



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Tese de Doutorado

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE
BOTRYOSPHAERIACEAE NA CULTURA DA MANGUEIRA
NO NORDESTE DO BRASIL**

Marília Wortmann Marques

Recife-PE

Fevereiro-2013

MARÍLIA WORTMANN MARQUES

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE
BOTRYOSPHAERIAEAE NA CULTURA DA MANGUEIRA
NO NORDESTE DO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Fitopatologia da Universidade Federal Rural
de Pernambuco, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Prof. Marcos Paz Saraiva Câmara, Ph.D – Orientador

Prof. Dr. Sami Jorge Michereff – Co-orientador

Recife-PE

Fevereiro-2013

Ficha catalográfica

M357i Marques, Marília Wortmann
Identificação e caracterização de espécies de
Botryosphaeriaceae na cultura da mangueira no Nordeste do Brasil
/ Marília Wortmann Marques. – Recife, 2013.
87 f. : il.

Orientador: Marcos Paz Saraiva Câmara.
Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal
Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 2013.
Referências.

1. Morte descendente 2. Podridão peduncular 3. Filogenia 4. ITS
5. EF- α 6. Virulência I. Câmara, Marcos Paz Saraiva, orientador
II. Título

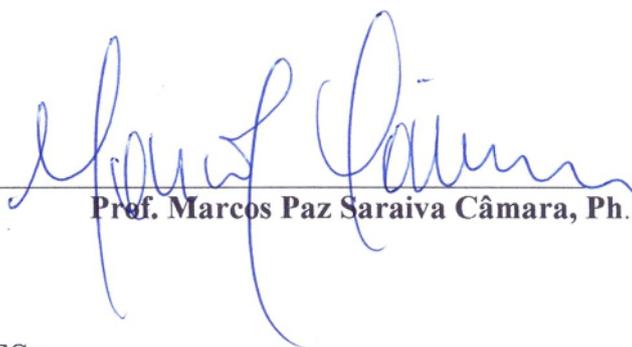
CDD 632

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE
BOTRYOSPHERACEAE NA CULTURA DA MANGUEIRA NO NORDESTE DO
BRASIL**

MARÍLIA WORTMANN MARQUES

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em 22 de fevereiro de 2013.

ORIENTADOR:



Prof. Marcos Paz Saraiva Câmara, Ph.D

EXAMINADORES:



Prof.^a. Dr.^a. Elaine Malosso



Prof.^a. Dr.^a. Sônia Maria Alves de Oliveira



Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino



Dr.^a. Waléria Guerreiro Lima

RECIFE-PE

FEVEREIRO, 2013

Aos meu querido irmão, Maurício Marques e ao meu namorado Nelson Bernardi Lima, pelo apoio, incentivo, amor e compreensão em todos os momentos.

OFEREÇO

Aos meus queridos pais, Carlos Dutra Marques e Denise Wortmann Marques, pelo caráter, dedicação e amor, a quem sempre tiveram como prioridade os estudos dos seus filhos, meu eterno agradecimento

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pela formação acadêmica, por todo acolhimento, serviços prestados e estrutura cedida para estudos, pesquisas e demais atividades.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo;

Ao Prof. Dr. Marcos Câmara pelo apoio, amizade e orientação.

Ao Prof. Dr. Sami Michereff pela amizade, dedicação e relevantes contribuições neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alan Phillips pela atenção e conhecimentos transmitidos que muito contribuíram para minha formação profissional.

Aos professores que compõem o Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, da UFRPE, pelos ensinamentos transmitidos com seriedade e compromisso.

À Embrapa Semi-Árido, em especial à Dra Maria Angélica G. Barbosa e a equipe do Laboratório de Fitopatologia, por todo o apoio durante a coleta das amostras.

Meu grande agradecimento a toda equipe que compõe o Laboratório de Genética da UFPE, em especial, ao Prof. Marcos Morais pela valiosa colaboração e infraestrutura oferecida para realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Micologia, Waléria, Mariote, Willie, pela ajuda em todos os momentos durante a execução deste trabalho.

