Paulo Roberto Ramalho Silva, por todo o suporte e orientação. Aos meus professores, por todo o conhecimento transmitido, em especial à professora Dr. Solange Maria de França e ao professor Dr. Evando Júnior Bezerra, pela valiosa contribuição e revisão do meu trabalho.

Aos meus familiares, especialmente à minha mãe, Maria dos Remédios, por todo o amor, carinho e confiança no meu potencial e por nunca me deixar desistir. À minha irmã, Rebeca Maria, que se dedicou tanto aos meus experimentos relativamente ao apoio emocional, mesmo nos fins de semana em que passamos cortando frutos, obrigada por sempre me animar com boas conversas e sorrisos sinceros. Você é o meu bem mais precioso. À minha irmã Meiryanne, minhas afilhadas Nicolý e Maithê, minha sobrinha Nataly. A meu pai, Haroldo Campos, pelo incentivo e apoio na jornada. Obrigada por me lembrarem todos os dias de que sou capaz de realizar meus sonhos. Tudo o que consegui é mérito do amor e do cuidado de vocês. Esta conquista é nossa. Ao meu querido amigo, Álvaro Emanuel Freire, por todo o companheirismo, por trazer leveza e alegria à vida, por todos os conselhos que me mantiveram firme, sou profundamente grata. Aos meus amigos e vizinhos de apartamento, Kawan Bacelar e Marcus Vinícius, pelo apoio e carinho em todos os momentos.

Sou grata aos laboratórios que me acolheram e permitiram a realização desta pesquisa. Ao laboratório de entomologia, minha segunda casa, que me acolheu com tanto carinho. Um agradecimento especial ao técnico Felipe Queiroz, pela ajuda nas coletas e pelas palavras de sabedoria para motivar a caminhada. A Briozo, pela ajuda e atenção com minha pesquisa. A Eslane Farias, por todas as boas risadas, ajuda e amizade sincera. A Adriely, Franciele, Jessivan e Rosenya, pela boa convivência no laboratório. Aos laboratoristas de fitopatologia, Kelvin Crist, Laise e Elys. Agradeço também a Rodrigo Azevedo, que esteve sempre presente nos experimentos, oferecendo parceria e amizade nos momentos mais desafiadores. Ao Programa de Melhoramento Genético da Cana de Açúcar - PMGCA/UFPI, por ceder o espaço para a

pesquisa. À incrível técnica de laboratório, Leudimar, cuja dedicação e competência foram fundamentais para esclarecer minhas dúvidas e garantir o bom andamento da pesquisa. A Sara Martins, por toda a cumplicidade e companheirismo em nossa pesquisa. Tenho orgulho de ver nosso crescimento juntas até aqui. Aos colegas, Victor Breno, Luciana Pires e Mayllon Gabriel, por sempre estarem dispostos a ajudar. Agradeço também às minhas amigas Dona Ana e Antônio, da UFPI, por cada risada compartilhada e toda a ajuda oferecida ao longo deste caminho.

Meus sinceros agradecimentos a todos os discentes de Agronomia que me apoiaram de alguma forma, em especial à turma de Agronomia 2023.1, com quem tive o enorme prazer de realizar meu estágio à docência. Sou profundamente grata pelo carinho de todos. Um agradecimento especial à monitora Adriely Pires, pela ajuda e apoio constante, tanto durante quanto depois do estágio.

A todos os que contribuíram direta ou indiretamente, meu sincero agradecimento. Cada apoio e cada incentivo foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Esta pesquisa teve o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA).

Resumo Geral

Os besouros *Rhynchophorus palmarum* (Linnaeus 1764) e *Metamasius hemipterus* (Linnaeus 1758) são conhecidos como pragas em diferentes culturas de interesse econômico. Interações entre besouros e fungos são estudadas durante muito tempo. Acredita-se que esses besouros coevoluíram com a formação de modificações surgindo bolsas denominadas de micangya, estrutura que armazena esporos de fungos. No Brasil, as pesquisas que envolvem a interação de fungos fitopatogênicos e besouros são pouco exploradas e pesquisadas. Dessa forma, esta pesquisa tem como objetivo investigar a diversidade de fungos do gênero *Thielaviopsis* e *Lasiodiplodia* associada aos besouros *R. palmarum* e *M. hemipterus*. A presente pesquisa foi constituída pelas seguintes etapas: coleta de besouros, isolamento, purificação e caracterização morfológica, extração de DNA, PCR, sequenciamento e análises filogenéticas, inoculação dos isolados em frutos de coqueiro, abacaxi e cana-de-açúcar. Foram coletados 1.272 besouros nos estados do Maranhão, Piauí e Pará. Destes, 1.018 provenientes de *R. palmarum* e 254 de *M. hemipterus*, dos quais obteve-se uma coleção de 58 isolados de *Thielaviopsis* sp. Dezesete isolados de *Thielaviopsis* foram identificados por meio de sequenciamento de nucleotídeos, sendo que 15 isolados agruparam com o isolado de referência de *T. ethacetica* e 2 isolados não agruparam com nenhuma espécie do complexo *Thielaviopsis paradoxa*. Todos os isolados de *Thielaviopsis* spp. induziram podridão de frutos em abacaxi, coco e em colmos de cana-de-açúcar. Além disso, este estudo revela a primeira ocorrência de *Thielaviopsis ethacetica* e *Thielaviopsis cerberus* associado a *M. hemipterus* e a *R. palmarum*, demonstrando que ambos os besouros podem ser potencial vetor de inóculo de esporos destas espécies de plantas nativas para plantas cultivadas. Além disso, morfológicamente relata a ocorrência de *Lasiodiplodia* spp. a qual obteve-se uma coleção de 10 isolados, associado em ambos os besouros. Outrossim, confirmou que os isolados obtidos dos besouros induzem podridão de frutos de coqueiro, demonstrando que ambas as espécies de besouro podem ser potencial vetores de *Thielaviopsis* spp. e *Lasiodiplodia* spp.

Palavras-chaves: Fungos fitopatogênicos; *Rhynchophorus palmarum*; *Metamasius hemipterus*.

Abstract

Rhynchophorus palmarum (Linnaeus, 1764) and *Metamasius hemipterus* (Linnaeus, 1758) are beetles recognized as pests in several economically important crops. Interactions between beetles and fungi have long been studied, particularly due to the evolution of specialized structures known as mycangia, which store fungal spores. In Brazil, however, research on associations between beetles and phytopathogenic fungi remains limited. This study aimed to investigate the diversity of fungi from the genera *Thielaviopsis* and *Lasiodiplodia* associated with *R. palmarum* and *M. hemipterus*. The research comprised beetle collection, fungal isolation and purification, morphological characterization, DNA extraction, PCR, sequencing, phylogenetic analyses, and the inoculation of fungal isolates in coconut and pineapple fruits, as well as sugarcane stalks. A total of 1,272 beetles were collected from the states of Maranhão, Piauí, and Pará, including 1,018 *R. palmarum* and 254 *M. hemipterus*, from which 58 isolates of *Thielaviopsis* spp. were obtained. Of these, 17 isolates were identified through nucleotide sequencing: 15 grouped with *T. ethacetica* reference strains, while two did not cluster with any species from the *T. paradoxa* complex. All *Thielaviopsis* isolates were capable of inducing rot in pineapple, coconut, and sugarcane stalks. Additionally, this is the first report of *T. ethacetica* and *T. cerberus* associated with *M. hemipterus* and *R. palmarum*, indicating that both beetle species may act as potential vectors, transferring fungal inoculum from native to cultivated plants. Moreover, ten isolates of *Lasiodiplodia* spp. were morphologically characterized from both beetles, and all induced fruit rot in coconuts, supporting the hypothesis that these insects serve as vectors of *Thielaviopsis* spp. and *Lasiodiplodia* spp.

Keywords: Phytopathogenic fungi; *Rhynchophorus palmarum*; *Metamasius hemipterus*.

SUMÁRIO

1. Introdução Geral	10
2. Revisão bibliográfica	11
2.1. <i>Rhynchophorus palmarum</i>	11
2.2. <i>Metamasius hemipterus</i>	12
2.3. Resinose e podridão de frutos em palmeiras.....	13
2.4. O complexo <i>Thielaviopsis paradoxa</i>	14
2.5. <i>Lasiodiplodia</i> e gêneros afins.....	15
3. Referências.....	18
Capítulo I.....	20
Associação de <i>Thielaviopsis</i> spp. em besouros em palmáceas nativas e cultivadas.....	22
1. Introdução.....	24
2. Material e Métodos.....	25
3. Resultados	30
4. Discussão.....	40
5. Conclusões.....	43
6. Referências.....	43
Capítulo II.....	46
<i>Rhynchophorus palmarum</i> e <i>Metamasius hemipterus</i> : Possíveis vetores de <i>Lasiodiplodia</i> spp.....	46
1. Introdução.....	48
2. Material e Métodos.....	49
3. Resultados	52
4. Discussão.....	57
5. Conclusões.....	59
6. Referências.....	59

1. Introdução Geral

As coleobrocas *Rhynchophorus palmarum* (Linnaeus 1764) e *Metamasius hemipterus* (Linnaeus 1758) são registradas como pragas em diferentes culturas de interesse agrônômico. Na fase larval, *R. palmarum* alimenta-se de tecido do meristema apical impedindo a transmissão de nutrientes, desta forma, interferindo no metabolismo das plantas (Bondar, 1940). Esta coleobroca é vulgarmente conhecida como broca-do-olho-do-coqueiro ou bicudo, ocorre principalmente em culturas como coqueiro e palmito (Silva Junior et al., 2022). Enquanto, *M. hemipterus*, é popularmente conhecido como broca-rajada, ocorre nas culturas de cana-de-açúcar, banana, abacaxi e palmáceas (Zorzenon et al., 2000; Molin Barreto et al., 2012; Borges et al., 2019).

Os coleópteros vetores desempenham um papel fundamental nesse processo, atuando como agentes intermediários no transporte de esporos de fungos, facilitando a distribuição e nos processos infecciosos. Além disso, parte do ciclo de vida desses besouros está diretamente conectada a um hospedeiro específico, estabelecendo assim, uma interação ecológica íntima entre ambos os organismos (Carrano-Moreira, 1997). Ressaltar que tanto os besouros da casca quanto os da ambrosia pertencem a grupos que mantêm relação de interação com fungos. Cada grupo de fungos coevoluiu com objetivo de adaptar com o besouro vetor para garantir sua propagação. A interação mutualística entre besouros da madeira e fungos pode ter começado como uma relação oportunista, na qual os fungos utilizavam os insetos para sua dispersão (Carrano-Moreira, 1997). Com o tempo, os fungos desenvolveram estratégias de sobrevivência, fornecendo alimentos ricos em nutrientes, como proteínas e carboidratos. Essa adaptação levou os besouros a abandonarem sua dieta baseada em plantas hospedeiras, alimentando-se exclusivamente de fungos, comprovado uma relação de interdependência (Six, 2012).

A relação entre fungos fitopatogênicos e besouros vetores em condições naturais pode gerar impactos significativos na agricultura. Em áreas de coqueiro, observava-se a presença de resinose, associada a uma alta população de *R. palmarum*, vetor de esporos de *Thielaviopsis paradoxa* (Carvalho et al., 2011). Nos trópicos, especialmente no Brasil, *R. palmarum* e *M. hemipterus* apresentam ampla distribuição e estão associados a diversas plantas em diferentes ambientes (Hoddle, Hoddle e Milosavljevic, 2020; Vaurie et al., 1966). No entanto, estudos que investigam a associação de fungos com esses coleópteros ainda são escassos. Desta forma, esta pesquisa pretende revelar a diversidade de fungos fitopatogênicos em associação com os besouros *R. palmarum* e *Metamasius hemipterus*. Portanto, por meio de abordagens

moleculares e morfológicas, propomos revelar a diversidade de fungos fitopatogênicos associados a essas duas espécies-pragas. Nos últimos anos, pesquisas que envolvem a interação de coleópteros e fungos fitopatogênicos têm revelado novas associações de um complexo de patógenos associado a besouros. Porém, informações sobre o comportamento e a biologia desses organismos ainda são escassas. Diante desse cenário, torna-se essencial implementar estratégias adequadas para o manejo desses vetores de doenças em campo.

2. Revisão bibliográfica

2.1 *Rhynchophorus palmarum*

Rhynchophorus palmarum, é conhecido popularmente como broca-do-coqueiro, broca-do-olho-do-coqueiro ou bicudo, está amplamente distribuído desde a América Central até o Sul do Uruguai (Hoddle, Hoddle e Milosavljevic, 2020). Este besouro apresenta coloração preta e dimorfismo sexual: as fêmeas possuem rostro fino e recurvado, sem a presença de pelos, enquanto os machos apresentam pelos nessa estrutura (Ferreira et al., 2014). O ciclo de vida do besouro tem duração média de três meses, com metamorfose completa, da fase de ovo até o estágio adulto. Durante a fecundação, a fêmea visita plantas hospedeiras, permitindo que as larvas se desenvolvam adequadamente. O tempo de vida dos machos é de aproximadamente 127 dias, enquanto o das fêmeas pode chegar até 44 dias (Ferreira et al., 2014). Esse aspecto é relevante para o manejo da praga, já que as fêmeas possuem maior contato com as plantas hospedeiras durante o período de oviposição, podendo depositar até 700 ovos (Lacerda, 2001).

As estratégias de manejo podem ser divididas em métodos biológicos e químicos. Plantas infectadas devem ser removidas assim que apresentarem sintomas, a fim de evitar a disseminação da praga para outras culturas. Além disso, o controle químico pode ser realizado por meio da utilização do feromônio de agregação rincoforol (molécula feromonal 2(E)-6-metil-2-hepten-4-ol), potencializado com o uso de pedaços de cana-de-açúcar. O monitoramento deve ser realizado semanal ou quinzenalmente para controlar a população desses coleópteros (Rochat et al., 1991b; Ferreira et al., 2014). No Brasil, sua ocorrência é significativa, sobretudo na região Nordeste (Molin et al., 2012). Essa espécie constitui uma praga importante para as palmeiras cultivadas e é o principal vetor do nematoide causador da doença do anel vermelho. A interação com o fungo *Thielaviopsis paradoxa* também tem sido associada a essa praga (Almeida et al., 2022).

Estudos realizados em ambientes cultivados, observou-se a presença de *R. palmarum* como agente associado à resinose do coqueiro. Os experimentos foram conduzidos em duas áreas do estado de Sergipe: uma com incidência da doença e outra sem sintomas. Na área afetada, besouros coletados e posteriormente plaqueados apresentaram o fungo em seu trato digestivo (Carvalho et al., 2011). Trabalhos anteriores, confirmam a relação simbiótica entre *R. palmarum* e *T. paradoxa* (Parra et al., 2003). Essa interação ocorre por meio da troca de recursos: o fungo oferece alimento ao coleóptero, e o inseto, ao visitar plantas saudáveis, contribui com a dispersão de esporos. Ao longo de sua evolução, os besouros da ambrosia desenvolveram especializações para transportar tipos distintos de fungos simbiotes, podendo atuar como vetores generalistas (Mayers et al., 2015). Esse transporte é viabilizado por estruturas especializadas chamadas mycangia, invaginações localizadas entre a cabeça e o tórax do inseto, responsáveis pelo armazenamento e transporte do fungo. A morfologia das mycangia varia entre os grupos de coleópteros, podendo estar localizadas na carapaça ou, de forma mais complexa, no aparelho digestivo (Mayers et al., 2015). Assim, cada espécie de inseto coevoluiu para transportar esporos de fungos específicos de maneira eficiente.

2.2 *Metamasius hemipterus*

Metamasius hemipterus é considerada uma praga secundária da cultura da cana-de-açúcar no Brasil (Vanin, 2008). No entanto, registros apontam seu potencial como ameaça econômica significativa para os cultivos de cana-de-açúcar e banana (Woodruff & Baranowski, 1985; Sousa et al., 1997). Apesar de *M. hemipterus* não ser considerada uma praga primária da cultura da banana, ela pode utilizar essa planta como fonte alimentar. Em altas populações, pode causar danos econômicos significativos (Pereira et al., 2004). Devido à sua ampla distribuição geográfica, também é classificada como praga de frutas tropicais, ocorrendo desde o México até o Sul do Uruguai (Vaurie et al., 1966). Esse inseto pertence à família *Curculionidae* e é popularmente conhecido como gorgulho. Apresenta porte médio, variando entre 9 e 14 mm de comprimento. Sua coloração característica facilita a identificação, ainda que possam ocorrer variações no padrão de cores dos élitros e do pronoto (Vaurie et al., 1966).

Os adultos possuem coloração castanho-alaranjada, com manchas e faixas abdominais. As larvas variam entre tons de bege e amarelo, com a cabeça de coloração castanha. Morfologicamente, os machos apresentam pigídio arredondado, enquanto as fêmeas o possuem afilado, em formato pontiagudo (Pereira et al., 2004). O ciclo de vida de *M. hemipterus* é holometabólico, passando pelas fases de ovo, larva, pupa e adultos. Os ovos eclodem em

aproximadamente cinco dias, e a fase de pupa dura cerca de dez dias. As fêmeas costumam ovipositar sob colmos e estipes de tecidos previamente danificados. Em média, os adultos vivem cerca de 60 dias, podendo depositar até 500 ovos por ciclo (Lacerda, 2001).

Como estratégia de controle desta praga, o uso do rincoforol que é utilizado na captura de *Rhynchophorus palmarum*, mostra-se eficiente para o seu monitoramento (Omena, 2012). Devido à sua capacidade de locomoção e dispersão, essa coleobroca é considerada um agente eficiente na disseminação de entomopatógenos, podendo transportar inóculos para diferentes cultivos ou hospedeiros (Dolinski e Lacey, 2007). Há relatos de que *M. hemipterus* contribui para a disseminação do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*, com registros de ocorrência em duas regiões do estado de São Paulo, favorecendo o controle biológico de *Cosmopolites sordidus* (Pauli et al., 2011).

No entanto, até o momento, não há evidências de que *M. hemipterus* atue como vetor do fungo *Thielaviopsis paradoxa*, patógeno associado à podridão em culturas como banana, abacaxi e palmeiras. Todavia, estudos na literatura que investiguem sua associação com fungos fitopatogênicos ainda são escassos.

2.2 Resinose e podridão de frutos em palmeiras

A resinose é conhecida como o "sangramento da palmeira", uma doença que afeta a cultura do coqueiro (*Cocos nucifera* L.). No Brasil, tem sido relatado um aumento nos casos de resinose em áreas comerciais de cultivo, principalmente na costa norte do país. Inicialmente descrita no Estado de Sergipe, a doença foi posteriormente registrada nas principais regiões produtoras de coqueiro. Em função das perdas severas, alguns produtores chegaram a abandonar o cultivo da palmeira (Cruz et al., 2014).

Os sintomas característicos incluem o exsudato de um líquido marrom-avermelhado que escorre por rachaduras no tronco, o qual, ao secar, adquire coloração avermelhada ou enegrecida (Carvalho et al., 2011). Com a evolução da doença, notou-se também a redução na frequência de emissão foliar, diminuição do tamanho das folhas novas, afinamento do tronco na região próxima à copa e folhas amarelo-pardacentas, frágeis e suscetíveis à quebra (Warwick, 2009).

No norte do Brasil, foi investigada a associação de *Thielaviopsis paradoxa* com a podridão de frutos de pupunha, o que resultou em queda na produção e comercialização (Alves & Flores, 1982). Posteriormente, *Thielaviopsis ethacetica* foi confirmada como o agente causal da doença em frutos de pupunha (Rocha et al., 2022). No coqueiro, tem sido relatada a queda precoce dos frutos e a ocorrência de podridão peduncular, sintomas que podem ser confundidos com aqueles causados por espécies de *Lasiodiplodia*, também associadas à podridão pós-colheita (Rosado et al., 2016; Pinho et al., 2016). A semelhança dos sintomas entre diferentes patógenos reforça a importância de um diagnóstico preciso, visto que diferentes agentes etiológicos podem demandar estratégias específicas de manejo.

2.3 O complexo *Thielaviopsis paradoxa*

O fungo *Thielaviopsis paradoxa* é um importante agente etiológico de doenças em plantas monocotiledôneas. Com o avanço das ferramentas de biologia molecular, especialmente o sequenciamento de nucleotídeos, os fungos pertencentes à família *Ceratocystidaceae* passaram por profundas revisões taxonômicas. A literatura básica registra que *Thielaviopsis paradoxa* s. lat. foi identificado anteriormente sob diferentes nomes, como *Spororischima paradoxum* de Seynes, *Chalara paradoxa* de Seynes e *Ceratocystis paradoxa* de Seynes. No entanto, com a análise de regiões gênicas conservadas, a maioria desses nomes foi rejeitada ou invalidada. Dessa forma, o que antes era denominado *Thielaviopsis paradoxa* (sin.: *Ceratocystis paradoxa*) foi reclassificado em seis espécies geneticamente distintas.

Alguns fungos dessa família apresentam uma relação íntima com besouros da ordem Coleóptera (Mayers et al., 2017; Mbenoun et al., 2014). Dentre os gêneros de importância econômica, destaca-se a associação entre *Ceratocystis* e espécies de besouros, pois esses insetos causam injúrias aos troncos de diversas plantas arbóreas. Esse gênero de fungo, geralmente, é disseminado a longas distâncias pelos insetos, aumentando assim a dispersão do inóculo entre as plantas (Heath et al., 2009). Na relação entre coleópteros e *Ceratocystis*, há evidências de que a atração dos insetos ocorre devido à produção metabólica do fungo, liberação de aromas e formação de corpos de frutificação do tipo peritécio (Kile, 1993; Mariloch e Blackwell, 1993).

Atualmente, o gênero *Thielaviopsis* compreende um complexo de espécies filogeneticamente distintas e biologicamente relevantes, sendo importantes patógenos de diversas culturas de interesse agrônomo, como cana-de-açúcar, banana, abacaxi e coqueiro (Mbenoun et al., 2014; Melo et al., 2016; Borgens et al., 2019). No Brasil, há registros da associação de *T. paradoxa* com besouros da espécie *Rhynchophorus palmarum*, coletados em

áreas de cultivo de coqueiro que apresentavam sintomas de resinose (Carvalho et al., 2011). O fungo pode permanecer nas plantações por tempo indeterminado devido à formação de estruturas de resistência, o que possibilita a reinfecção de plantas saudáveis ao longo do tempo.

Essa associação entre *T. paradoxa* e insetos vetores, como *R. palmarum*, não ocorre de forma aleatória, mas sim como resultado de adaptações evolutivas que favorecem a dispersão e o sucesso de infecção desses fungos. Estudos realizados por Heart e colaboradores (2009) relataram que os gêneros *Ceratocystis* e *Thielaviopsis* estão bem adaptados para serem transportados por insetos. Esses fungos, podem ser divididos em grupos que produzem ou não aromas frutados e que formam pescoços longos com ascomas, os quais originam massas pegajosas de esporos aderentes ao corpo dos insetos. A análise por microscopia eletrônica de varredura tem sido útil para visualizar esses esporos aderidos ao tegumento dos vetores. Essas estratégias de sobrevivência não apenas facilitam a dispersão, como também reduzem a competição entre microrganismos e influenciam a especificidade do hospedeiro (Heart et al., 2009).

2.4 *Lasiodiplodia* e gêneros afins

A família *Botryosphaeriaceae* abrange uma gama de fungos morfológicamente diversos, compreendendo atualmente 22 gêneros, entre os quais se destacam *Lasiodiplodia*, *Pseudofusicoccum*, *Neoscytalidium*, *Neofusicoccum*, *Diplodia*, *Dothiorella* e *Botryosphaeria*, classificados como endófitos ou saprófitos, principalmente em hospedeiros lenhosos (Phillips et al., 2013; Abdollahzadeh et al., 2010). Os membros dessa família produzem metabólitos secundários e enzimas que degradam a madeira, resultando em sintomas como necrose do lenho e descoloração foliar em videiras (Abou-Mansour et al., 2015; Belair et al., 2022).

Durante muito tempo, a identificação de fungos da família *Botryosphaeriaceae* foi baseada apenas em caracteres morfológicos. No entanto, devido à grande diversidade morfológica observada, como a presença de estrias em conídios maduros nos gêneros *Lasiodiplodia*, *Neodeightonia* e *Barriopsis*, e a ausência em *Diplodia* além do formato variado dos conidióforos, surgiu a necessidade de aplicar técnicas moleculares para melhorar a identificação dos patógenos (Phillips et al., 2008).

Destaca-se que *Lasiodiplodia* possui ampla capacidade de dispersão e se destaca por ser um fungo polífago, cosmopolita e latente, ocorrendo principalmente em situações de estresse

em ampla gama de hospedeiros, como monocotiledôneas, dicotiledôneas e gimnospermas (Gnanesh et al., 2022; Barr, 1987). Grande parte das perdas de frutos no período pós-colheita é causada por infecções fúngicas, que comprometem completamente o tecido do fruto, tornando-o inadequado para comercialização (Salvatore et al., 2020). Quando o fungo coloniza as raízes, suas hifas proliferam nos tecidos corticais e avançam até a região medular. Em seguida, o patógeno invade os vasos do xilema, comprometendo o transporte de água e nutrientes, o que pode levar à morte da planta (Sharma et al., 2003).

As espécies de *Lasiodiplodia* são amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, em diferentes condições ambientais, estes fatores contribuir para o surgimento de doenças fúngicas, tendo *Lasiodiplodia* como patógeno (Alves et al., 2008). *Lasiodiplodia theobromae* possui capacidade de adaptação na faixa de temperatura entre 27 e 33 °C, onde em temperaturas mais elevadas acelera seu metabolismo (D'Souza & Ramesh, 2002). No entanto, condições climáticas úmidas, especialmente em períodos chuvosos, favorece a esporulação e a dispersão dos propágulos do fungo (Vásquez-López et al., 2009).

Morfológicamente, *Lasiodiplodia* apresenta micélio de forma superficial ou imersa no substrato, com aspecto ramificado, presença de septos e coloração marrom-escura. Suas estruturas reprodutivas sexuais, chamadas ascomas, são do tipo eustromático, de cor marrom-escura a preta, com apenas uma cavidade interna (uniloculadas), parede espessa composta por tecido pseudoparenquimático e uma abertura (ostíolo) que se forma à medida que amadurecem, parcialmente rompendo a superfície do substrato. Os conídios, que são os esporos assexuados, são inicialmente hialinos (transparentes), mas com o tempo tornam-se marrom-escuros, com uma única septação central, apresentando estrias longitudinais marcantes, paredes espessas, formato entre oblongos e elipsoides, com o ápice arredondado e a base truncada (Phillips et al., 2008, p. 112). Cabe destacar que, a fase sexual é mais conhecida apenas em *L. theobromae*, nos demais gêneros, a biologia do fungo ainda é pouco conhecida. Devido à sua ampla diversidade, faz-se necessário conhecer seu ciclo biológico para entender como ocorre a reprodução nas variadas condições ambientais (Phillips et al., 2008).

Nos estudos micológicos atuais, a combinação entre dados morfológicos e análises moleculares tem se mostrado essencial para a delimitação correta de espécies dentro de complexos taxonômicos. No caso do gênero *Lasiodiplodia*, essa abordagem integrada tornou-se particularmente relevante, considerando a alta variabilidade morfológica entre isolados. As aplicações filogenéticas, especialmente quando se trata de complexos de espécies, representam

ferramentas confiáveis para a identificação precisa dos organismos (Phillips et al., 2008). Em pesquisas mais recentes, observou-se que, por meio de inferências filogenéticas, isolados de *L. theobromae*, anteriormente descritos apenas com base em caracteres morfológicos e em sequências da região ITS até o ano de 2004, possivelmente poderão ser reclassificados como pertencentes a outras espécies (Cruywagen et al., 2017).

Diversas espécies de *Lasiodiplodia* já foram descritas com base em diferenças morfológicas e moleculares. Entre as mais conhecidas estão *L. theobromae*, *L. pseudotheobromae*, *L. crassispora*, *L. parva*, *L. hormozganensis*, *L. gonubiensis*, *L. margaritacea*, *L. citricola*, *L. plurivora* e *L. brasiliensis*. Essas espécies variam em características como tamanho e ornamentação dos conídios, além da região geográfica e hospedeiro de ocorrência (Alves et al., 2008; Phillips et al., 2013). A delimitação entre essas espécies continua sendo desafiadora, especialmente em ambientes tropicais onde múltiplas espécies ocorrem em um mesmo hospedeiro (Phillips et al., 2013). A nível internacional, estudos moleculares já foram realizados para identificar e descrever novas espécies dentro do complexo *L. theobromae*, porém, abordagens que integrem taxonomia clássica, biologia molecular, coleta em ambientes nativos e avaliação de possíveis vetores ainda são limitadas (Cruywagen et al., 2017).

Os estudos que investigam a interação entre coleópteros e fungos fitopatogênicos tiveram início com pesquisadores na África do Sul e, desde então, têm evidenciado grande relevância científica, especialmente devido ao potencial desses fungos em disseminar esporos entre diferentes áreas de cultivo e plantas hospedeiras. No Brasil, estudos que envolvem a identificação de fungos fitopatogênicos associado a besouros pragas são negligenciados. Baseado nestas premissas, esta pesquisa apresenta uma proposta inédita no Brasil, sendo assim, utilizando ferramentas de biologia molecular, avaliação dos marcadores morfológicos e inoculações, pretende responder as seguintes questões. (i) quais espécies de fungos estão associados aos besouros *Rhynchophorus palmarum* e *Metamasius hemipterus*? Os isolados de *Thielaviopsis* induzem sintomas de podridão em frutos de coqueiro, abacaxi e em colmos de cana-de-açúcar?

3 Referências

- ABOU-MANSOUR, E.; DÉBIEUX, J. L.; RAMÍREZ-SUERO, M.; BÉNARD-GELLON, M.; MAGNIN-ROBERT, M.; SPAGNOLO, A.; CHONG, J.; FARINE, S.; BERTSCH, C.; L'HARIDON, F. Phytotoxic metabolites from *Neofusicoccum parvum*, a pathogen of *Botryosphaeria dieback* of grapevine. **Phytochemistry**, v. 115, p. 207–215, 2015.
- ALVES A.; CROUS PW.; CORREIA A.; PHILLIPS AJL. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. **Fungal Diversity**, v. 28, p. 1–13, 2008.
- ALMEIDA, M. da S. **Interações entre fungos fitopatogênicos e insetos-praga em milho e coqueiro**. Universidade Federal do Piauí. Dissertação de Mestrado. 60 f., 2022.
- BARR, M. E. **Prodromus to Class Loculoascomycetes**. Amherst, Massachusetts: Newell, 168p, 1987.
- BELAIR, M.; GRAU, A. L.; CHONG, J.; TIAN, X.; LUO, J.; GUAN, X.; PENSEC, F. Pathogenicity factors of *Botryosphaeriaceae* associated with grapevine trunk diseases: new developments on their action on grapevine defense responses. **Pathogens**, v. 11, n. 8, p. 951, 2022.
- BONDAR, G. Insetos nocivos e moléstia do coqueiro (*Cocus nucifera* L.) no Brasil. Salvador. **Tipografia**, p. 156, 1940.
- BORGES, A. F.; NETO, F. de A.; MATOS, K. da S.; BESERRA JÚNIOR, J. E. A.; MASSOLA JÚNIOR, N. S.; MOREIRA, S. I.; MELO, M. P. de.; *Thielaviopsis ethacetica* the etiological agent of sugarcane pineapple sett rot disease in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 44, p. 460–467, 2019.
- CARVALHO, R. R. C.; WARWICK, D. R. N.; SOUZA, P. E.; CARVALHO FILHO, J. L. S. Longevidade de *Thielaviopsis paradoxa*, agente causal da resinose do coqueiro em *Rhynchophorus palmarum*. **Scientia Plena**, v. 7, n. 4, 2011.
- CARRANO-MOREIRA, A. F. **Bioecologia dos Besouros-de-Ambrósia** (Coleóptera: Scolytidae e Platypodidae). Cad. dmega Unlv. Fed. Rural PE. SBr. Agron., Recife, n. 8, p. 7-19, 1997.
- CRUZ, L. S. da.; TALAMINI, V.; SANTOS, J. M. S. M.; FERREIRA, J. M. S.; SANTOS, C. C. dos. Estudo do progresso da resinose do coqueiro em Sergipe. In: Seminário de Iniciação Científica e Pós-Graduação da Embrapa Tabuleiros Costeiros, 4., 2014, Aracaju. **Anais**, Brasília, DF: Embrapa, 2014.
- CRUYWAGEN, E. M.; SLIPPERS, B.; ROUX, J.; WINGFIELD, M. J. Phylogenetic species recognition and hybridization in *Lasiodiplodia*: A case study on species from baobabs. **Fungal Biol**, 121:420-436, 2017.
- DOLINSKI, C.; LACEY, L.A. Microbial control of arthropod pests of tropical tree fruits. **Neotropical Entomology**, v.36, n.2, p.161-179, 2007.

D'SOUZA, A. D.; RAMESH M. Senescence in fungi. **Resonance**, v. 7, p. 51–55. 2002.

FERREIRA, J. M. S.; TEODORO, A. V.; NEGRISOLI JUNIOR, A. S.; GUZZO, E. C. Manejo integrado da broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). Aracaju – SE: **Embrapa Amazônia Ocidental**, 2014.

GNANESH, BN.; ARUNAKUMAR, GS.; TEJASWI, A.; SUPRIYA, M. Characterization and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* causing black root rot and identification of novel sources of resistance in Mulberry collections. **The plant pathology journal**. v. 38, p. 272–286, 2022.

HODDLE, M. S.; HODDLE, C. D.; MILOSAVLJEVIĆ, I. How far can *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae) fly? **Journal of Economic Entomology**, v. 113, n. 4, p. 1786–1795, 2020.

HARRINGTON, T. C. “Ecology and Evolution of Mycophagous Bark Beetles and Their Fungal Partners. In *Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution*, edited by F. E. Vega and M. Blackwell. New York: **Oxford University Press**, p. 257–291, 2005.

HEATH, R. N.; WINGFIELD, M. J.; VAN WYK, M.; ROUX, J. Insect Associates of *Ceratocystis albifundus* and Patterns of Association in a Native Savanna Ecosystem in South Africa. **Environ Entomol**, v. 38, n. 2, p. 356–364, 2009.

HULCR, J.; DOLE, S. A.; BEAVER, R. A.; COGNATO, A. I. “Cladistic Review of Generic Taxonomic Characters in *Xyleborina* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae).” **Systematic Entomology**, v. 32, p. 568–584, 2007.

KILE, G. A. Plant diseases caused by species of *Ceratocystis* sensu stricto and *Chalara*, spp. 173–183. In M. J. Wingfield, K. A. Seifert, and J. F. Webber (eds.), *Ceratocystis and Ophiostoma: taxonomy, ecology, and pathogenicity*. **APS Press**, St. Paul, MN. 1993.

LACERDA, I. J. Coqueiro sob ataque. **Revista Cultivar** – Hortaliças e Frutas, Pelotas, v. 6, abr. p. 25–28, 2011.

MAYERS, C. G.; HARRINGTON, T. C.; RANGER, C. M. First report of a sexual state in an ambrosia fungus: *Ambrosiella cleistominuta* sp. nov. associated with the ambrosia beetle *Anisandrus maiche*. **Botany**, v. 95, p. 503–512, 2017.

MAYERS, C. G.; MCNEW, D. L.; HARRINGTON, T. C.; ROEPER, R. A.; FRAEDRICH, S. W.; BIEDERMANN, P. H. W.; CASTRILLO, L. A.; REED, S. E. Three genera in the *Ceratocystidaceae* are the respective symbionts of three independent lineages of ambrosia beetles with large, complex mycangia. **Fungal Biology**, v. 119, n. 11, p. 1075–1092, 2015.

MALLOCH, D.; BLACKWELL, M. Dispersal biology of the Ophiostomatoid fungi, pp. 195–206. In M. J. Wingfield, K. A. Seifert, and J. F. Webber (eds.), *Ceratocystis and Ophiostoma: taxonomy, ecology, and pathogenicity*. **APS Press**, St. Paul, MN, 1993.

MOLIN, I. L. D.; BARRETO, M. R. Ocorrência e controle de Curculionidae em *Cocos nucifera* L. em Sinop, Mato Grosso. **Semana: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 33, n. 1, p. 53–64, 2012.

- MBENOUN, M.; DE BEER, ZB.; WINGFIELD, MJ.; WINGFIELD, BD.; ROUX J. Reconsidering species boundaries in the *Ceratocystis paradoxa* complex, including a new species from oil palm and cacao in Cameroon. **Mycologia**, v.106, p. 757-784, 2014.
- MELO, M. P.; MATOS, K. da S.; JUNIOR BESERRA, J. E. A.; MOREIRA, S. I. *Thielaviopsis musarum* causes postharvest crown and fruit rot of banana in Northeastern Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 41, n. 4, p. 258–263, 2016.
- OMENA, R. P. M. **Ecologia química de *Metamasius hemipterus*, *Rhynchophorus palmarum* e *Homalinotus coriaceus*, e primeiro registro de *Aleurodicus pseudugessi* em coqueiro no Brasil**. 2012. 108 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Química e Biotecnologia, Programa RENORBIO, Maceió, 2012.
- PARRA, D.; MORILLO, F.; SÁNCHEZ, P.; PINEDA, J.; GUERRA, J. Presencia de *Thielaviopsis paradoxa* De Seynes Höhn em el tubo digestivo de *Rhynchophorus palmarum* Linneo (Coleoptera: Curculionidae). **Entomotropical**, v. 18, n. 1, p. 49 - 55, 2003.
- PEREIRA, P. R. V. da S.; HALFELD-VIEIRA, B. de A.; NECHET, K. de L.; JÚNIOR, M. M. Ocorrência de *Metamasius hemipterus* (Linnaeus, 1758) (coleoptera: curculionidae) em bananais do Estado de Roraima. **Comunicado Técnico 13**, Boa Vista-PR, 6p., 2004.
- PINHO, R. C.; FARIAS, P. R. S.; RODRIGUES, K. C. V.; TINÔCO, R. S.; SANTOS, A. V. F. dos; MARSSENA, R. T. P. Distribuição espacial de *Rhynchophorus palmarum* em palma de óleo no Estado do Pará, Amazônia. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 59, n. 1, p. 22-31, jan./mar. 2016.
- PAULI, G.; LOPES, R. B.; ALVES, S. B.; DAMATTO JUNIOR, E. R.; MASCARIN, G. M. Falsa broca aumenta disseminação de *Beauveria bassiana* em populações de campo da broca-do-rizoma da bananeira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.11, p.1867-1870, nov, 2011.
- ROCHA, F. V. R. da. **Espécies de *Thielaviopsis* em palmeiras selvagens e cultivada**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém-PA, 62p. 2022.
- ROCHAT, D.; GONZALEZ, V. A.; MARIAU, D.; VILLANUEVA, G. A.; ZAGATTI, P. Evidence for male-produced aggregation pheromone in American palm weevil, *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Chemical Ecology**, v. 17, n.6, p. 1221-1230, 1991b.
- ROSADO, A. W. C. R.; MACHADO, A. R.; FREIRE, F. C.; PEREIRA, O. L. Phylogeny, identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia* associated with postharvest stem-end rot of coconut in Brazil. **Plant Diseases**, 100 (3), 561-568. 2016.
- SALVATORE, M. M.; ANDOLFI, A.; NICOLETTI, R. The Thin Line between Pathogenicity and Endophytism: The Case of *Lasiodiplodia theobromae*. **Agriculture**, v. 10, p.488, 2020.
- SHARMA, D. D.; NAIK, V. N.; CHOWDARY, N. B.; MALA, V. R. Soil borne diseases of mulberry and their management. Int. J. Ind. **Entomol**, 7:93-106, 2003.

SILVA JUNIOR, V. A. da.; NEGRISOLI JUNIOR, A. S. Topical effect of thiamethoxam on adults of *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) in laboratory. **BioAssay**, 17: ba17001, 2022.

SIX, D. L. Ecological and Evolutionary Determinants of Bark Beetle -Fungus Symbioses. **Insects**, v.3, n.1, p. 339-66, 2012.

SLIPPERS B.; BOISSIN E.; PHILLIPS AJL.; GROENEWALD JZ. Phylogenetic lineages in the Botryosphaerales: a systematic and evolutionary framework. Studies in: **Mycology**, v. 76, n.1, p. 31– 49, 2013.

VANIN, S. A. A new species of *Pacholenus* Schoenherr from southeastern Brazil (Coleoptera, Curculionidae, Molytinae), and new occurrences of species of the genus. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v.48, n.30, p.345-351. 2008.

VAURIE, P. A revision of the Neotropical genus *Metamasius* (Coleoptera, Curculionidae, Rhynchophorinae). Species groups I and II. Bull. **American Mus. Nat. Hist.**, v. 131, p. 213-337. 1966.

VÁSQUEZ-LÓPEZ, A.; MORA-AGUILERA, J. A.; CÁRDENAS-SORIANO, E.; TÉLIZ-ORTIZ, D. Etiología e histopatología de la muerte descendente de árboles de mamey *Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore y Stearn en el estado de Guerrero, México. **Agrociencia**, 43, 717-728, 2009.

WOOD, S. L. The Bark and Ambrosia Beetles of North and Central America (Coleoptera: Scolytidae), a Taxonomic Monograph. Great Basin Naturalist Memoirs, Number 6. Provo, Utah: **Brigham Young University**, p. 1359, 1982.

WARWICK, D. R. N.; PASSOS, E. E. M. Outbreak of stem bleeding in coconuts caused by *Thielaviopsis paradoxa* in Sergipe, Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, p. 175-177, 2009.

WOODRUFF, R. E.; BARANOWSKI, R. M. *Metamasius hemipterus* (Linnaeus), an economically important pest of palms and sugarcane and other tropical crops (Coleoptera: Dryophthoridae). **Entomology Circular**, Florida: Florida Department of Agriculture & Consumer Services, n. 272, 1985.