Aos meus amigos, Carine Naue, Josiclêda Galvêncio, Kátia Felix, Rômulo Diniz, Hailson Alves, a minha imensa gratidão, pelo companheirismo de todos os momentos dessa trajetória, amizade e toda força recebida;

À Darcy Martins e Romildo Angeiras, pela amizade e presteza, ao longo do curso;

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho, minha eterna gratidão.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	v
RESUMO GERAL	vii
GENERAL ABSTRACT	viii
CAPÍTULO I – Introdução Geral	9
A CULTURA DA MANGUEIRA	9
DOENÇAS CAUSADAS POR ESPÉCIES DE BOTRYOSPHAERIACEAE ...	10
ASPECTOS TAXONÔMICOS DE BOTRYOSPHAERIACEAE	12
ASPECTOS FILOGENÉTICOS DE BOTRYOSPHAERIACEAE	13
ESPÉCIES DE BOTRYOSPHAERIACEAE ASSOCIADOS À CULTURA NA MANGUEIRA	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
CAPITULO II – Espécies de <i>Lasiodiplodia</i> associadas à cultura da mangueira no Nordeste do Brasil	23
RESUMO	25
INTRODUÇÃO	25
MATERIAL E MÉTODOS	27
RESULTADO	32
DISCUSSÃO	34
REFERÊNCIAS	37
CAPITULO III – Espécies de <i>Botryosphaeria</i> , <i>Neofusicoccum</i> , <i>Neoscytalidium</i> e <i>Pseudofusicoccum</i> associadas à mangueira no Nordeste do Brasil	54
RESUMO	55
INTRODUÇÃO	55
MATERIAL E MÉTODOS	58
RESULTADOS	62
DISCUSSÃO	65
REFERÊNCIAS	68
CONCLUSÕES GERAIS	86

RESUMO GERAL

A morte descendente e a podridão peduncular são doenças causadas por espécies de Botryosphaeriaceae e vêm causando sérios prejuízos à cultura da mangueira no Nordeste do Brasil e do mundo. Tendo em vista a importância crescente dessas doenças e as descobertas recentes de novas espécies de Botryosphaeriaceae, o presente trabalho teve como objetivos: (i) identificar espécies de Botryosphaeriaceae associadas à morte descendente e podridão peduncular na cultura da mangueira no Nordeste do Brasil e (ii) comparar as espécies em relação ao crescimento micelial, patogenicidade e virulência. Um total de 235 isolados de Botryosphaeriaceae foram identificados a partir de características morfológicas e dados de sequências de DNA (ITS, BT e EF1- α), sendo encontradas as seguintes espécies: *Botryosphaeria dothidea*, *B. mamane*, *Lasiodiplodia crassispora*, *L. egyptiaca*, *L. hormozganensis*, *L. iraniensis*, *L. pseudotheobromae*, *Lasiodiplodia* sp., *L. theobromae*, *Fusicoccum fabicercianum*, *Neofusicoccum parvum*, *Neofusicoccum* sp., *Neoscytalidium dimidiatum* e *Pseudofusicoccum stromaticum*. Somente *L. theobromae*, *N. parvum*, *B. dothidea* e *P. stromaticum* tinham sido relatadas em mangueira no Brasil, enquanto as outras espécies representam o primeiro relato associadas à esta cultura no país. *L. theobromae*, *B. dothidea* e *P. stromaticum* foram as espécies prevalentes. Houve diferenças significativas na taxa de crescimento micelial entre as espécies de Botryosphaeriaceae e também em relação à temperatura ótima para o crescimento. A temperatura ótima e a taxa de crescimento micelial para as espécies de *Lasiodiplodia* variaram de 28,2 a 31,1 °C e de 36,4 a 49,1 mm/dia, respectivamente. Nas demais espécies, a variação foi de 25,4 a 30,8 °C e de 19,7 a 41,2 mm/dia. Todas as espécies foram patogênicas em manga. Houve diferenças significativas na virulência entre as espécies. Em relação às espécies de *Lasiodiplodia*, *L. hormozganensis* e *Lasiodiplodia* sp. foram as mais virulentas. Nas demais espécies dentro da família Botryosphaeriaceae, *N. dimidiatum* e *N. parvum* foram as espécies mais virulentas. *B. mamane* e *L. crassispora* representam o primeiro relato dessas espécies na cultura da mangueira no mundo.