ZORZENON, F. J.; BERGMANN, E. C.; BICUDO, J. E. A. Primeira ocorrência de *Metamasius hemipterus* (Linnaeus, 1758) e *Metamasius ensirostris* (Germar, 1824) (Coleoptera: Curculionidae) em palmiteiros dos gêneros *Euterpe*, *Bactris* (Arecaceae) no Brasil. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v. 67, n. 2, p. 265-268, 2000.

Capítulo I

Associação de *Thielaviopsis* spp. em besouros em palmáceas nativas e cultivadas

Resumo

Fungos da família *Ceratocystidaceae* podem ser disseminados pela ação de besouros e são transportados principalmente em estruturas denominadas de micângias, que são bolsas especializadas de armazenamento de esporos. Alguns fungos fitopatogênicos, podem ser disseminados para plantas hospedeiras por diversos grupos de besouros. Estudos que envolvem a identificação molecular de *Thielaviopsis paradoxa* no Brasil, bem como a associação de *Thielaviopsis* e coleópteros são escassos. Diante disso, esta pesquisa tem o objetivo de investigar a diversidade de espécies do complexo *T. paradoxa* associado a besouros em área de babaçu, coqueiro e dendezeiro e confirmar sua patogenicidade em frutos de coqueiro, abacaxi e cana-de-açúcar. A presente pesquisa foi constituída nas seguintes etapas: coleta de besouros, plaqueamento dos besouros, isolamento e purificação e caracterização morfológica, extração de DNA, PCR, sequenciamento, análises filogenéticas e inoculação dos isolados em frutos de coqueiro, abacaxi e cana-de-açúcar. Foram obtidos 57 isolados de *Thielaviopsis* spp. associados a *R. palmarum* e a *M. hemipterus* provenientes de áreas com a presença de palmeiras nativas e cultivado (coqueiro e dendezeiro). Todos os isolados de *Thielaviopsis* obtidos de *R. palmarum* e *M. hemipterus* apresentaram marcadores morfológicos típicos de *T. ethacetica* e *T. cerberus*. De acordo com a análise filogenética, (15 isolados) agruparam com o isolado de referência de *T. ethacetica*. Dois isolados não agruparam com nenhuma espécie do complexo, mas ficaram próximos de *T. cerberus*. Este estudo revela a presença de *T. ethacetica* e *T. cerberus* associado com *R. palmarum* e *M. hemipterus*. Todos os isolados inoculados induziram sintomas de podridão em frutos de abacaxi, coqueiro e em colmos de cana-de-açúcar, apresentando mesmo níveis de agressividade. Enquanto, que o isolado de *T. cerberus* apresentou baixo nível de agressividade em todas as inoculações. Este é o primeiro relato de *T. cerberus* associado em ambos os besouros. Ambas as espécies induziram podridão em frutos de abacaxi, coco e em colmos de cana-de-açúcar. Este estudo revela a primeira ocorrência de *T. ethacetica* e *T. cerberus* em associação com os besouros *R. palmarum* e *M. hemipterus*.

Palavras-chaves: Interação inseto-fungo; Filogenia; Complexo de espécies.

Chapter I

Association of *Thielaviopsis* spp. with Beetles in Native and Cultivated Palms

Abstract

Fungi from the family *Ceratocystidaceae* can be spread by beetles, mainly through specialized structures called mycangia, which store fungal spores. Some plant-pathogenic fungi are transmitted to host plants by different groups of beetles. In Brazil, studies on the molecular identification of *Thielaviopsis paradoxa* and its association with beetles are still rare. This study aimed to investigate the diversity of species in the *T. paradoxa* complex associated with beetles in areas with babassu palms, coconut palms, and oil palms, and to confirm their ability to cause disease in coconut, pineapple, and sugarcane. The research included beetle collection, plating, fungal isolation and purification, morphological characterization, DNA extraction, PCR, sequencing, phylogenetic analysis, and inoculation of fungal isolates in fruits and stalks. A total of 57 *Thielaviopsis* isolates were obtained from *Rhynchophorus palmarum* and *Metamasius hemipterus* collected in areas with native and cultivated palms (coconut and oil palm). All isolates from both beetle species showed typical morphological features of *T. ethacetica* and *T. cerberus*. Phylogenetic analysis grouped 15 isolates with the reference strain of *T. ethacetica*. Two isolates did not group with any known species but were close to *T. cerberus*. This study reports for the first time the presence of *T. ethacetica* and *T. cerberus* associated with *R. palmarum* and *M. hemipterus*. All fungal isolates caused rot symptoms in pineapple, coconut, and sugarcane, showing similar levels of aggressiveness, except for *T. cerberus*, which showed lower aggressiveness in all tests. Both fungi were able to cause fruit rot in these crops, confirming that these beetles can act as potential vectors.

Keywords: Insect–fungus interaction; Phylogeny; Species complex.

1. Introdução

Fungos da família *Ceratocystidaceae* dependem de besouros para sua dispersão e são transportados principalmente em estruturas denominadas de micângios, que são bolsas especiais de armazenamento de esporos (Fraedrich et al., 2008; Harrington et al., 2005). A relação entre besouros e fungos da família *Ceratocystidaceae* tem sido amplamente estudada, especialmente no caso dos fungos do gênero *Ambrosiella*, que apresentam uma estreita associação simbiótica com besouros ambrosia. No entanto, essa interação íntima, mediada por estruturas especializadas chamadas micângios (ou micangia), é restrita a alguns grupos específicos de besouros, como os da subfamília *Scolytinae* e *Platypodinae*, não ocorrendo em todos os coleópteros (Mayers et al., 2015).

Dentre os gêneros de importância econômica, merece destaque *Ceratocystis*, que se associa com espécies de besouros que causam injúrias a troncos de diversas plantas arbóreas. Este gênero, geralmente, é disseminado a longas distâncias pelos insetos, aumentando assim a disseminação do inóculo entre as plantas (Heath et al., 2009). *Thielaviopsis* é outro gênero da família *Ceratocystidaceae* importante como fitopatógeno, no entanto, os estudos de associação com insetos são escassos. No Brasil, tem-se observado a associação de *Thielaviopsis paradoxa* a *Rhynchophorus palmarum*, com esporos do fungo localizados na parte externa e interna do inseto (Parra et al., 2003).

Estudo recente, utilizando abordagens modernas de biologia molecular, confirmou que o que era denominado de *T. paradoxa* se desmembrou em várias espécies filogenéticas distribuídas em três grandes grupos. O primeiro grupo é representado pelas espécies *Thielaviopsis radiculicola*, importantes fitopatógenos em várias espécies de palmeiras, o segundo engloba espécies de *Thielaviopsis cerberus*, patógeno que causa podridão pós-colheita em frutos de *Theobroma cacao* (Mbenoun et al., 2014).

O terceiro grupo é composto pelas espécies de *Thielaviopsis ethacetica*, uma linhagem amplamente distribuída, apresentando ampla gama de hospedeiro. Apesar de não existirem informações do centro de origem desta espécie, pesquisadores levantaram a hipótese de que este patógeno apresentava restrita distribuição antes de ser disseminado, no entanto, emergiu para outros hospedeiros por meio de atividades antrópicas (Mbenoun et al., 2014). *Thielaviopsis ethacetica* é uma espécie cosmopolita, frequentemente encontrada em coqueiro, dendezeiro e em outras palmeiras. Estudos indicam que a identificação de espécies do complexo *T. paradoxa*, com base apenas em marcadores morfológicos, pode ser desafiadora,

pois essas espécies compartilham características semelhantes, o que pode levar a classificações imprecisas (Mbenoun et al., 2014).

O movimento e dispersão de inóculo de fungos da família *Ceratocystidaceae* ocorrem principalmente por meio da ação de insetos (Mayes et al., 2015; Mbenoun et al., 2015). Dentre os gêneros de importância econômica, merece destacar a associação *Ceratocystis* com espécies de besouros, ao causar injúrias nas cascas e no lenho das árvores ocorre a penetração do fungo no tecido das plantas, (Wingfield et al., 2017). Em pesquisas recentes, demonstraram que o inóculo de *Ceratocystis lukuohia* está presente nos excrementos de besouros ambrosia, indicando que esses insetos podem atuar como vetores de dispersão entre árvores nativas (Hughes et al., 2023).

Devido à relação de besouros e fungos *Thielaviopsis* ser pouco explorada no Brasil, este estudo pretende investigar por meio de caracterização morfológica e sequenciamento de DNA quais espécies do complexo *T. paradoxa* encontram em associação com *R. palmarum* e *M. hemipterus*, bem como confirmar se os isolados induzem podridão em frutos de coqueiro, abacaxi e em colmos de cana-de-açúcar.

2. Material e Métodos

Coleta de insetos e isolamento fúngicos

As coletas dos besouros foram realizadas nos períodos de julho de 2023 a novembro de 2024 em áreas nativas com a presença de palmeiras babaçu nas seguintes localidades: Codó (MA) 4°29'02.0"S 43°55'37.3"W, Coelho Neto (MA) 4°13'56.9"S 43°00'51.2"W, Chapadinha (MA) 3°45'52.9"S 43°20'40.6"W, Buriti (MA) 3°48'22.3"S 42°56'55.8"W, Duque Bacelar (MA) 4°04'10.5"S 42°58'36.7"W e Teresina (PI) CCA 5°02'51.2"S 42°47'01.8"W. Além disso, realizaram-se coletas de besouros em áreas de cultivos de coqueiro nos municípios de Balsas (MA) 7°31'40.0"S 46°02'58.7"W e Moju (PA), enquanto as coletas nas áreas de dendezeiro foram realizadas na empresa Agropalma em Tailândia (PA) 2° 56' 50" S 48° 57' 11" W (figura 1).

Foram utilizadas armadilhas do tipo balde (figura 2) para a captura dos besouros, sendo instalados três baldes por área, com distância aproximada de 10 metros. No interior das armadilhas, foram depositados microtubos contendo feromônio de agregação (rincoforol) e colmos de cana-de-açúcar. Após 15 dias, as armadilhas foram recolhidas e transportadas para o Laboratório de Entomologia da Universidade Federal do Piauí -UFPI.

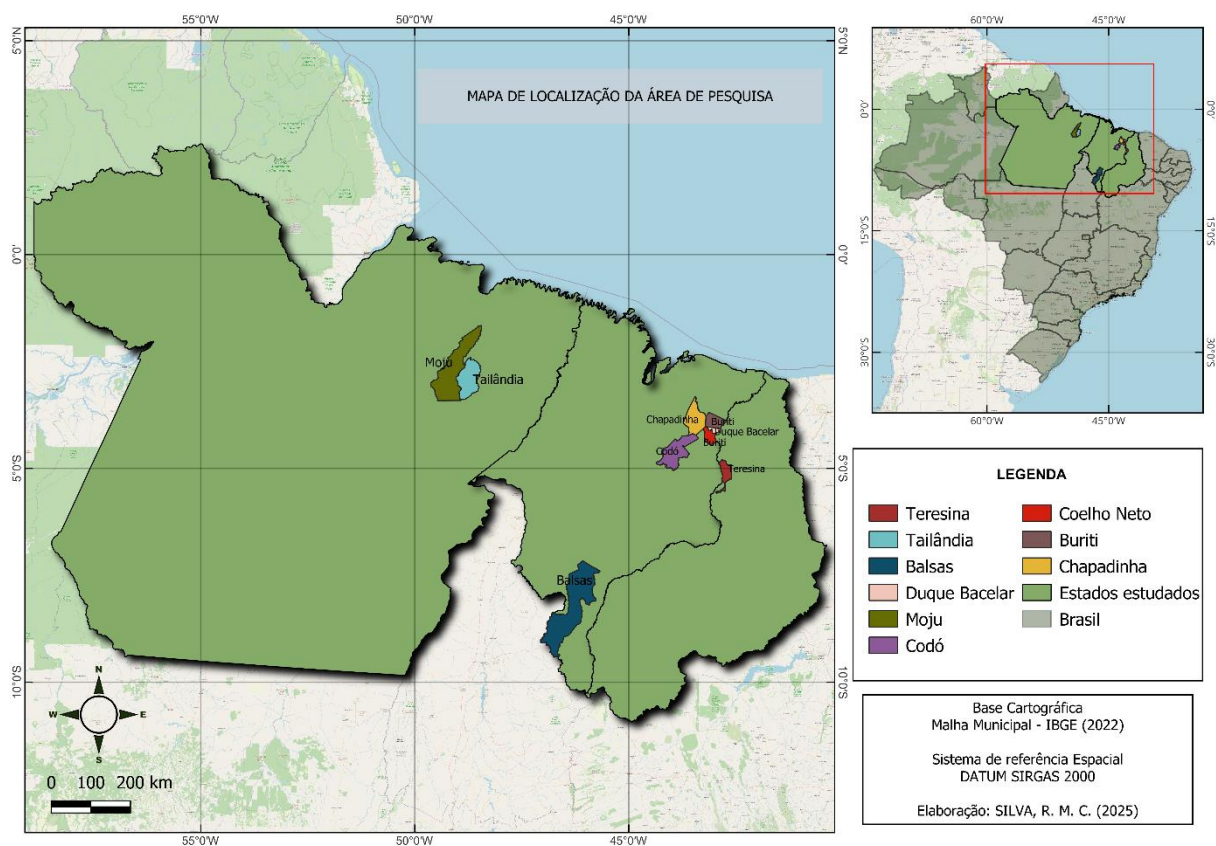


Figura - 1. Mapa de localização das cidades de coleta de *R. palmarum* e *M. hemipterus* nos Estados do Maranhão, Piauí e Pará, de julho /2023 a novembro/2024, em ambiente nativo e cultivado de palmáceas.



Figura – 2. Armadilha do tipo balde utilizada para captura de insetos. A. Tampa do balde equipada com funil e orifícios de ventilação padronizados (7 mm); B. Feromônio rincorfol posicionado na extremidade do funil; C. Colmos de cana-de-açúcar utilizados como isca.

Os besouros foram quantificados, identificados e sexados seguindo a metodologia de Schlickmann-Tank (2020); Zorzenon (2000); Ferreira (1998) e a razão sexual (RS) foi calculada utilizando a equação: a razão sexual (rs), utilizando-se a equação: $rs = \text{fêmea}/(\text{fêmea}+\text{macho})$ e, posteriormente, os insetos foram acondicionados nas condições de 4°C (+_5) por 24 h. Posteriormente, foi realizado o procedimento de desinfestação, utilizando uma solução de água destilada e hipoclorito de sódio a 5%, por três minutos. Após esse período, os insetos foram transferidos para outra solução contendo apenas água esterilizada, permanecendo durante dez minutos. Em seguida, os besouros foram depositados sobre papel-toalha para remover o excesso de umidade. Para verificar a presença de esporos de *Thielaviopsis* na parte externa, os besouros foram depositados em placas de Petri contendo o meio de cultivo BDA (Ágar Batata Dextrose). Após três dias de incubação os fragmentos de micélio foram removidos e transferidos para uma nova placa de Petri com BDA (Parra et al., 2003).

Purificação e caracterização morfológica dos fungos

Para obter culturas monospóricas, inicialmente, os isolados foram cultivados em meio de cultura BDA. Após 3 dias de incubação, pequena porção de micélio foi transferida em microtubos contendo água destilada esterilizada. Com auxílio de uma pipeta, 1 ml de suspensão de esporos foi transferido para uma nova placa contendo meio Ágar-Água, mantida incubada por 24 horas. Após este período, observaram-se as placas em microscópio estereoscópico e, com o auxílio de uma agulha hipotérmica esterilizada, foi transferido um único esporo germinado para placas contendo BDA. As placas foram incubadas a 25 °C durante 10 dias. Após seis dias de desenvolvimento das culturas, todos os isolados foram preservados em microtubos contendo glicerol a 15%. Para a caracterização morfológica, os isolados também foram cultivados em extrato de malte a 2%, sobre a superfície do meio depositaram-se pequenos pedaços de tecido de colmos de cana esterilizados. As placas foram incubadas a 25 °C no escuro. Após 10 dias de cultivo, avaliaram-se os marcadores morfológicos como coloração e aspecto de culturas, morfologia e disposição de esporos e medição dos mesmos (Mbenoun et al., 2014).

Extração de DNA

Os fungos foram cultivados em meio líquido à base de extrato de malte 2%, por três dias, em temperatura ambiente e sob agitação de 100 rpm. O micélio foi filtrado, macerado em nitrogênio líquido e o DNA, extraído com o uso do kit de extração Wizard® Genomic DNA

purification kit (Promega Brasil, São Paulo, BR). O DNA extraído teve sua concentração determinada em NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA).

PCR, sequenciamento e análises filogenéticas

As análises filogenéticas foram realizadas com sequências de DNA da região gênica: ITS. Os seguintes pares de primers foram utilizados nas reações de PCR e de sequenciamento: ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') e ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para a região ITS (WHITE et al.,1990). Foi utilizada uma concentração: 1 µL de DNA total das amostradas. As PCRs foram realizadas com as seguintes concentrações: 12.5 µL Taq PCR Master Mix 2x, 2 µL de cada primer (*reverse* e *forward*) e 9 µL de água ultrapura, totalizando um volume final de 25 µL. As condições das reações seguiram recomendações dadas pelos respectivos autores de cada par de primers. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed (Biotium®), com posterior visualização realizada em um transluminador. O comprimento dos fragmentos amplificados foi comparado com um marcador de comprimento de fragmentos 1 Kb. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Brasil, São Paulo, BR). Os fragmentos dos genes foram sequenciados na empresa Macrogen, USA. Os eletroferogramas gerados foram analisados visualmente com o auxílio do programa SeqAssem (Hepperle, 2004) e as sequências editadas foram comparadas com a base de dados GenBank, do 7 National Center for Biotechnological Information – NCBI, por meio do programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/>). Sequências de referências correspondentes a ITS das espécies do complexo *T. paradoxa*, previamente depositadas no GenBank, também foram acrescentadas às análises. No programa MEGA 6® (Tamura et al.,2011) foram feitos os alinhamentos múltiplos das sequências utilizando-se a ferramenta CLUSTALW (Thompson et al., 1994). Foram realizadas análises filogenéticas com base no princípio da Inferência Bayesiana, utilizando o software Mr Bayes 3.1.2 (Ronquist et al., 2011).

Inoculação dos isolados em frutos de coqueiro

Para realizar as inoculações em frutos de coco, selecionou-se 84 frutos com ausência de sintomas de fungo ou lesão por insetos-praga. Logo após, desinfestados superficialmente com hipoclorito a 0,3 % e água por 5 minutos. Os frutos desinfestados foram colocados em bandejas para secar. Em seguida, com auxílio de um perfurador realizou-se o ferimento de aproximadamente 10 mm de profundidade na superfície do fruto. Inocularam-se discos de micélio com diâmetro de (0,4 mm) de *Thielaviopsis* sp. transferidos das culturas com 7 dias de

incubação. Para os frutos-testemunha, depositaram-se discos de BDA de 0,4 mm, sem a presença do fungo.

O experimento foi realizado com 20 isolados e, para cada um deles, foram utilizados quatro frutos. Dessa forma, cada isolado foi inoculado em quatro frutos, totalizando 84 frutos para o ensaio. Desses, quatro não receberam inoculação fúngica, sendo nomeados como testemunhas negativas. Após as inoculações, os frutos de coco foram armazenados em bandejas por oito dias em temperatura de 28 °C e fotoperíodo de 12h.

Para confirmar a identidade do fungo, transferiram-se pequenos fragmentos de micélio depositados em meio de cultura BDA (Santos et al., 2017). O parâmetro qualitativo foi realizado a partir da presença ou ausência de sintomas na parte externa e interna do fruto. O parâmetro quantitativo foi a avaliação do comprimento da lesão causado pelo patógeno (agressividade), medindo a colonização interna com o auxílio de fita métrica.

Inoculação dos isolados em frutos de abacaxi

Para realizar as inoculações em frutos de abacaxi, a metodologia foi semelhante, selecionou-se 84 frutos com ausência de sintomas de fungo ou lesão por insetos-praga. Logo após, desinfestados superficialmente com hipoclorito a 0,3 % e água por 5 minutos. Os frutos desinfestados foram colocados em bandejas para secar. Em seguida, com auxílio de um perfurador realizou-se o ferimento de aproximadamente 10 mm de profundidade na superfície do fruto. Inocularam-se discos de micélio com diâmetro de (0,4 mm) de *Thielaviopsis* sp. transferidos das culturas com 7 dias de incubação. Para os frutos-testemunha, depositaram-se discos de micélio de 0,4 mm, sem a presença do fungo.

O experimento foi realizado com 20 isolados e, para cada um deles, foram utilizados quatro frutos. Dessa forma, cada isolado foi inoculado em quatro frutos, totalizando 84 frutos para o ensaio. Desses, quatro não receberam inoculação fúngica, sendo nomeados como testemunhas negativas. Após as inoculações, os frutos de abacaxi foram armazenados em bandejas por sete dias em temperatura de 28 °C e fotoperíodo de 12h.