Palavras-chave: Morte descendente, podridão peduncular, Filogenia, ITS, EF1- α , virulência.

GENERAL ABSTRACT

Dieback and stem-end rot are diseases caused by species of Botryosphaeriaceae have been associated with serious yield losses to mango culture in northeastern Brazil and worldwide. Considering the increasing importance of these diseases and recent discovery of several species of Botryosphaeriaceae, the objective of this study was (i) to identify species of Botryosphaeriaceae associated with dieback and stem-end rot of mango in the semi-arid region of northeastern Brazil and (ii) compare the species in relation to mycelial growth, pathogenicity and virulence. A total of 235 isolates of Botryosphaeriaceae were identified using morphological and DNA sequence data (ITS and EF1- α). The following species were found: *Botryosphaeria dothidea*, *B. mamane*, *Lasiodiplodia crassispora*, *L. egyptiaca*, *L. hormozganensis*, *L. iraniensis*, *L. pseudotheobromae*, *Lasiodiplodia* sp., *L. theobromae*, *Fusicoccum fabicercianum*, *Neofusicoccum parvum*, *Neofusicoccum* sp., *Neoscytalidium dimidiatum* e *Pseudofusicoccum stromaticum*. Only *B. dothidea*, *L. theobromae*, *N. parvum* and *P. stromaticum* had been previously reported, while the other species represent the first report associated with the mango diseases in this country. *L. theobromae*, *B. dothidea* and *P. stromaticum* were the most frequently isolated species. There were significant differences in mycelial growth rates among the Botryosphaeriaceae species and also in the optimum temperature for growth. The optimum temperature and mycelial growth rates for species *Lasiodiplodia* vary from 28.2 to 31.1 °C and from 36.4 a 49.1 mm/day, respectively. While in the other species, the variation was from 25.4 to 30.8 °C and 19.7 to 41.2 mm/day. All species were pathogenic in mango fruit. There were significant differences in virulence among the species. *L. hormozganensis* and *Lasiodiplodia* sp. were the most virulent. For the other species within the Botryosphaeriaceae family, *N. dimidiatum* and *N. parvum* were the most virulent species, *B. mamane*, *L. crassispora* e *L. viticola* are reported for the first time associated with mango diseases worldwide.

Keywords: dieback, stem-end rot, phylogeny, ITS, EF1- α , virulence.

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE BOTRYOSPHAERIAEAE NA CULTURA DA MANGUEIRA NO NORDESTE DO BRASIL

INTRODUÇÃO GERAL

A CULTURA DA MANGUEIRA

A mangueira (*Mangifera indica* L.) é considerada uma das principais espécies tropicais cultivadas no mundo. Originária do Sul da Ásia, essa cultura dispersou-se por todos os continentes, sendo cultivada, atualmente, em todos os países de clima tropical e subtropical. Os principais produtores mundiais são a Índia, China, Tailândia, Indonésia, Paquistão, México e Brasil (SILVA et al., 2002; FAO, 2013).

Na América, o precursor de seu cultivo foi o Brasil, pela introdução das primeiras plantas no Rio de Janeiro, de onde se disseminaram para o resto do país. Atualmente, a cultura da mangueira é uma das atividades agrícolas com forte participação no mercado nacional de frutas, sendo a nona colocada em termos de produção comercial e a terceira fruta em volume exportado (IBRAF, 2011). Em 2011, a cultura da manga gerou a maior receita por volume total de fruta exportada no país. A exportação de manga passou de 124,7 mil toneladas e US\$ 119,9 milhões, em 2010, para 126,4 mil t e US\$ 140,9 milhões, sendo os seus principais compradores a Europa e Estados Unidos (AGRIANUAL, 2012).