Para confirmação da identidade do fungo, fragmentos de micélio foram transferidos para meio de cultura BDA, conforme descrito por Santos et al. (2017). A análise qualitativa consistiu na verificação da presença ou ausência de sintomas visíveis nas partes externa e interna dos frutos. Já a análise quantitativa avaliou o grau de agressividade do patógeno, por meio da medição do comprimento da lesão interna, utilizando-se uma fita métrica para aferição da colonização fúngica.

Inoculação dos isolados em cana-de-açúcar

O teste de inoculação dos colmos de cana-de-açúcar foi realizado em colmos com 1 metro de comprimento. Na base do colmo, depositou-se 1 mL de suspensão de esporos na concentração de 1×10^6 conídios/mL e, logo depois, utilizou-se papel filme sobre a área inoculada. Nos colmos-controle, depositou-se apenas água destilada esterilizada. Os colmos inoculados foram incubados em ambiente climatizado 25 °C e fotoperíodo de 12h. As repetições continham 4 colmos cada. Quinze dias após a inoculação, os colmos foram seccionados longitudinalmente para avaliação visual e mensuração da colonização (Chapola et al., 2014).

As análises de agressividade do tamanho do comprimento, tanto em frutos de coqueiro quanto em abacaxi, foram submetidas ao programa Rstudio, a testes paramétrico com normalidade Shapiro-Wilk, homogeneidade teste de Bartlett, Tukey para teste em cana-de-açúcar utilizou-se o teste Scott-Knott a 5% de significância.

3. Resultados

Foram coletados 1.272 besouros nas áreas de dendezeiros, coqueiro e áreas nativas com palmeiras (babaçu, buriti), totalizando 1.018 indivíduos de *R. palmarum* (figura 3) e 245 indivíduos de *M. hemipterus* (figura 4). A razão sexual de *R. palmarum* foi de 0,62.

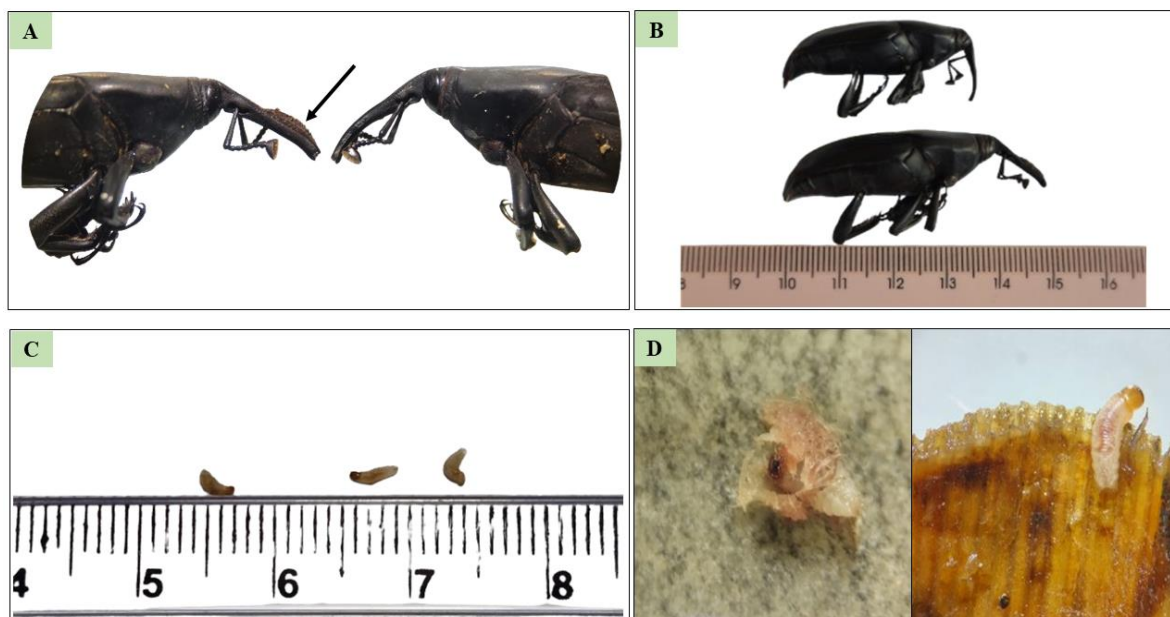


Figura – 3. *Rhynchophorus palmarum*. A. Diferença entre fêmea e macho: o macho ♂ apresenta pelos no rosto, ausentes na fêmea ♀; B. Adulto de *R. palmarum* variando de 40 a 60 mm de comprimento; C. Larva atingindo até 75 mm de comprimento e 25 mm de largura ao final do desenvolvimento; D. Larva de coleóptero com coloração branco-creme.

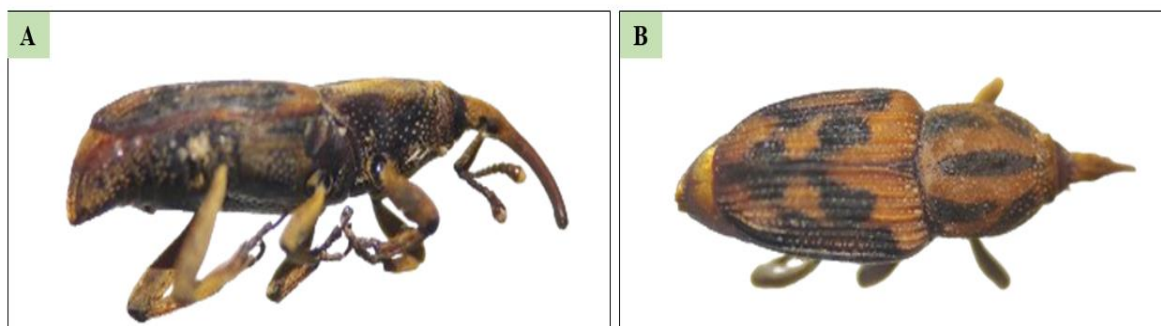


Figura – 4. *Metamasius hemipterus*. A. Vista lateral do adulto; B. Vista dorsal do adulto. Os adultos apresentam coloração castanho alaranjado, com manchas e faixas no abdômen.

Três dias após o plaqueamento, observou-se crescimento micelial de coloração branca sobre os besouros de *R. palmarum* e *M. hemipterus*. O micélio apresentou crescimento rápido, com coloração inicialmente branca, tornando-se escuro com a idade (figura 5). Obteve 57 isolados de *Thielaviopsis*, sendo 38 isolados provenientes de *R. palmarum* e 17 isolados de *M. hemipterus* (Tabela 1) observou-se que a maioria dos isolados de *Thielaviopsis* foram obtidos de besouros fêmeas de *R. palmarum* (tabela 2).

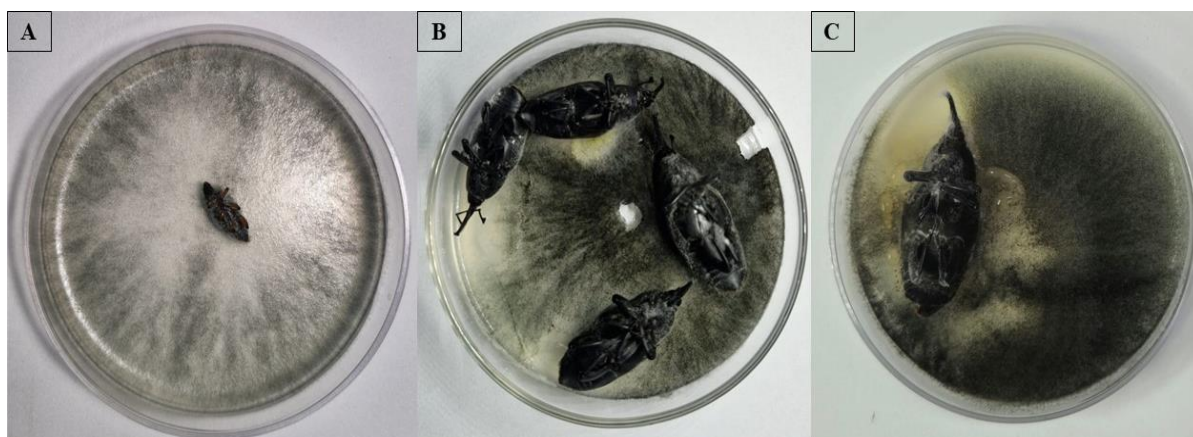


Figura – 5. Resultado do isolamento fúngico em placa de BDA com insetos vetores coletados em ambiente nativo e cultivado, em 2024. A - *Metamasius hemipterus* sp.; B e C- *Rhynchophorus palmarum*.

Tabela 1 - Isolados de *Thielaviopsis* sp. obtidos de *R. palmarum* e *M. hemipterus* em diferentes municípios brasileiros, de julho de 2023 a novembro de 2024.

Código	Isolado	Planta	Vetor	Município
RD 01	<i>Thielaviopsis</i> sp.	<i>Attalea speciosa</i>	<i>R. palmarum</i>	Codó-MA
RD 02	<i>T. ethacetica</i>	<i>Attalea speciosa</i>	<i>R. palmarum</i>	Codó-MA
RD 03	<i>T. ethacetica</i>	<i>Attalea speciosa</i>	<i>R. palmarum</i>	Codó-MA
RD 04	<i>Thielaviopsis</i> sp.	<i>Attalea speciosa</i>	<i>M. hemipterus</i>	Codó-MA
RD 05	<i>T. ethacetica</i>	<i>Attalea speciosa</i>	<i>M. hemipterus</i>	Teresina-PI
RD 06	<i>Thielaviopsis</i> sp.	<i>Attalea speciosa</i>	<i>M. hemipterus</i>	Codó-MA
RD 07	<i>Thielaviopsis</i> sp.	<i>Attalea speciosa</i>	<i>M. hemipterus</i>	Codó-MA
RD 12	<i>Thielaviopsis</i> sp.	<i>Attalea speciosa</i>	<i>R. palmarum</i>	Teresina-PI
RD 13	<i>T. ethacetica</i>	<i>Attalea speciosa</i>	<i>M. hemipterus</i>	Chapadinha-MA
RD 14	<i>T. ethacetica</i>	<i>Attalea speciosa</i>	<i>M. hemipterus</i>	Chapadinha-MA
RD 16	<i>Thielaviopsis</i> sp.	<i>Attalea speciosa</i>	<i>M. hemipterus</i>	Chapadinha-MA
RD 18	<i>T. ethacetica</i>	<i>Attalea speciosa</i>	<i>M. hemipterus</i>	Chapadinha-MA
RD 24	<i>Thielaviopsis</i> sp.	<i>Attalea speciosa</i>	<i>R. palmarum</i>	Teresina-PI
RD 25	<i>T. ethacetica</i>	<i>Attalea speciosa</i>	<i>R. palmarum</i>	Teresina-PI
RD 27	<i>T. cerberus</i>	<i>Attalea speciosa</i>	<i>R. palmarum</i>	Teresina-PI
RD 28	<i>T. ethacetica</i>	<i>Attalea speciosa</i>	<i>R. palmarum</i>	Teresina-PI
RD 30	<i>Thielaviopsis</i> sp.	<i>Attalea speciosa</i>	<i>R. palmarum</i>	Teresina-PI
RD 31	<i>T. ethacetica</i>	<i>Attalea speciosa</i>	<i>R. palmarum</i>	Teresina-PI
RD 33	<i>Thielaviopsis</i> sp.	<i>Attalea speciosa</i>	<i>M. hemipterus</i>	Teresina-PI
RD 34	<i>T. ethacetica</i>	<i>Attalea speciosa</i>	<i>M. hemipterus</i>	Teresina-PI
RD 35	<i>T. ethacetica</i>	<i>Attalea speciosa</i>	<i>R. palmarum</i>	Teresina-PI
RD 36	<i>Thielaviopsis</i> sp.	<i>Attalea speciosa</i>	<i>R. palmarum</i>	Teresina-PI
RD 38	<i>Thielaviopsis</i> sp.	<i>Attalea speciosa</i>	<i>M. hemipterus</i>	Teresina-PI
RD 40	<i>Thielaviopsis</i> sp.	<i>Cocos nucifera</i>	<i>R. palmarum</i>	Moju - PA
RD 43	<i>Thielaviopsis</i> sp.	<i>Attalea speciosa</i>	<i>R. palmarum</i>	Teresina-PI
RD 44	<i>Thielaviopsis</i> sp.	<i>Attalea speciosa</i>	<i>R. palmarum</i>	Teresina-PI
RD 45	<i>Thielaviopsis</i> sp.	<i>Attalea speciosa</i>	<i>R. palmarum</i>	Teresina-PI
RD 46	<i>Thielaviopsis</i> sp.	<i>Attalea speciosa</i>	<i>R. palmarum</i>	Teresina-PI
RD 48	<i>Thielaviopsis</i> sp.	<i>Attalea speciosa</i>	<i>R. palmarum</i>	Teresina-PI
RD 49	<i>Thielaviopsis</i> sp.	<i>Attalea speciosa</i>	<i>R. palmarum</i>	Teresina-PI
RD 50	<i>Thielaviopsis</i> sp.	<i>Attalea speciosa</i>	<i>R. palmarum</i>	Teresina-PI
RD 51	<i>Thielaviopsis</i> sp.	<i>Attalea speciosa</i>	<i>R. palmarum</i>	Teresina-PI
RD 52	<i>Thielaviopsis</i> sp.	<i>Attalea speciosa</i>	<i>R. palmarum</i>	Teresina-PI

RD 53	<i>Thielaviopsis</i> sp.	<i>Attalea speciosa</i>	<i>M. hemipterus</i>	Teresina-PI
RD 54	<i>Thielaviopsis</i> sp.	<i>Attalea speciosa</i>	<i>R. palmarum</i>	Teresina-PI
RD 55	<i>Thielaviopsis</i> sp.	<i>Attalea speciosa</i>	<i>M. hemipterus</i>	Teresina-PI
RD 56	<i>Thielaviopsis</i> sp.	<i>Attalea speciosa</i>	<i>M. hemipterus</i>	Teresina-PI
RD 57	<i>Thielaviopsis</i> sp.	<i>Attalea speciosa</i>	<i>M. hemipterus</i>	Teresina-PI
RD 61	<i>T. cerberus</i>	<i>Attalea speciosa</i>	<i>M. hemipterus</i>	Teresina-PI
RD 62	<i>Thielaviopsis</i> sp.	<i>Attalea speciosa</i>	<i>M. hemipterus</i>	Teresina-PI
RD 63	<i>Thielaviopsis</i> sp.	<i>Attalea speciosa</i>	<i>R. palmarum</i>	Teresina-PI
RD 67	<i>Thielaviopsis</i> sp.	<i>Attalea speciosa</i>	<i>R. palmarum</i>	Teresina-PI
RD 68	<i>Thielaviopsis</i> sp.	<i>Attalea speciosa</i>	<i>R. palmarum</i>	Teresina-PI
CM 01	<i>Thielaviopsis</i> sp.	<i>Cocos nucifera</i>	<i>R. palmarum</i>	Balsas - MA
CM 02	<i>T. ethacetica</i>	<i>Cocos nucifera</i>	<i>R. palmarum</i>	Balsas - MA
CM 03	<i>T. ethacetica</i>	<i>Cocos nucifera</i>	<i>R. palmarum</i>	Balsas - MA
CM 05	<i>Thielaviopsis</i> sp.	<i>Cocos nucifera</i>	<i>R. palmarum</i>	Balsas - MA
MP 339	<i>Thielaviopsis</i> sp.	Dendezeiro	<i>R. palmarum</i>	Tailândia-PA
MP 340	<i>Thielaviopsis</i> sp.	Dendezeiro	<i>R. palmarum</i>	Tailândia-PA
MP 341	<i>Thielaviopsis</i> sp.	Dendezeiro	<i>R. palmarum</i>	Tailândia-PA
MP 342	<i>Thielaviopsis</i> sp.	Dendezeiro	<i>R. palmarum</i>	Tailândia-PA
MP 344	<i>Thielaviopsis</i> sp.	Dendezeiro	<i>R. palmarum</i>	Tailândia-PA
MP 345	<i>Thielaviopsis</i> sp.	Dendezeiro	<i>R. palmarum</i>	Tailândia-PA
MP 346	<i>Thielaviopsis</i> sp.	Dendezeiro	<i>R. palmarum</i>	Tailândia-PA
MP 347	<i>Thielaviopsis</i> sp.	Dendezeiro	<i>R. palmarum</i>	Tailândia-PA
MP 348	<i>Thielaviopsis</i> sp.	Dendezeiro	<i>R. palmarum</i>	Tailândia-PA
MP 304	<i>T. ethacetica</i>	Abacaxi	Test. Positiva	São Domingos -MA

Tabela 2 - Percentual de *Thielaviopsis* sp. associados a macho e fêmea de *R. palmarum*, obtido nos estados do Maranhão, Piauí e Pará, em 2024.

	1º Coleta	2º Coleta	3º Coleta	4º Coleta	5º Coleta	Total	%
<i>R. palmarum</i>	34	68	44	38	93	277	
Fêmea	5	2	2	9	5	23	8,3
Macho	-	-	2	3	3	8	2,8

Não foram obtidos isolados de *Thielaviopsis* de *R. palmarum* e *M. hemipterus* coletados nas cidades de Buriti, Coelho Neto e Duque Bacelar. De acordo com a análise filogenética baseada em sequências da região ITS (figura 6), a coleção de isolados de *Thielaviopsis*, obtidos de *R. palmarum* e *M. hemipterus*, pertence ao complexo *Thielaviopsis paradoxa*. Quinze isolados agruparam com o isolado de referência de *T. ethacetica*. Dois isolados não agruparam com nenhuma espécie do complexo, mas ficaram próximos de *T. cerberus*. O sequenciamento adicional de outras regiões gênicas será realizado com objetivo de revelar a identidade destes dois isolados.

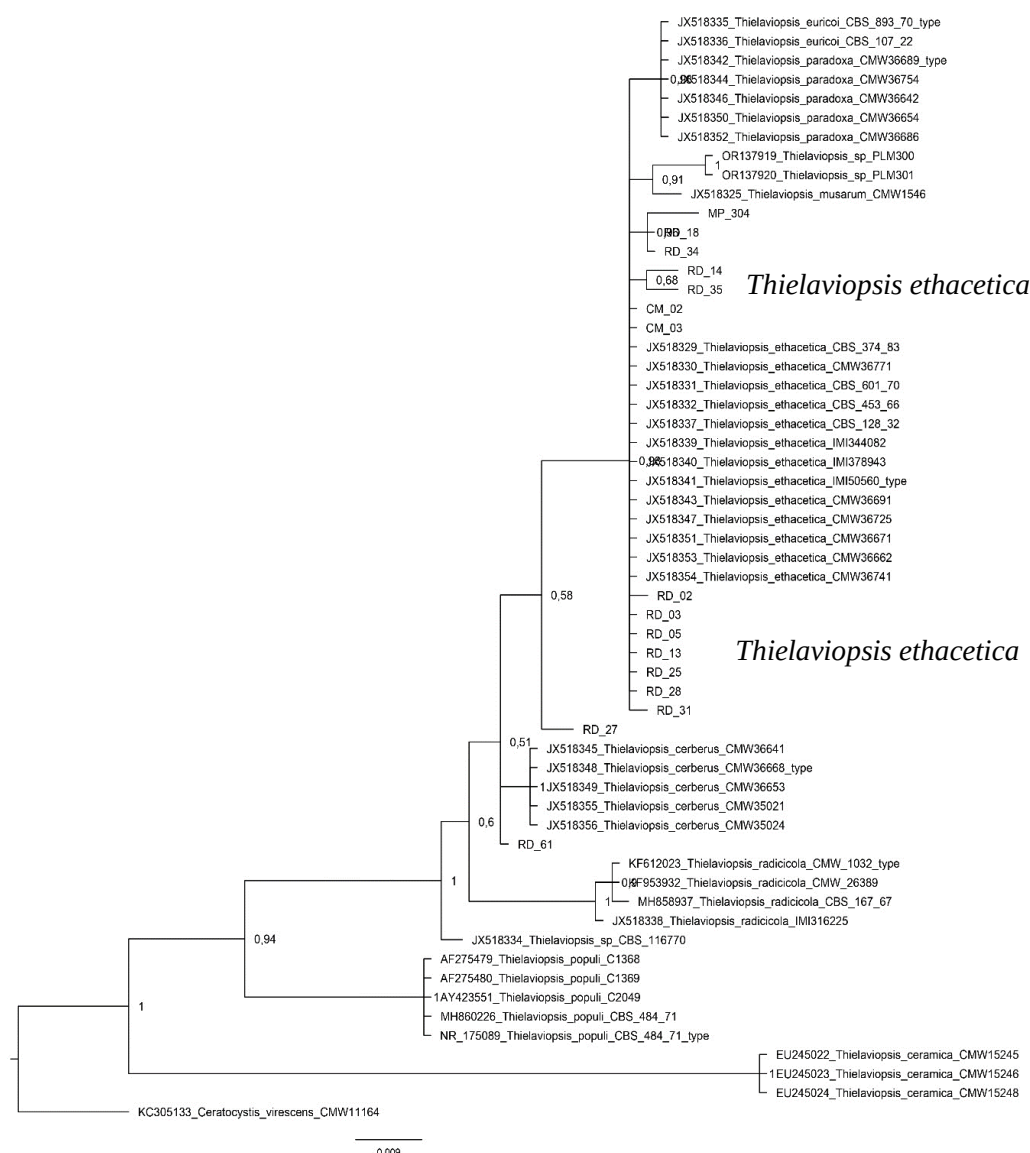


Figura – 6. Resultado da análise filogenética pela inferência de Bayesiana de *Thielaviopsis* sp. com região ITS.

Ao caracterizar os isolados, observou que as culturas inicialmente eram brancas, tornando-se negras com a idade (figura 9). Visualizaram-se conídios primários, com formato retangulares e hialino, medindo 8,62µm de comprimento e 5,24µm de largura. Os conídios

secundários tinham formato variando de oval a retangulares, com coloração escura, medindo (9,56 μm de comprimento e 6,07 μm de largura) (figura 7). Os isolados RD 27 e RD 61, apresentou culturas inicialmente brancas evoluindo para coloração cinza escuro, com a presença de peritécios, rostrados, ornamentações na base do peritécio, medindo 237,53 μm de comprimento e 237,85 μm de largura (figura 8). Sinêmios não foram produzidos em nenhum dos isolados caracterizados.

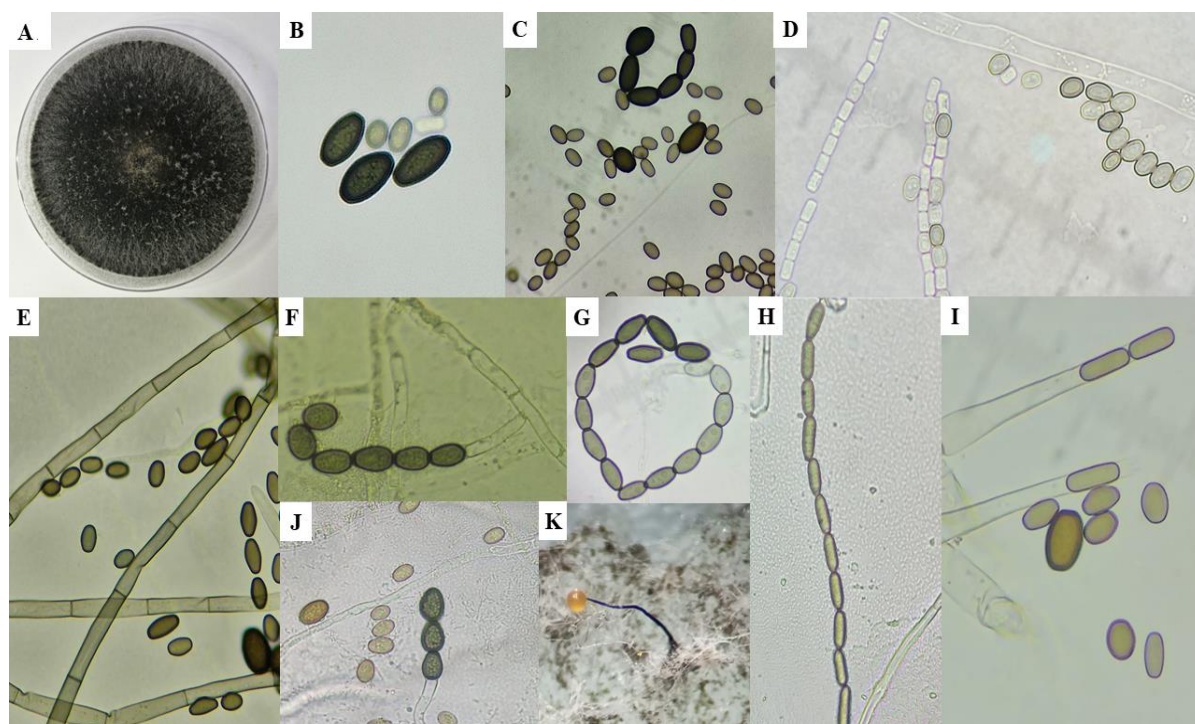


Figura -7. Marcadores morfológicos de *Thielaviopsis paradoxa* obtidos de insetos vetores. A, Fungo em placa de BDA.; B, conídio primário e secundário, aleuroconídio.; C, conídios secundários e aleuroconídio.; D, conídios primários em cadeia hialino.; E, conídios secundários solitários.; F, G, H, conídios secundários em cadeia.; I, J conídios secundários heterotáticos.; K, peritécio.

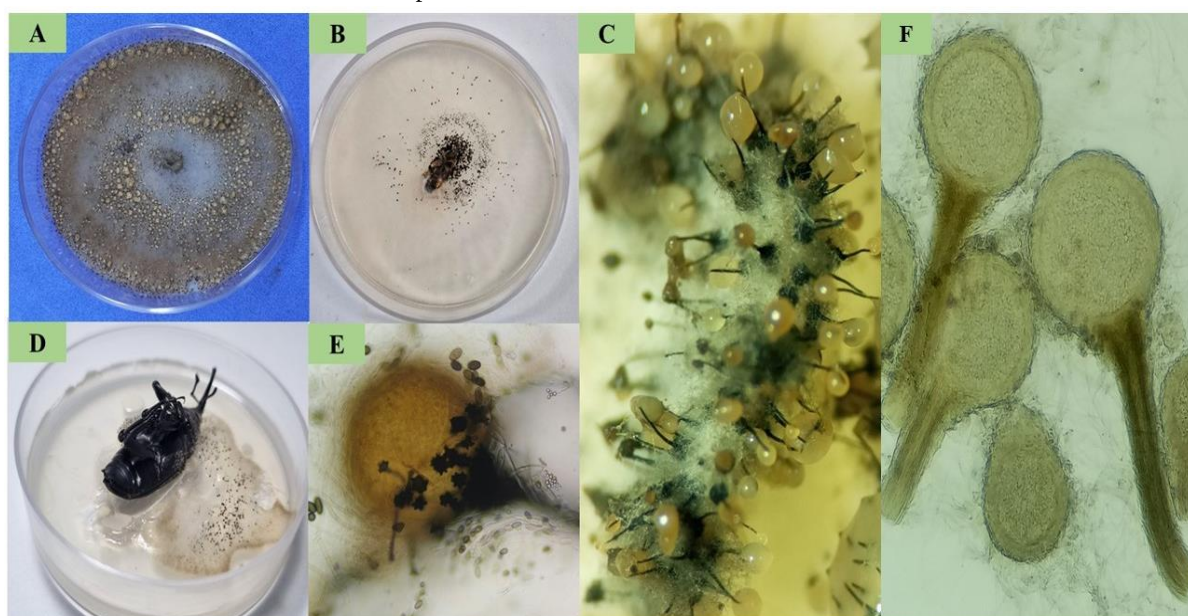


Figura – 8. Marcadores morfológicos de *Thielaviopsis cerberus* obtido de insetos vetores. Na sequência: A- Placa de *T. cerberus* em meio BDA; B- *M. hemipterus* isolado em meio BDA; C- Massas de ascósporos; D- Resultado de isolamento de *R. palmarum* em meio BDA; E- Detalhe da base do peritécio (Ornamentação peritecical); F- Peritécios.

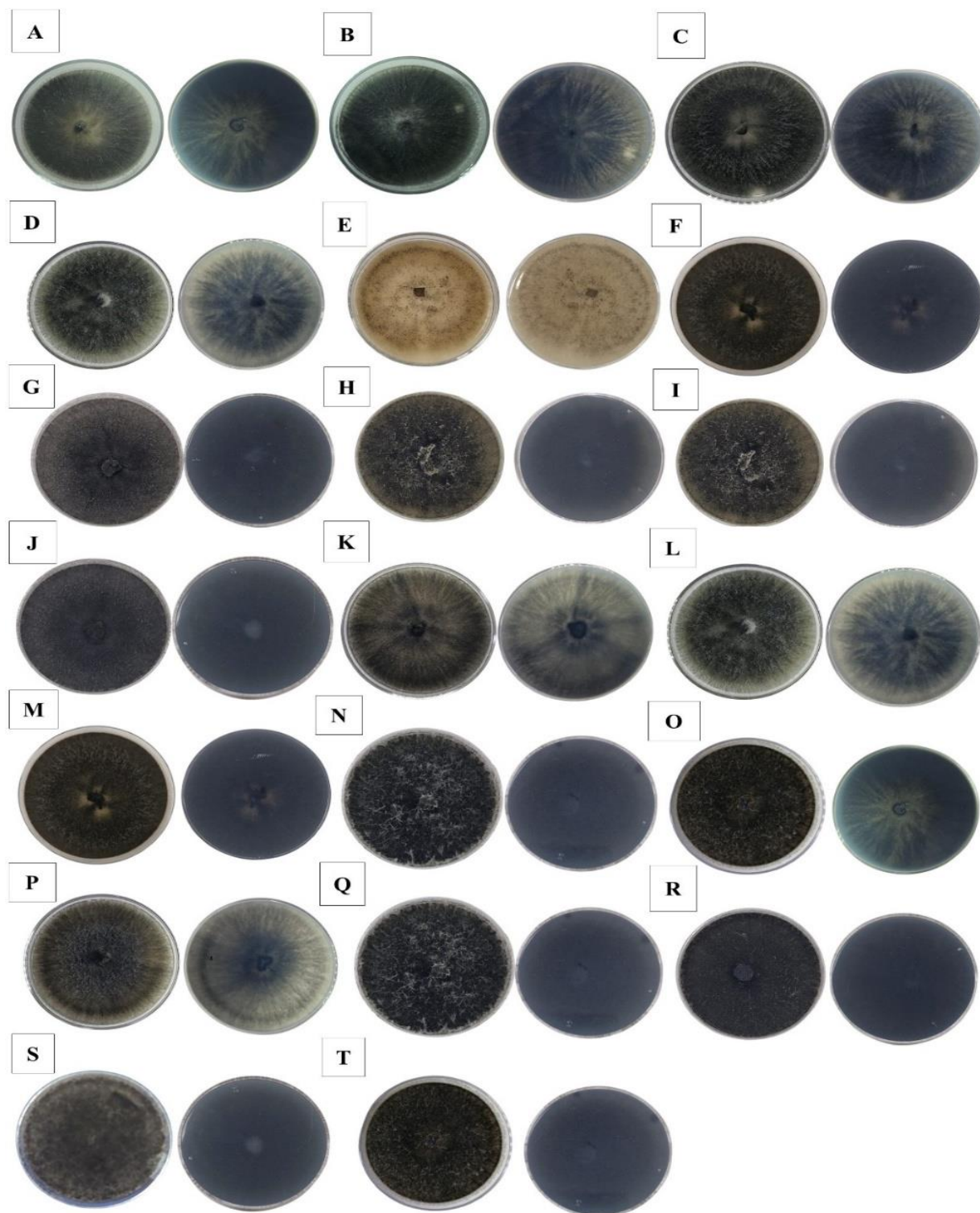


Figura – 9. Culturas de *Thielaviopsis* sp. em meio BDA (Ágar Batata Dextrose) após 3 dias de isolamento. Na sequência: A – RD 28; B- RD 30; C- RD 36; D- RD 04; E- RD 27; F- RD 05; G- RD 35; H- RD 38; I – RD 14; J- RD 31; K- RD 03; L- RD ;M- RD 34; N- RD 02; O- RD 01; P- MP 304; Q- RD 18; R- RD 16; S- RD 14; T- RD 16.

Todos os isolados obtidos de *R. palmarum* e de *M. hemipterus* foram patogênicos em frutos de coqueiro, abacaxi e cana-de-açúcar. Os frutos-testemunha não apresentam sintomas de podridão. Todos os isolados foram comprovados como *Thielaviopsis* spp. ao fim do experimento por meio do método de reisolamento.

Ao analisar os frutos de coco, após três dias da inoculação, verificou-se a presença de micélio branco. Após cinco dias, o fruto apresentou coloração preta sob a parte externa. Com oito dias, os frutos de coco encontravam-se podres e com coloração marrom claro, inviável, portanto, para o consumo (figura 10).

Os frutos de abacaxi, apresentaram os primeiros sintomas de mancha na casca e amolecimento do tecido com 3 dias após a inoculação. Após sete dias, observaram-se sintomas de apodrecimento do tecido com coloração negra a marrom, e a presença de liberação de líquido nos frutos (figura 12). Nas canas, houve a presença de escurecimento, encharcamento e cheiro característico da podridão do abacaxi (figura 14).

Os isolados de *T. ethacetica* inoculados em frutos de abacaxi e coco apresentaram níveis similares de agressividade (figura 11 e figura 13), enquanto o isolado de *T. cerberus* apresentou menor nível de agressividade comparado aos isolados de *T. ethacetica* (figura 11 e figura 13). Em colmos de cana-de-açúcar, os isolados de *T. ethacetica* apresentaram seis níveis de agressividade. O isolado de *T. cerberus* apresentou baixa agressividade em relação a *T. ethacetica* (figura 15).



Figura – 10. Sintomas de escurecimento e apodrecimento em frutos de coqueiro após oito dias de inoculação com *Thielaviopsis* sp. obtidos de *R. palmarum* e *M. hemipterus*. (A)- testemunha negativa (ausência do fungo); isolados

na sequência: (B)- RD 01; (C)- RD 02; (D)-RD 03; (E)- RD 04; (F)- RD 05; (G)- RD 13; (H)- RD 14; (I)- RD 16; (J)- RD 18; (K)- RD 27; (L)-RD 28; (M)- RD 30; (N)- RD 31; (O)- RD 34; (P)- RD 35; (Q)- RD 36; (R)- MP 304 (testemunha positiva); (S)- RD 33; (T)- RD 53; (U)- RD 38.

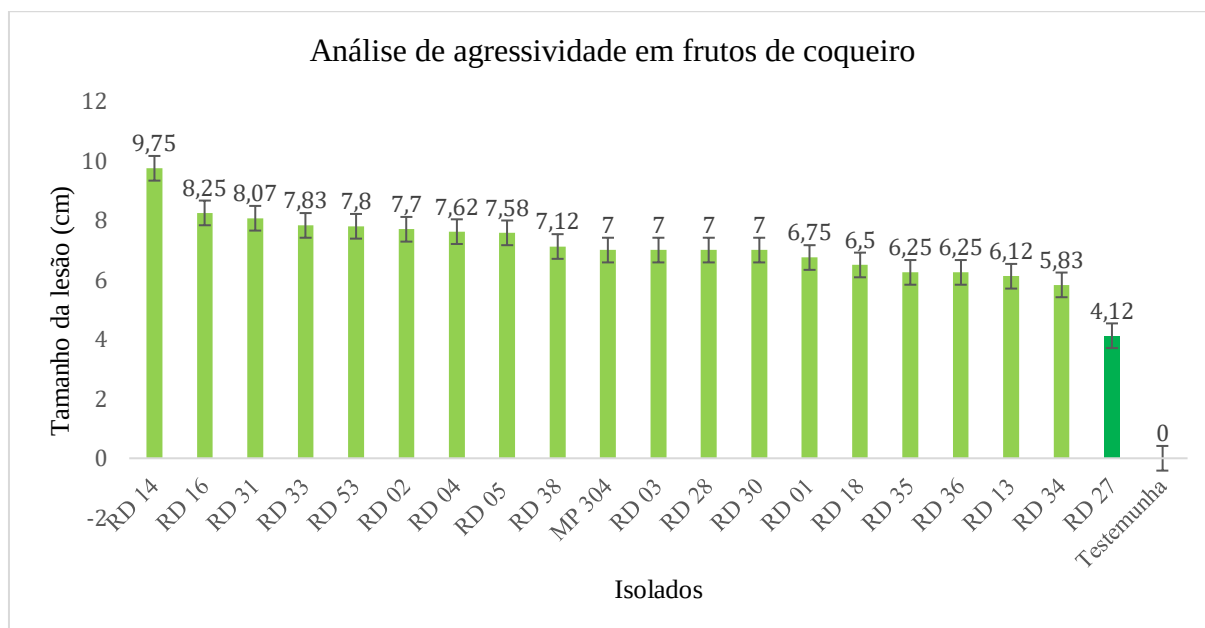


Figura 11. Medição do comprimento das lesões em frutos de coqueiro causadas por *Thielaviopsis* sp. O isolado RD 27 diferenciou-se estatisticamente dos demais, apresentando baixa agressividade. Em contraste, os demais isolados demonstraram-se altamente agressivos nos frutos.

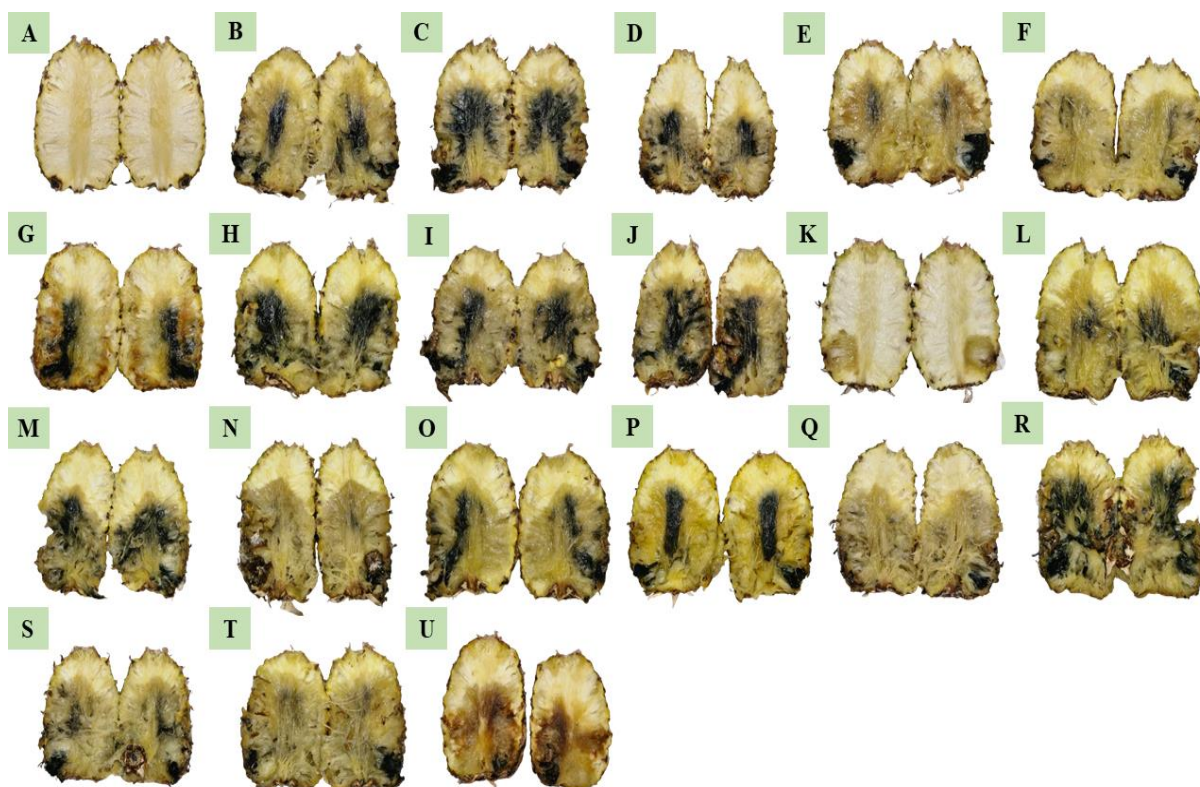


Figura – 12. Sintomas de podridão e amolecimento do fruto causados por isolados de *Thielaviopsis* sp. obtido de insetos vetores após sete dias. (A) Testemunha negativa, sem inoculação. (B–U) Frutos inoculados com diferentes isolados de *Thielaviopsis* spp., apresentando variações na severidade dos sintomas. Os códigos dos isolados são:

(B) RD 01, (C) RD 02, (D) RD 03, (E) RD 04, (F) RD 05, (G) RD 13, (H) RD 14, (I) RD 16, (J) RD 18, (K) RD 27, (L) RD 28, (M) RD 30, (N) RD 31, (O) RD 34, (P) RD 35, (Q) RD 36, (R) MP 304 (testemunha positiva), (S) RD 33, (T) RD 53, (U) RD 38.

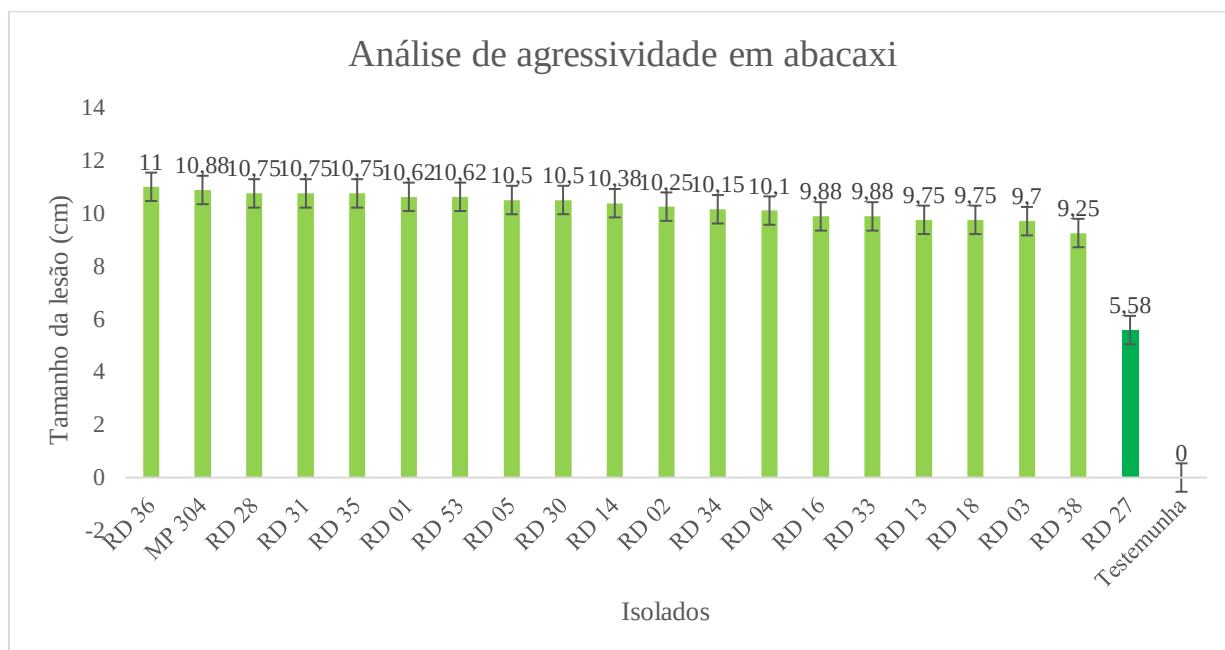


Figura – 13. Resultado das medições de isolados de *Thielaviopsis* sp. em frutos de abacaxi. Todos os isolados foram agressivos, exceto o isolado RD 27, que apresentou menor média comparado com os demais.

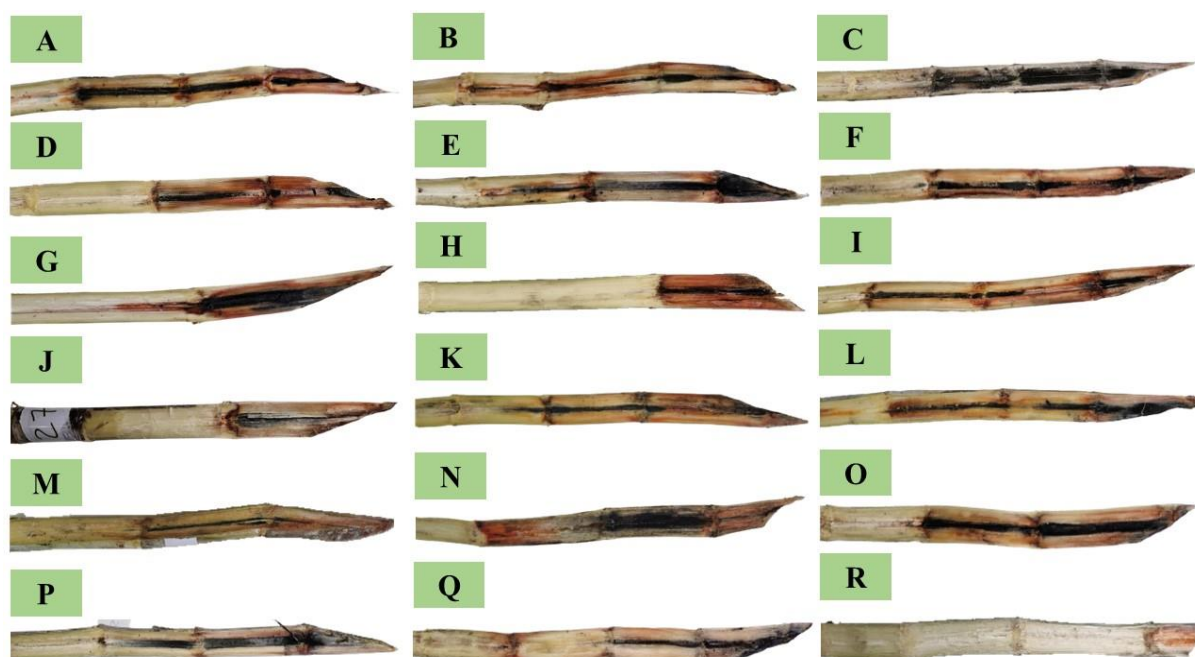


Figura – 14. Teste de inoculação com isolados de *Thielaviopsis* sp. obtido de insetos vetores em cana-de-açúcar com sintomas de escurecimento e podridão. Os códigos dos isolados são: (A)- RD 01; (B)- RD 02; (C)- RD 03; (D)- RD 04; (E)- RD 05; (F)- RD 13; (G)- RD 14; (H)- RD 16; (I)- RD 18; (J)- RD 27; (K)- RD 28; (L)- RD 31; (M)- RD 33; (N)- RD 34; (O)- RD 35; (P)- RD 36; (Q)- MP 304 Testemunha positiva; (R)- Testemunha negativa (ausência do fungo).

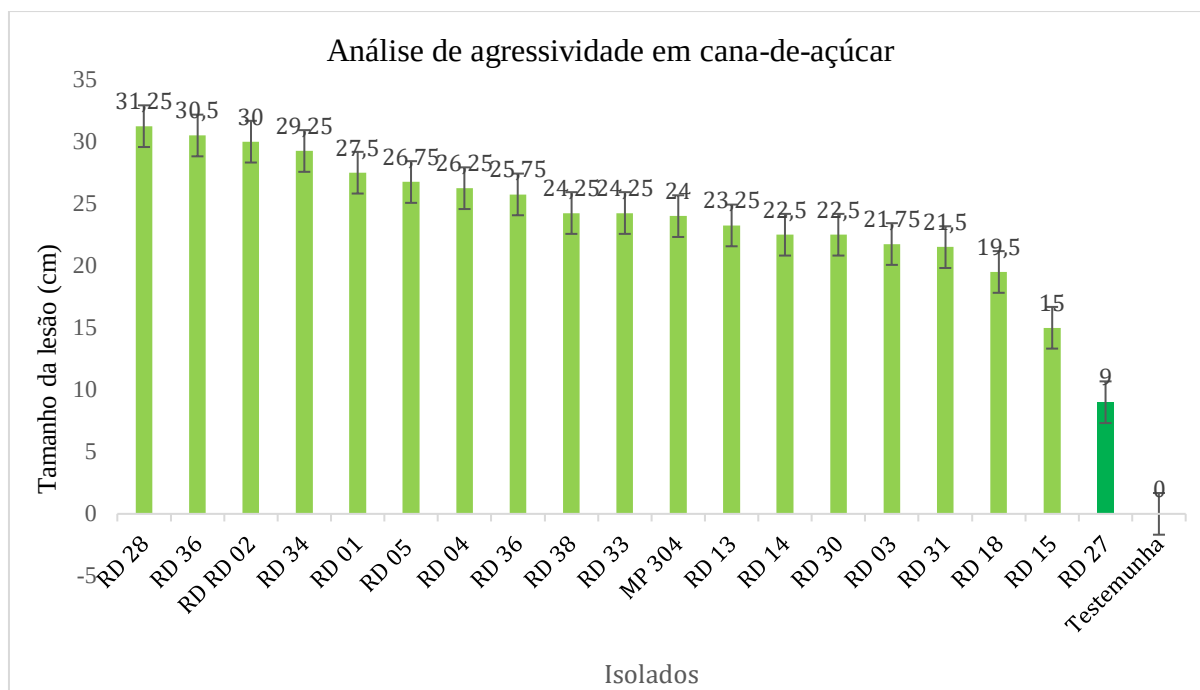


Figura – 15. Avaliação da agressividade de isolados fúngicos em colmos de cana-de-açúcar. Todos os isolados testados apresentaram alta agressividade, com exceção do isolado RD 27, que se mostrou um patógeno de baixa virulência.

4. Discussão

Baseado em uma ampla coleta de besouros, confirmou-se a associação de *T. ethacetica* associado a coleópteros coletados em áreas com a presença de palmeiras nativas e em áreas de cultivos de dendezeiro e coqueiro. Em algumas áreas de coleta, *Thielaviopsis* não foi isolado de *Rhynchophorus palmarum*, o que sugere que os insetos capturados provavelmente não visitaram palmeiras infectadas por fungos. Pesquisa conduzida no Norte do Brasil revelou a presença de *T. ethacetica* associado a fruteiras nativas, causando especificamente podridão de frutos (Rocha, 2022). Em cultivo de cacau, pesquisadores Sul-Africanos encontraram besouros do gênero *Brachypeplus*, dos quais se obtiveram dois isolados de *T. ethacetica*. Desta forma, acredita-se que estes besouros aumentam a pressão parasitária, atuando na disseminação de esporos deste patógeno (Mbenoun et al., 2015).

Em razão de os isolados induzirem podridão em frutos de coqueiro, abacaxi e cana-de-açúcar, este resultado sugere que a presença de inóculo nos insetos poderá ser um risco para plantas cultivadas, especialmente para as palmáceas, como coqueiro e dendezeiro, plantas que ambos os besouros visitam e completam seu ciclo de vida. Além disso, os tecidos dos frutos apresentavam amolecimento da polpa e casca, evidenciando a possível ação de enzimas líticas produzidas pelos patógenos (Mbenoun et al., 2015). No entanto, os isolados de *T. cerberus*

induziram sintomas de podridão, porém não se observou o amolecimento do tecido, sendo assim, sugere-se que, provavelmente, os isolados de *T. cerberus* não produzem enzimas líticas. Apesar deste fungo induzir doenças em ambos os hospedeiros, isolados de *T. cerberus* provenientes de frutos de cacauzeiro não induziram doenças, mesmo realizando fermentos (Mbenoun et al., 2015). Possivelmente, o isolado RD 27 perdeu o gene da patogenicidade, o que lhe confere essa característica genética de não apresentar padrões agressivos em relação aos demais isolados.

Thielaviopsis ethacetica é um patógeno de importância significativa em diversos hospedeiros, sendo a podridão de frutos o sintoma mais característico. Essa doença tem sido especialmente observada em frutos de abacaxi, coco, pupunha e nos colmos da cana-de-açúcar (Borgens et al., 2019; Mbenoun et al., 2015). De acordo com os dados de Almeida (2022), isolados de *T. ethacetica* provenientes de insetos apresentaram níveis de agressividade e patogenicidade semelhantes aos isolados obtidos diretamente de plantas. Esses resultados reforçam a hipótese de que o inseto *R. palmarum* atua como vetor do fungo, intensificando o processo de infecção ao causar fermentos que facilitam a entrada do patógeno. Além disso, *R. palmarum* pode exercer um papel relevante na disseminação de esporos entre plantas e diferentes áreas de cultivo (Almeida, 2022). Nossos próprios isolados, obtidos a partir de *R. palmarum* e *M. hemipterus*, também demonstraram potencial de agressividade, reforçando a relevância desses insetos como agentes dispersores do fungo.

Utilizando análise filogenética e avaliação dos marcadores morfológicos, confirmou-se que os isolados coletados dos insetos *M. hemipterus* e *R. palmarum* são *T. ethacetica* e *T. cerberus*. Os isolados de *T. ethacetica* agruparam junto com isolados de diferentes hospedeiros e regiões geográficas, resultando na formação de três subclados distintos. Acredita-se que a formação destes subclados é devida à alta variabilidade genética. Resultados de pesquisas recentes, revelaram que a população de isolados de *T. ethacetica* coletados em dendezeiro apresentou alta diversidade genética. Outrossim, utilizando-se marcadores moleculares, ficou evidente que “*T. ethacetica*” é representado por quatro linhagens filogenéticas distintas, demonstrando que está “espécie” é representada por um complexo taxonômico. Apesar desta diversidade dentro deste complexo, as espécies até o momento não foram descritas (Mbenoun et al., 2015). Sendo assim, acredita-se na possibilidade da existência de novas espécies de *Thielaviopsis* em diferentes hospedeiros no Brasil. Portanto, para confirmar esta hipótese, é necessário realizar a caracterização de isolados e de diferentes hospedeiros, com aplicação de novas técnicas como o sequenciamento e estudo reprodutivo (cruzamento).

Pela primeira vez, nesta pesquisa registra-se a associação entre *T. cerberus* e insetos, nos coleópteros *R. palmarum* e *M. hemipterus*. Este fungo foi coletado em plantas *Theobroma cacao* e *Elaeis guinenseis*. Após a descrição desta espécie, não se registrou sua ocorrência em nenhuma região geográfica do mundo (Mbenoun et al., 2014). No entanto, no Brasil, observou-se este fungo causando podridão em frutos de *Attalea maripa* (Rocha, 2022). Fungos da família *Ceratocystidaceae* na fase sexuada são adaptados para disseminação via coleópteros, uma vez que são atraídos por aromas frutados e em razão de os ascósporos serem pegajosos, aderindo facilmente à superfície do corpo do inseto (Heath et al., 2009).

Sendo assim, acredita-se na razão da existência de tantas ocorrências de associação de *Ceratocystis* em várias espécies de besouros que induzem perfurações em árvores (Malloch Blackwell, 1993). É importante ressaltar que o exoesqueleto de insetos é composto por quitina e queratina, o que o torna um lugar ideal para o crescimento de vários fungos proporcionando sua reprodução (Tetreau e Wang, 2019). De acordo com pesquisas anteriores, o aumento da população de insetos ocasiona o aumento de plantas com sintomas de murcha causados por *Ceratocystis* sp. (Hinds, 1972).

Este estudo revela a predominância de *T. ethacetica* associado a *R. palmarum* e *M. hemipterus*. De uma coleção de 57 isolados obtidos, detectou apenas 2 isolados com marcador morfológico de *T. cerberus*. O fato de se encontrar maior número de isolados *T. ethacetica* nos besouros é explicado por duas razões: primeiramente, *T. ethacetica* encontra-se distribuído em amplas regiões geográficas. Além disso, é um patógeno polífago, podendo está associado em várias plantas causando doenças. Ademais, estudos anteriores têm demonstrado que, no complexo *T. paradoxa*, a espécie *T. ethacetica* predomina em relação às demais, espécie do complexo *Thielaviopsis paradoxa*. Sendo assim, muitos isolados que são denominados como *T. paradoxa* podem ser *T. ethacetica*, uma vez que, durante muitos anos, a taxonomia deste fungo era definida por meio da caracterização morfológica, uma técnica não tão eficaz para a taxonomia deste grupo a nível de espécie (Mbenoun et al., 2014).

Durante os isolamentos, observou-se a presença de algumas culturas com a presença da fase sexuada de isolados de *T. ethacetica*. Sendo assim, confirma-se que existem esporos de *T. ethacetica* de ambos os tipos de acasalamento (*Mat-1* e *MAT-2*). *T. ethacetica* é um fungo heterotático que requer dois parceiros de acasalamento compatíveis (portadores de tipos de acasalamento opostos, *MAT 1-1* e *MAT 1-2*), para produzir esporos sexuais, como ascósporos (Mbenoun et al., 2014).

Neste estudo, foi possível confirmar que os isolados não pertenciam a *T. paradoxa* s. stric., em função de que nenhum dos isolados caracterizados não produziu sinemata, marcador

típico das espécies *T. paradoxa* e *T. euricoi* (Mbenoun et al., 2014). No entanto, foi possível identificar morfológicamente os isolados de *T. cerberus*, em função de que esta espécie é a única do complexo *T. paradoxa* que produz muitos peritécios em meios de cultura. As espécies do complexo *T. paradoxa* possuem grande plasticidade morfológica das estruturas assexuais, consequentemente, isso levou a uma grande confusão taxonômica durante muitos anos. Como exemplo, *T. paradoxa* s. scr. passou por alterações de nomes, inicialmente denominado como *Spororischima paradoxum*, *Ceratocystis paradoxa* e *Chalara paradoxa*. No entanto, esta confusão taxonômica foi resolvida com o emprego de ferramentas de biologia molecular (Mbenoun et al., 2014; De Beer et al., 2014).

Tem observado maior frequência de isolados de *Thielaviopsis* associado a besouros fêmea de *R. palmarum*. Acredita-se que está maior predominância é em função de que as fêmeas permanecem maior tempo na planta, local onde é realizada a postura dos ovos e onde ocorre o ciclo biológico. Resultados deste estudo evidenciam a importância dos besouros como potencial vetor de inóculo de *Thielaviopsis* spp., desse modo, a razão de encontrar esporos de *Thielaviopsis* associado ao exoesqueleto de ambas as espécies de besouros, acredita-se que, durante a interação besouros x palmeiras, ocorre a disseminação de esporos de palmeiras selvagens para palmeiras cultivadas (Almeida, 2022).

5. Conclusões

Este estudo revela a associação de *Thielaviopsis ethacetica* e *Thielaviopsis cerberus* nos besouros *R. palmarum* e *M. hemipterus*.

Este é o primeiro relato de *T. cerberus* sensu lato associado a *R. palmarum* e *M. hemipterus*.

Thielaviopsis ethacetica e *Thielaviopsis cerberus* s. l induziram podridão em frutos de abacaxi, coco e em colmos de cana-de-açúcar.

Isolou uma maior frequência de isolados de *Thielaviopsis* em fêmeas de *R. palmarum*.

6. Referências

BORGES, A. F.; NETO, F. A.; MATOS, K. S.; BESERRA JÚNIOR, J. E. A.; MASSOLA JÚNIOR, N. S.; MOREIRA, S. I.; MELO, M. P.; *Thielaviopsis ethacetica* the etiological agent of sugarcane pineapple sett rot disease in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 44, p. 460-467, 2019.

CARVALHO, R. R. C.; WARWICK, D. R. N.; SOUZA, P. E.; CARVALHO FILHO, J. L. S. Longevidade de *Thielaviopsis paradoxa*, agente causal da resinose do coqueiro em *Rhynchophorus palmarum*. **Scientia Plena**, v. 7, n. 4, 2011.

CHAPOLA, R.; OGASAWARA, G. A.; JANS, B; MASSOLA, N. Controle da podridão abacaxi da cana-de-açúcar por meio da pulverização de fungicidas em rebolos no sulco de plantio. **Ciência Rural**, v. 44. p.197-202. 2014.

DE BEER, Z.W; DUONG, T.A; BARNES, I.B.D; WINGFIELD, B.D; WINGFIELD M.J. Redefining *Ceratocystis* and allied genera. **Stud Mycol**, v.79, n.2, p. 187-219, 2014.

FRAEDRICH, S. W.; HARRINGTON, T. C.; RABAGLIA, R. J.; ULYSHEN, M. D.; MAYFIELD, A. E.; HANULA, J. L.; EICKWORT J. M.; MILLER, D. R. A fungal symbiont of the redbay ambrosia beetle causes a lethal wilt in redbay and other Lauraceae in the southeastern United States. **Plant Disease**, v.92, p.215-224, 2008.

FERREIRA, J. M. S.; WARWICK, D. R. N.; SIQUEIRA, L. A. A cultura do coqueiro no Brasil, 2ª ed. Revisada e ampliada SPI Brasília, Embrapa-SPI, Aracaju: **Embrapa** – CPATC. 292 p., 1998.

HARRINGTON, T. C. “Ecology and Evolution of Mycophagous Bark Beetles and Their Fungal Partners. In *Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution*, edited by F. E. Vega and M. Blackwell. New York: **Oxford University Press**, p. 257–291, 2005.

HEATH, R. N.; WINGFIELD, M. J.; VAN WYK, M.; ROUX, J. Insect associates of *Ceratocystis albifundus* and patterns of association in a native savanna ecosystem in South Africa. **Entomological Society of America**, v. 38, n. 2, p. 356-364, 2009.

HINDS, E. T, Insect transmission of *Ceratocystis* Species Associated with Aspen Cankers. **Phytopathology**, v. 62, 221-225, 1972.

HUGHES, M. A.; ROY, K.; HARRINGTON, T. C.; BRILL, E.; KEITH, L. M. *Ceratocystis lukuohia*-infested ambrosia beetle frass as inoculum for *Ceratocystis* wilt of ‘ōhi‘a (*Metrosideros polymorpha*). **Plant Pathology**, v. 72, 232-245, 2023.

MAYERS, C. G.; MCNEW, D. L.; HARRINGTON, T. C.; ROEPER, R. A.; FRAEDRICH, S. W.; BIEDERMANN, P. H. W.; CASTRILLO, L. A.; REED, S. E. Three genera in the *Ceratocystidaceae* are the respective symbionts of three independent lineages of ambrosia beetles with large, complex mycangia. **Fungal Biology**, v. 119, n. 11, p. 1075–1092, 2015.

MBENOUN, M.; WINGFIELD, M. J.; BOYOGUENO, A. D. B.; AMOUGOUB, F. N.; TIGANG, S. P.; HOOPEN, G. M. T.; MFEGUE, C. V.; DIBOG, L.; NYASSE, S.; WINGFIELD, B. D.; ROUX, J. Diversity and pathogenicity of the *Ceratocystidaceae* associated with cacao agroforests in Cameroon. **Plant Pathology**. v. 65, n. 1, p. 64-78, 2015.

MBENOUN, M.; DE BEER, Z. B.; WINGFIELD, M. J.; WINGFIELD, B. D.; ROUX J. Reconsidering species boundaries in the *Ceratocystis paradoxa* complex, including a new species from oil palm and cacao in Cameroon. **Mycologia**. v. 106, p.757-784., 2014.

MALLOCH, D.; BLACKWELL, M. Dispersal biology of the Ophiostomatoid fungi, pp. 195-206. In M. J. Wingfield, K. A. Seifert, and J. F. Webber (eds.), *Ceratocystis and Ophiostoma: taxonomy, ecology, and pathogenicity*. **APS Press**, St. Paul, MN, 1993.

PARRA, D.; MORILLO F.; SÁNCHEZ P.; PINEDA J.; GUERRA, J. Presencia de *Thielaviopsis paradoxa* em el tubo digestivo de *Rhynchophorus palmarum*. **Entomotropical**, v.18, p.49-55, 2003.

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; MARK, Van Der P.; AYRES, D.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M.A.; HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Syst Biol**, v.61, p.539-42, 2011.

ROCHA, F. V. R. da. **Espécies de *Thielaviopsis* em palmeiras selvagens e cultivada**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém-PA, 62p. 2022.

SANTOS, P.H.D.; MUSSI-DIAS, V.; FREIRE, M.G.M.; CARVALHO, B.M.; SILVEIRA, S.F. Diagrammatic scale of severity for postharvest black rot (*Ceratocystis paradoxa*) in: coconut palm fruits. **Summa Phytopathologica**, v.43, n.4, p.269-275, 2017.

SCHLICKMANN-TANK, J. A.; ENCISO-MALDONADO, G. A.; HAUPENTHAL, D. I.; LUNA-ALEJANDRO, G.; BADILLO-LÓPEZ, S. E. Detección y variación temporal de *Rhynchophorus palmarum* (Linnaeus) (Coleoptera: Dryophthoridae) en cultivos de *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart., Itapúa, Paraguay. **Revista Chilena de Entomología**, v. 46, n. 2, p. 163–169, 2020.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731–2739, 2011.

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

TETREAU, G.; WANG, P. Chitinous structures as potential targets for insect pest control. Advances in: **Experimental Medicine and Biology**, v. 1142, p. 273–292, 2019.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. **Academic Press**, v. 37, n. 1, p. 315-322, 1 Jan. 1990.

WINGFIELD, M. J.; BARNES, I.; DE BEER, Z. W.; ROUX, J.; WINGFIELD, B. D.; TAERUM, S. J. Novel associations between ophiostomatoid fungi, insects and tree hosts: current status—future prospects. **Biological Invasions**, v. 19, p. 3215-3228, 2017.

ZORZENON, F. J.; BERGMANN, E. C.; BICUDO, J. E. A. Primeira ocorrência de *Metamasius hemipterus* (Linnaeus, 1758) e *Metamasius ensirostris* (Germar, 1824) (Coleoptera: Curculionidae) em palmiteiros dos gêneros *Euterpe*, *Bactris* (Arecaceae) no Brasil. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v. 67, n. 2, p. 265-268, 2000.

Capítulo II

***Rhynchophorus palmarum* e *Metamasius hemipterus*: Possíveis vetores de *Lasiodiplodia* spp.**

Resumo

No Brasil, existem grandes áreas de produção de coqueiro, totalizando aproximadamente 280 mil hectares, distribuídos no território nacional, mas principalmente nas regiões Nordeste e Norte. Apesar de existir vários estudos que envolve a taxonomia de *Lasiodiplodia*, não se conhece nenhum estudo que envolve a associação deste gênero de fungo com besouros. *Rhynchophorus palmarum* e *Metamasius hemipterus* são importante besouros associado a palmáceas, ambos os besouros podem induzir injúrias, potenciando danos econômicos. Esta pesquisa sugere que *R. palmarum* e *M. hemipterus* são possíveis vetores do gênero *Lasiodiplodia*. Diante disso, objetivou-se caracterizar morfológicamente isolados de *Lasiodiplodia* obtidos de *R. palmarum* e *M. hemipterus* e verificar se os isolados induzem podridão em frutos de coqueiro. A presente pesquisa foi constituída nas seguintes etapas: coleta de besouros nos estados do Maranhão (Balsas), Piauí (Teresina) e Pará (Tailândia), plaqueamento dos besouros, isolamento, purificação, caracterização morfológica e teste de inoculação montado com 4 repetições e duas testemunhas de controle (ausência do fungo) para três isolados de *Lasiodiplodia* (RD 59, CM 04 e CM 06) durante 15 dias. Foram obtidos dez isolados de *Lasiodiplodia* sp. de *R. palmarum* e *M. hemipterus* de ambiente nativo e cultivado, três isolados causaram machas escuras e apodrecimento do fruto, com presença de picnídios. Em campo foi possível observar plantações de coqueiro com sintomas de seca dos ponteiros, caimento das folhas com presença de *R. palmarum* e *M. hemipterus* no local, no estado do Pará. Esta pesquisa registrou, pela primeira vez, a ocorrência de *Lasiodiplodia* sp. associado a *R. palmarum* e *M. hemipterus*.

Palavras-chaves: Interação ecológica; Espécies morfológicas; Patogenicidade.

Chapter II

***Rhynchophorus palmarum* and *Metamasius hemipterus*: Possible vectors of *Lasiodiplodia* spp.**

Abstract

Brazil has extensive coconut plantations, covering approximately 280,000 hectares, primarily located in the North and Northeast regions. Although the taxonomy of *Lasiodiplodia* has been well studied, its association with beetles remains unexplored. *Rhynchophorus palmarum* and *Metamasius hemipterus* are significant beetle species associated with palms that can cause economic losses by inflicting wounds that facilitate pathogen infection. This study proposes that both beetles are potential vectors of *Lasiodiplodia* spp. The objective was to morphologically characterize *Lasiodiplodia* isolates obtained from *R. palmarum* and *M. hemipterus* and assess their ability to cause fruit rot in coconuts. Methodology included beetle collection in Maranhão (Balsas), Piauí (Teresina), and Pará (Tailândia), followed by plating, fungal isolation and purification, morphological characterization, and inoculation tests. Three *Lasiodiplodia* isolates (RD 59, CM 04, and CM 06) were tested, with four replicates and two negative controls, over 15 days. Ten *Lasiodiplodia* sp. isolates were obtained from both beetle species in native and cultivated environments. Three isolates caused dark lesions and fruit rot, with pycnidia formation. In the field, coconut plantations in Pará showed symptoms such as spear leaf drying and leaf drop, where both beetles were present. This is the first report of *Lasiodiplodia* sp. associated with *R. palmarum* and *M. hemipterus*, suggesting their potential role as vectors of this fungal genus.

Keywords: Ecological interaction; Morphological species; Pathogenicity.

1. Introdução

A família *Botryosphaeriaceae* abrange 22 gêneros de fungos (Phillips et al., 2019). Dentre esses gêneros, destacam-se os patógenos *Lasiodiplodia*, *Pseudofusicoccum*, *Neoscytalidium*, *Neofusicoccum*, *Diplodia*, *Dothiorella* e *Botryosphaeria*, os quais afetam diversas culturas, ocasionando sintomas como queima das gemas, cancrios no caule e podridão dos frutos (Abdollahzadeh et al., 2010). A seca dos ponteiros é um sintoma provocado por fungos do gênero *Lasiodiplodia*, podendo ser observada a campo. Além disso, o gênero é capaz de colonizar praticamente todos os tipos de tecidos vegetais, incluindo sementes e frutos no pós-colheita (Alves et al., 2008; Cruywagen et al., 2017; Freire, 2004). Em determinadas condições, esses fungos podem sobreviver como organismos endofíticos ou saprofíticos, apresentando preferência por temperaturas entre 25 e 30 °C para seu desenvolvimento em diferentes substratos (Yang et al., 2017; Sharma et al., 2003).

Lasiodiplodia theobromae possui ampla distribuição geográfica e elevada capacidade patogênica, sendo responsável por doenças em aproximadamente 500 espécies vegetais. Embora seja considerada um patógeno oportunista, sua incidência pode causar danos expressivos às plantas, especialmente em locais de poda ou pontos de enxertia, onde encontra condições favoráveis para infecção e colonização dos tecidos (Úrbez-Torres e Gubler, 2009). Em pesquisas, conduzidas por Rosado et al. (2016) identificou-se pela primeira vez no Brasil, as espécies *L. brasiliense*, *L. egyptiaca* e *L. pseudotheobromae* como agentes da podridão basal pós-colheita do coco, ampliando o conhecimento sobre a diversidade de espécies do gênero *Lasiodiplodia* com potencial patogênico em coqueiros. Nessa cultura, espécies desse gênero podem ocasionar queima das folhas, considerada uma das doenças foliares mais prejudiciais à planta (Coelho, 2018).

Por outro lado, espécies de insetos-praga também podem causar sérios danos à cultura do coqueiro, destacando-se a broca-do-olho-do-coqueiro (*Rhynchophorus palmarum*). Essa colebroca provoca danos diretos e indiretos à planta. Os danos diretos ocorrem devido às injúrias causada pelas larvas no tecido do estipe, com a abertura de galerias que comprometem o desenvolvimento da planta. Quando o ataque atinge o meristema apical, pode haver deformações severas ou até mesmo a morte da planta (Bondar, 1940).

Outra importante colebroca, frequentemente associada a palmáceas é *Metamasius hemipterus* considerada uma praga oportunista, que se instala em plantas com ferimentos

prévios. Os danos mais significativos são causados pelas larvas durante a alimentação. As plantas atacadas por esse besouro apresentam sintomas como exsudação de resina nas aberturas das galerias, localizadas no pecíolo, na região da coroa, no estipe e nas raízes (Zorzenon et al., 2000). Ambas as espécies são pragas importantes em diversas palmáceas, incluindo coqueiro, dendezeiro e o açaizeiro, causando sérios prejuízos econômicos (Pinho et al., 2016; Zorzenon et al., 2000).

A interação entre fungos fitopatogênicos e coleópteros é um tema relevante, visto que a epidemiologia de doenças pode ser alterada pela ação dos besouros, que induzem ferimentos e facilitam a entrada dos patógenos, além de atuarem como vetores de inóculo (Syazwan et al., 2024). Em alguns patossistemas que envolvem essa interação, tem-se observado que as injúrias causadas por besouros aumentam a incidência de doenças. Por exemplo, em árvores de graviola, ferimentos causados por insetos xilófagos favorecem a penetração de patógenos (Hernández-Fuentes et al., 2018).

Devido à ampla diversidade de espécies de *Lasiodiplodia* e à sua preferência por variados hospedeiros, a identificação baseada apenas em caracteres morfológicos é limitada. Assim, o uso de ferramentas moleculares é essencial para a correta identificação dos patógenos (Bautista-Cruz et al., 2019). Estudos recentes, por meio de análises filogenéticas, têm descrito novas espécies de *Lasiodiplodia* (de Silva et al., 2019). Apesar de *Lasiodiplodia* ser um fungo cosmopolita, com ampla distribuição geográfica, ainda são escassos os estudos sobre este patossistemas, e não há registros na literatura da associação desse gênero com insetos. Sendo assim, este estudo tem como objetivo isolar, caracterizar e confirmar se os isolados de *Lasiodiplodia* obtidos de *R. palmarum* e *M. hemipterus* possuem capacidade de induzir podridão em frutos de coqueiro.

2. Material e Métodos

Coleta de insetos e isolamento fúngicos

As coletas foram realizadas nas cidades de Buriti (MA) 3°48'22.3"S 42°56'55.8"W, Balsas (MA) 7°31'40.0"S 46°02'58.7"W, Tailândia (PA) 2°56'50"S 48°57'11"W e Teresina (PI) CCA 5°02'51.2"S 42°47'01.8"W em ambiente de babaçuais, coqueiros e dendezeiros (Figura 1). Foram utilizadas armadilhas tipo balde com rincoforol (feromônio de agregação) e colmos de cana-de-açúcar. As armadilhas ficavam em torno de quatro dias em campo. Observaram-se também a presença e ausência da doença nas áreas de coleta.

Os besouros foram transportados e acondicionados por 24 horas no Laboratório de Entomologia da Universidade Federal do Piauí. Em seguida, o procedimento de desinfestação foi realizado, imergindo os besouros em solução de hipoclorito a 5% e água deionizada durante 5 minutos. Em seguida, os besouros foram transferidos para outro recipiente contendo apenas água deionizada esterilizada, na qual permaneciam imersos durante 10 minutos. Após esse procedimento, os besouros foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA (Batata Dextrose Ágar) no meio adicionou-se antibiótico para evitar contaminações por bactérias.

Após três dias, havia crescimento micelial dos isolados sob a placa, e fragmentos fúngicos foram transferidos para novas placas de Petri com meio BDA para realizar a morfologia de formato e disposição dos esporos, formação de cadeias, coloração e aspecto da cultura. Os isolados obtidos estão depositados na coleção de fungos no Programa de Melhoramento Genético da Cana de Açúcar – PMGCA na Universidade Federal do Piauí em Teresina.

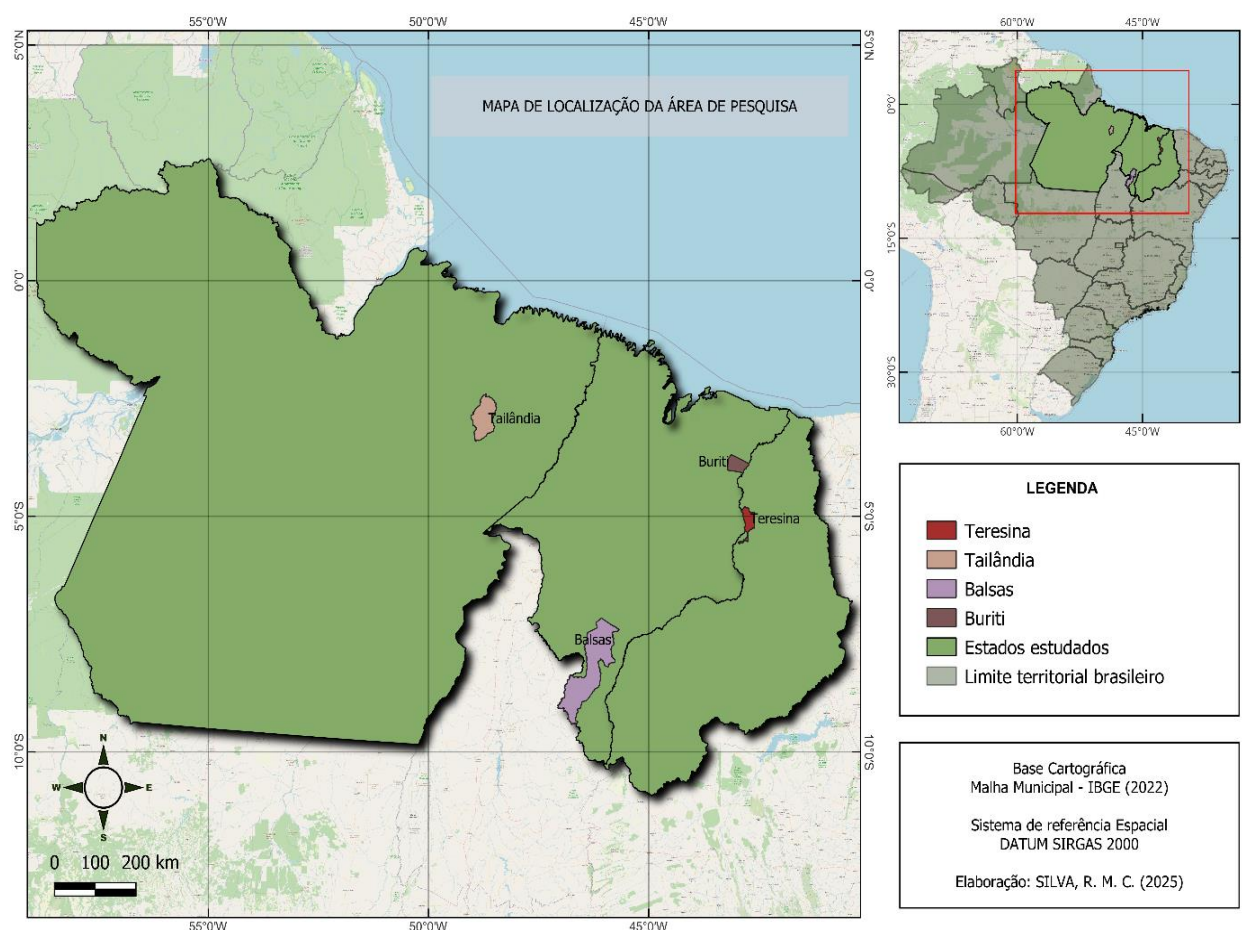


Figura – 1. Mapa de localização das coletas de *Rhynchophorus palmarum* e *Metamasius hemipterus* utilizando armadilhas tipo balde. Os pontos indicam os locais exatos de coleta em áreas de coqueiro, dendezeiro e babaçu, destacando os principais municípios dos estados do Maranhão, Piauí e Pará, no período de julho de 2023 a novembro de 2024.

Caracterização Morfológica

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 $25 \pm 1^\circ\text{C}$. 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. As placas com os isolados foram incubadas por quatro semanas a 25°C , com um fotoperíodo de 12 horas para induzir o desenvolvimento de picnídios (Netto et al., 2014).

Inoculação em frutos de coqueiro com isolados de *Lasiodiplodia*

Utilizaram-se três isolados de *Lasiodiplodia* obtidos de insetos vetores de ambiente nativo e cultivado: RD 59, CM 04 e CM 06 (tabela 1). O experimento foi montado com 4 repetições e duas testemunhas de controle (ausência do fungo) para cada isolado, durante 15 dias, os isolados foram ativados no meio de cultura em BDA. Esperaram-se sete dias para o crescimento total na placa para realizar a inoculação em frutos de coqueiro.

Primeiramente, os frutos de coqueiro foram desinfetados com hipoclorito a 5% por três minutos. Em seguida, foram realizados furos na superfície do coco e discos de micélio foram transferidos para os mesmos. Colocou-se algodão umedecido e cobriu-se com papel filme para garantir a umidade. Foram colocados em sacolas para fazer uma câmara úmida, com temperatura de 28°C no período de 15 dias (figura 2). Para confirmar a identidade dos isolados inoculados, realizou-se o isolamento direto no fruto de coqueiro. Um fragmento de micélio foi transferido para uma placa contendo BDA e, após sete dias, comprovou-se a identidade do patógeno.



Figura 2. Etapas da inoculação de isolados de *Lasiodiplodia* sp. em frutos de coqueiro. Sequência do procedimento: (A) Perfuração do fruto com perfurador de coco; (B) Inserção de discos de micélio; (C) Cobertura com algodão umedecido; (D) Aplicação de água destilada; (E) Vedação com papel filme; (F) Acondicionamento em sacolas para formação da câmara.

3. Resultados

De acordo com a avaliação dos marcadores identificou 10 isolados de *Lasiodiplodia* sp. obtidos dos besouros *R. palmarum* e *M. hemipterus* coletados em áreas nativas com a presença de palmeiras selvagem (babaçu e buriti) e em áreas cultivadas (coqueiro e dendezeiro) (tabela 1). Em campo, foram observadas plantas de dendezeiro com sintomas de podridão de pecíolo (Figura 3, D), e nessas áreas também foi registrada a presença dos besouros *Rhynchophorus palmarum* e *Metamasius hemipterus* nos locais de coleta.

Tabela - 1. Isolados obtidos de *Lasiodiplodia* sp. de besouros em ambiente nativo e cultivado, no período de julho/2023 a novembro/2024.

Código	Isolado	Ambiente	Vetor	Cidade
CM 04	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	Cultivo de coqueiro	<i>R. palmarum</i>	Balsas- MA
CM 06	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	Área nativa	<i>M. hemipterus</i>	Buriti - MA
RD 59	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	Área nativa	<i>R. palmarum</i>	Teresina - PI
MP350	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	Cultivo dendezeiro	<i>R. palmarum</i>	Tailândia-PA
MP351	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	Cultivo dendezeiro	<i>R. palmarum</i>	Tailândia-PA
MP352	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	Cultivo dendezeiro	<i>R. palmarum</i>	Tailândia-PA
MP353	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	Cultivo dendezeiro	<i>R. palmarum</i>	Tailândia-PA
MP354	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	Cultivo dendezeiro	<i>R. palmarum</i>	Tailândia-PA
MP355	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	Cultivo dendezeiro	<i>R. palmarum</i>	Tailândia-PA
MP356	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	Cultivo dendezeiro	<i>R. palmarum</i>	Tailândia-PA

Todos os isolados apresentaram culturas inicialmente brancas e aspecto cotonoso. Com o envelhecimento da cultura, os isolados apresentaram culturas de coloração cinza a escura (figura 4). Todos os isolados produziram picnídios sobre acículas de *Pinus*, com a exsudação de conídios 20 dias após a incubação. Os conídios imaturos apresentaram as seguintes características: hialinos, unicelulares e com dupla parede, enquanto os conídios maduros apresentaram coloração marrom-negros, bicelulares e presença de estrias na parede dos esporos (figura 3, F, G).

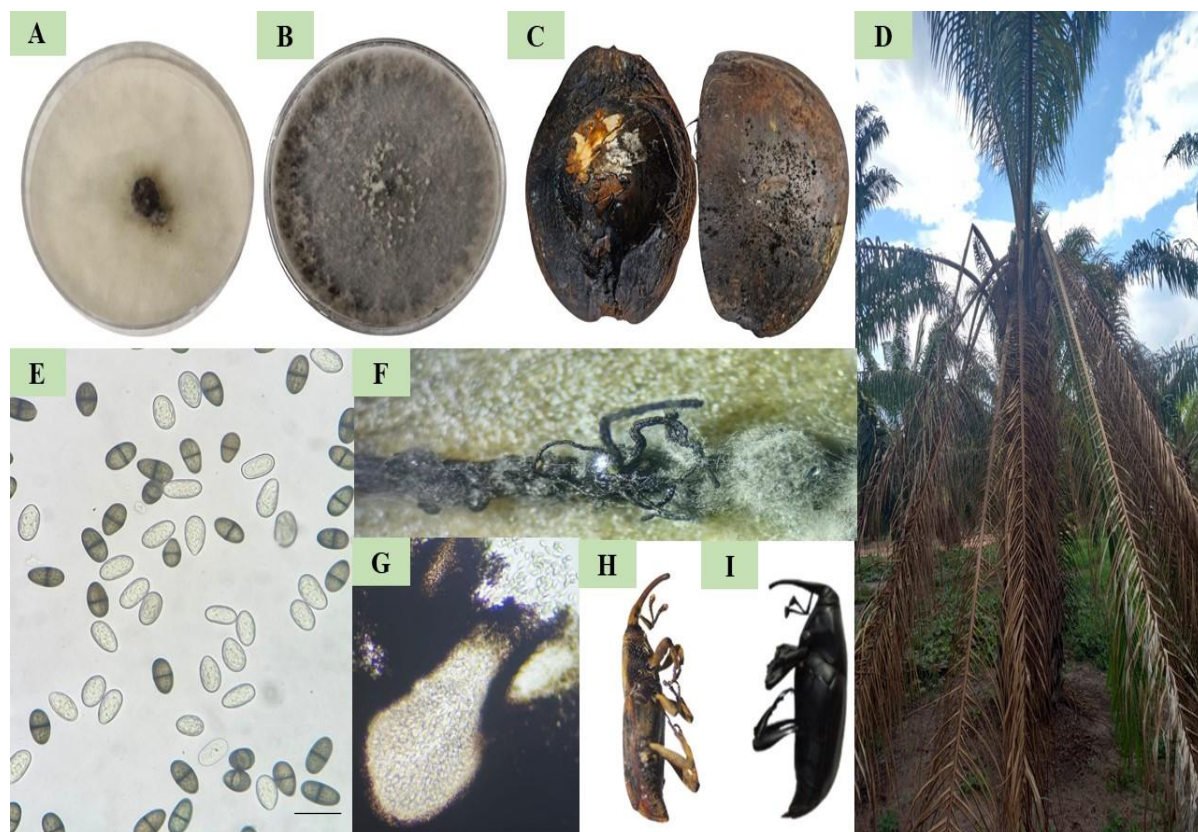


Figura – 3. *Lasiodiplodia* sp. associado a besouros. A- Crescimento do fungo após 3 dias em BDA; B- Placa com 8 dias em BDA; C- Formação de picnídio sob o fruto; D- Planta de dendezeiro com sintomas de quebra do pecíolo; E- Conídios hialinos e escuros; F- Exsudação sob acículas de *Pinus* em meio Aveia-Ágar; G- Formação de picnídio; H- *Rhynchophorus palmarum* e I- *Metamasius hemipterus*.

Os frutos inoculados apresentaram manchas de coloração marrom na parte externa do fruto, e na região interna possuía manchas escuras. Todos os frutos inoculados manifestaram sintomas de podridão (figura 5). Além disso, foi possível observar a formação de picnídio sobre a casca dos frutos inoculados. Em estudos futuros, será avaliado os níveis de agressividades de todos os isolados obtidos nesta pesquisa.

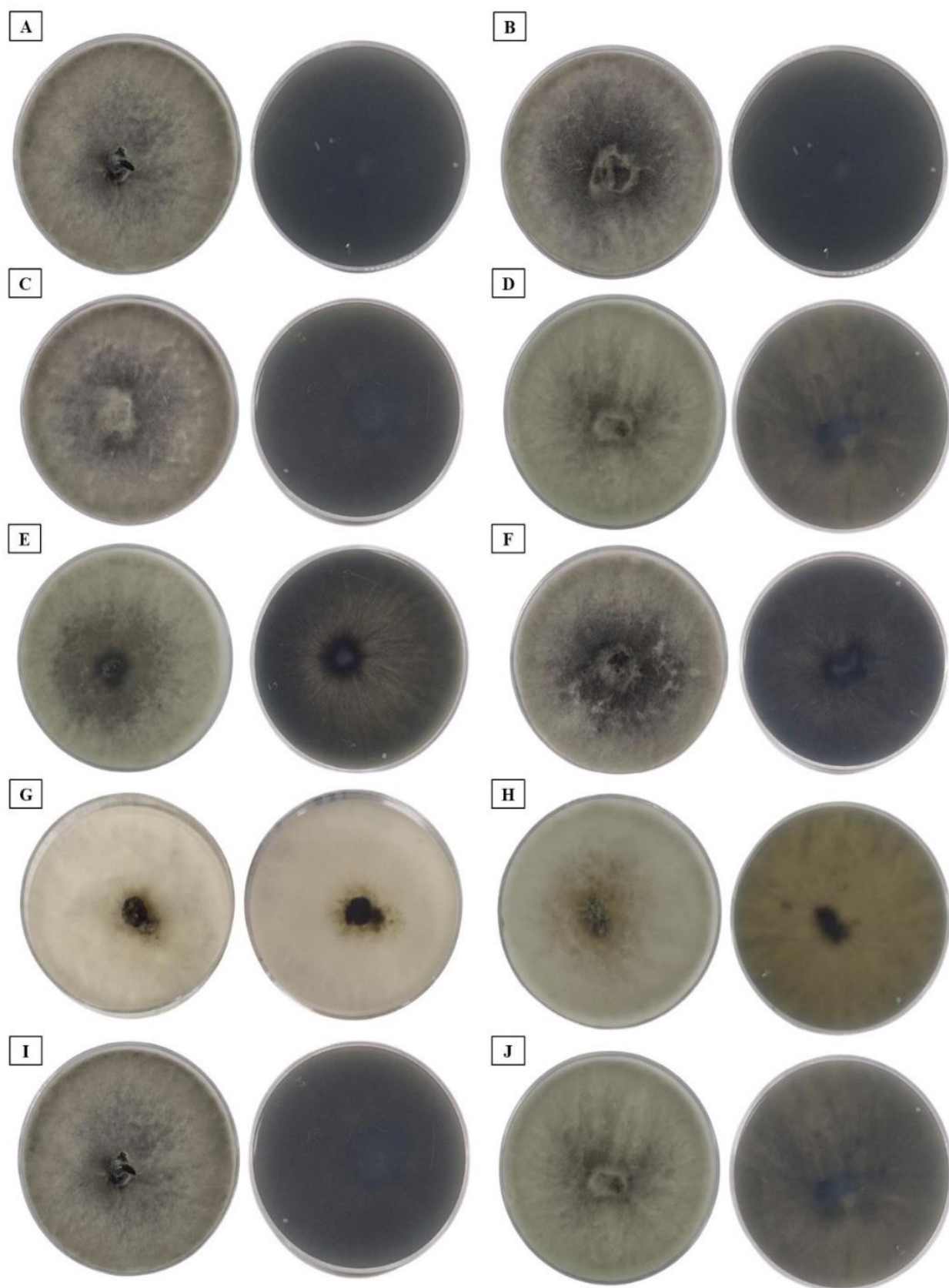


Figura – 4. Caracterização cultural de *Lasiodiplodia*. Coloração e aspecto cultura de isolados de *Lasiodiplodia* spp. em meio BDA. Na sequência os isolados: A- MP 354; B- MP 355; C- MP 352; D- MP 353; E- MP 350; F- MP 351; G- RD 59; H- 356; I- CM 04; J - CM 06.

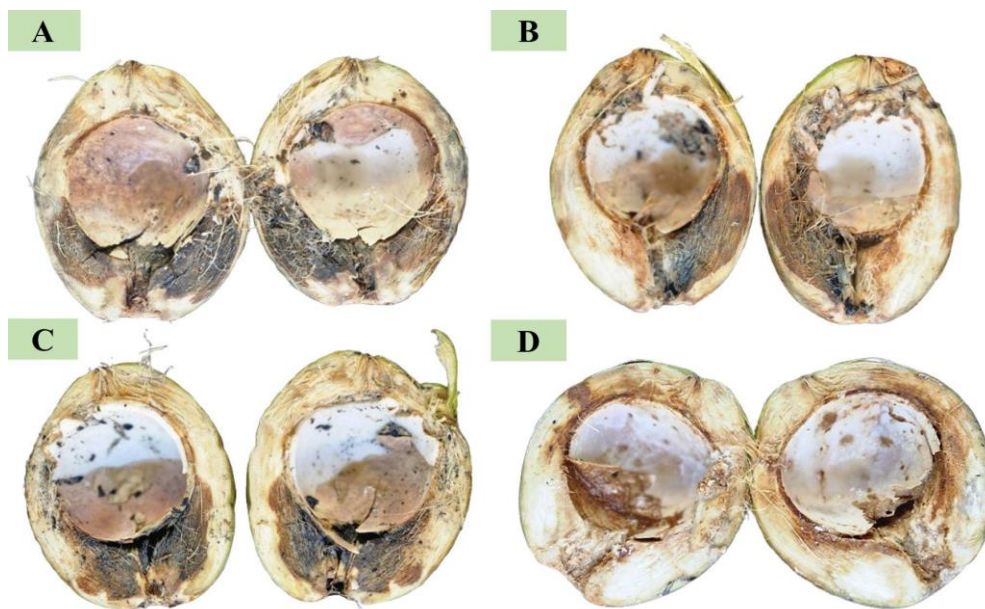


Figura – 5. Resultados de inoculação: Sintomas de podridão em frutos de coqueiro inoculados com isolados de *Lasiodiplodia* sp. após 15 dias. Código dos isolados: A- CM 04; B-CM 06, C-RD 59; D- Testemunha negativa (ausência do fungo).

4. Discussão

Com base nas características morfológicas, como a formação de esporos hialinos unicelulares, esporos marrom-binucleados e picnídios, os isolados foram identificados como pertencentes ao gênero *Lasiodiplodia*. No entanto, a identificação de espécies deste gênero com base apenas em descritores morfológicos apresenta limitações, uma vez que diferentes espécies compartilham características semelhantes (Zang et al., 2021; Phillips et al., 2018).

No Nordeste brasileiro, uma coleção de 60 isolados associados à queima das folhas e à podridão de frutos revelou a presença de três espécies de *Lasiodiplodia*, sendo *L. theobromae* a mais prevalente (Rosado et al., 2016; Coelho et al., 2018). Embora aproximadamente 42 espécies de *Lasiodiplodia* estejam formalmente descritas, a ampliação e esclarecimento desse número só foram possíveis com o uso de ferramentas de biologia molecular. Atualmente, recomenda-se a utilização combinada dos genes ITS, RPB2, TEF-1 α e TUB2 para delimitação de espécies (Zang et al., 2021).

O gênero *Lasiodiplodia* é amplamente distribuído em regiões tropicais, causando diversas fitopatologias como podridão de frutos, seca dos ponteiros e cancro. Além disso, espécimes podem ser isolados como endófitos de diferentes hospedeiros (Netto et al., 2014; Rosado et al., 2016). Dentre os hospedeiros, destacam-se as palmeiras da família *Arecaceae*, com registros de espécies de *Lasiodiplodia* associadas à podridão de frutos de coqueiro (Rosado

et al., 2016). *L. theobromae* é um agente etiológico relevante, com alta capacidade de causar doenças em diversas fruteiras, sendo comum a observação de sintomas como seca dos ponteiros e podridão de frutos.

Este estudo sugere que os besouros *Rhynchophorus palmarum* e *Metamasius hemipterus* atuam como vetores de esporos de *Lasiodiplodia*, transferindo-os de plantas nativas para cultivos de coqueiro e dendezeiro. Ambos os insetos são pragas que completam seus ciclos biológicos nessas plantas e têm capacidade de voo de longa distância. Durante a alimentação, podem provocar ferimentos nos tecidos vegetais, favorecendo a infecção por *Lasiodiplodia*. Além disso, é frequente a observação de frutos de babaçu (*Attalea speciosa*) com sintomas de podridão em ambientes nativos, e a presença de micélio e esporos reforça a hipótese de que esses besouros adquirem o fungo ao visitarem essas plantas (Comunicação Pessoal).

Embora não existam registros de interação entre fungos da família *Botryosphaeriaceae* e besouros, há evidências de associações com fungos da família *Ceratocystidaceae*, especialmente os gêneros *Thielaviopsis* e *Ceratocystis* (Heath et al., 2009; Mbenoun et al., 2015). Nesta pesquisa, não foi possível realizar cortes histológicos para investigar a presença de micângios (estruturas de armazenamento de esporos), mas acredita-se que os esporos estejam aderidos à superfície externa dos insetos, pois, obteve isolados dos plaqueamentos dos besouros facilmente.

A ocorrência de isolados de *Lasiodiplodia* em duas espécies de besouros, coletadas em três regiões distintas e em diferentes condições (nativas e cultivadas), sugere que esses insetos podem atuar como vetores e ampliar o potencial de infecção e disseminação do patógeno. Isso é especialmente relevante, dado que suas larvas perfuram tecidos meristemáticos de palmeiras, favorecendo a colonização do fungo. Em patossistemas relacionados à seca dos ponteiros, como em graviola, analisou-se a presença de lesões causadas por insetos xilófagos, cuja preferência por plantas debilitadas pode favorecer a infecção fúngica (Hernández-Fuentes et al., 2018).

Apesar de preliminar e com identificação apenas ao nível de gênero, esta pesquisa é relevante por evidenciar que *Lasiodiplodia* está associado a diversos substratos. Curiosamente, em ambas as regiões de coleta foram observadas plantas de dendezeiro, coqueiro e babaçu com sintomas e sinais do fungo, indicando que os besouros podem adquirir esporos ao visitarem essas plantas doentes. Ambos os insetos completam seus ciclos em palmeiras cultivadas e não cultivadas.

Estudos futuros, devem incluir análises filogenéticas multilocus e testes de inoculação com isolados de *Lasiodiplodia* oriundos de besouros, bem como de palmeiras nativas e cultivadas, a fim de investigar a diversidade do gênero e sua dinâmica na interação planta-

inseto. Além disso, os testes de inoculação permitirão avaliar a agressividade dos isolados. Essas informações são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias eficazes de monitoramento e controle de doenças em culturas de alta relevância econômica, como o coqueiro e o dendezeiro.

5. Conclusões

Esta pesquisa registra, pela primeira vez, a associação de *Lasiodiplodia* spp. em *R. palmarum* e *M. hemipterus*.

Isolados de *Lasiodiplodia* obtidos de *R. palmarum* e *M. hemipterus* induzem sintomas de podridão em frutos de coqueiro.

Este é o primeiro estudo que investiga a associação de *Lasiodiplodia* nos besouros *R. palmarum* e *M. hemipterus*.

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.
- ABDOLLAHZADEH, J.; JAVADI, A.; GOLTAPPEH, E. M.; ZARE, R.; PHILLIPS A. J. L. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. **Persoonia Molecular Phylogeny and Evolution Fungi**, v. 25, n. 1, p.1-10, 2010.
- BONDAR, G. Insetos nocivos e moléstia do coqueiro (*Cocus nucifera* L.) no Brasil. Salvador. **Tipografia**, p. 156, 1940.
- BAUTISTA-CRUZ, M. A.; ALMAGUER-VARGAS, G.; LEYVA-MIR, S. G.; COLINAS-LEÓN, M. T.; CORREIA, K. C.; CAMACHO-TAPIA, M.; ROBLES-YERENA, L.; MICHEREFF, S. J.; TOVAR-PEDRAZA, J. M. Phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with cankers and dieback symptoms of Persian lime in Mexico. **Plant Dis.** v.103, p.1156-1165, 2019.
- CARVALHO, J. M.; MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; MAIA JÚNIOR, G. A. Água-de-coco: propriedades nutricionais, funcionais e processamento. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 3, p. 437-452, 2006.
- COELHO, I. L. **Diversidade populacional de *Lasiodiplodia* patogênica a coqueiro e ação Biocontroladora de leveduras**. Recife, 2018.
- CRUYWAGEN, E.M.; SLIPPERS, B.; ROUX, J.; WINGFIELD, M.J. Phylogenetic species recognition and hybridization in *Lasiodiplodia*: A case study on species from baobabs. **Fungal Biol**, v.121, p.420-436, 2017.

DE SILVA, N. I.; PHILLIPS, A. J. L.; LIU, J. K.; LUMYONG, S.; HYDE, K. D. Phylogeny and morphology of *Lasiodiplodia* species associated with *Magnolia* forest plants. **Sci. Rep.**, v. 9, p.14355, 2019.

FREIRE, F.C.O.; VIANA, F.M.P.; CARDOSO, J.E.; SANTOS, A.A. Novos hospedeiros do fungo no estado do Ceará. Comunicado Técnico Nº 91. Fortaleza. **Embrapa Agroindústria Tropical**, 2004.

HERNÁNDEZ-FUENTES, L. M.; GÓMEZ-JAIMES, R.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, V.; CASTAÑEDA-VILDOZOLA, A. *Xylophagous* insects associated with soursop (*Annona muricata* L.) branches, affected by *Lasiodiplodia theobromae* Pat. **Southwestern Entomologist**, v. 43, n. 2, p. 543-546, 2018.

HEATH, R. N.; WINGFIELD, M. J.; VAN WYK, M.; ROUX, J. Insect associates of *Ceratocystis albifundus* and patterns of association in a native savanna ecosystem in South Africa. **Entomological Society of America**, v. 38, n. 2, p. 356-364, 2009.

LINS, S. R. O.; MELO, A. P.; OLIVEIRA, S. M. A. Podridão peduncular em manga: patogenicidade, agressividade e caracterização de isolados pela análise isoenzimática. **Summa Phytopathologica**, v. 39, n. 4, p. 263-270, 2013.

MARTINS, C. R.; JESUS JÚNIOR, L. A. Produção e comercialização de coco no Brasil frente ao comércio internacional: panorama 2014. Aracaju: **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, 2013.

MBENOUN, M.; WINGFIELD, M. J.; BOYOGUENO, A. D. B.; AMOUGOUB, F. N.; TIGANG, S. P.; HOOPEN, G. M. T.; MFEGUE, C. V.; DIBOG, L.; NYASSE, S.; WINGFIELD, B. D.; ROUX, J. Diversity and pathogenicity of the *Ceratocystidaceae* associated with cacao agroforests in Cameroon. **Plant Pathology**, v. 65, n. 1, p. 64–78, 2015.

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, p. 127-141, 2014.

PINHO, R. C.; FARIAS, P. R. S.; RODRIGUES, K. C. V.; TINÔCO, R. S.; SANTOS, A.V. F. dos; MARSSENA, R. T. P. Distribuição espacial de *Rhynchophorus palmarum* em palma de óleo no estado do Pará, Amazônia. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 59, n. 1, p. 22-31, jan./mar. 2016.

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.

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

SHARMA, D. D.; NAIK, V. N.; CHOWDARY, N. B.; MALA, V. R. Soil borne diseases of mulberry and their management. Int. J. Ind. **Entomol**, v.7, p.93-106, 2003.

ÚRBEZ-TORRES, J. R.; GUBLER, W. Patogenicidade de espécies de *Botryosphaeriaceae* isoladas de cancos de videira na Califórnia. **Plant Disease**, v. 93, n.6, p. 584-592, 2009.

YANG, T.; GROENEWALD, J. Z.; CHEEWANGKOON, R.; JAMI, F.; ABDOLLAHZADEH, J.; LOMBARD, L.; CROUS, P. W. Families, genera, and species of *Botryosphaeriales*. **Fungal Biol**, v. 548, n. 121, p. 322-346, 2017.

ZORZENON, F. J.; BERGMANN, E. C.; BICUDO, J. E. A. Primeira ocorrência de *Metamasius hemipterus* (Linnaeus, 1758) e *Metamasius ensirostris* (Germar, 1824) (Coleoptera: Curculionidae) em palmiteiros dos gêneros *Euterpee*, *Bactris* (Arecaceae) no Brasil. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v. 67, n. 2, p. 265-268, 2000.