Na safra de 2011, a produção nacional foi 1,19 milhão de t distribuídas em uma área de 75,1 mil hectares, com produtividade de 15,8 t/ha. As principais regiões produtoras de manga do Brasil estão localizadas nas regiões Nordeste e Sudeste do país. No Nordeste, destacam-se o Vale do Submédio São Francisco, abrangendo os estados da Bahia e Pernambuco, sendo responsável por cerca de 80% das exportações nacionais de manga (IBRAF, 2011), contribuindo de forma decisiva para a manutenção do país na terceira posição no *ranking* das exportações dessa fruta no mundo (FAO, 2013). A região semi-árida destaca-se no cenário nacional não apenas pela expansão da área cultivada e do volume de produção, mas, principalmente, pelos altos rendimentos alcançados e qualidade da manga produzida (SILVA; CORREA, 2004).

Por outro lado, a mangueira é uma frutífera suscetível a uma grande diversidade de doenças causadas por fungos, bactérias e outros organismos que podem não só limitar a sua produção, como também comprometer a qualidade das frutas, o que é particularmente

importante quando se destinam à exportação. O incremento do cultivo da mangueira ocorrido nas últimas décadas foi essencialmente realizado à base da introdução de novas variedades, oriundas de outros países produtores e que, na maioria dos casos, apresentam frutas de grande aceitação no mercado, porém, altamente suscetíveis ao ataque de doenças e pragas (SILVA et al., 2002). Com a expansão da área cultivada e a intensificação das técnicas de manejo, a ocorrência de doenças tem sido favorecida nesta cultura, interferindo na produção e resultando na redução da produtividade e da qualidade das frutas (SILVA; CORREA, 2013).

Dentre as doenças de maior importância da cultura destacam-se: a mancha angular (*Xanthomonas campestris* pv. *mangiferae indicae* (Patel, Moniz & Kulkarni) Robbs, Ribeiro & Kimura), a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.), a seca da mangueira (*Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted), o oídio (*Oidium mangiferae* Bert), a malformação floral e vegetativa (*Fusarium subglutinans* Wollenweb & Reinking), a verrugose (*Elsinoe mangiferae* Bit & Jenkins), a mancha de alternaria (*Alternaria* spp.) e a morte descendente (Botryosphaeriaceae spp.) (TAVARES, 2002; RIBEIRO, 2005). Na pós-colheita destaca-se antracnose, podridão por aspergillus (*Aspergillus niger* Van Tieghem), podridão por alternaria e podridão peduncular (Botryosphaeriaceae spp.) (NIETO-ÁNGEL et al., 2006). A severidade da doença depende da cultivar afetada, das condições de manejo da cultura, da agressividade do patógeno e das condições ambientais.

DOENÇAS CAUSADAS POR ESPÉCIES DE BOTRYOSPHAERIACEAE

Morte descendente e podridão peduncular da mangueira são doenças causadas por espécies de Botryosphaeriaceae e são relatadas em diversos países como Austrália (JOHNSON et al., 1994; RAY et al., 2010; SAKALIDIS et al., 2011; SLIPPERS et al., 2005), Brasil (COSTA et al., 2010; MARQUES et al., 2012; NOGUEIRA; FERRARI; LOUZEIRO, 2001; TAVARES; MENEZES; CHOUDHURY, 1991), Estados Unidos (RAMOS et al., 1991; PLOETZ et al., 1996), Oman (AL ADAWI et al., 2003), Paquistão (KHANZADA; LODHI; SHAHZAD, 2004), Taiwan (NI et al., 2010; 2012), Iran (ABDOLLAHZADEH et al., 2010; 2013) Egito (ISMAIL et al., 2012) e Peru (JAVIER-ALVA et al., 2009).

Estas doenças vêm se constituindo em um sério problema para as regiões agrícolas do Brasil e do mundo, ocasionando diversos danos aos pomares de manga, uma vez que reduz a vida útil, diminui a produção, desqualifica as frutas para fins de comercialização e aumenta os custos de cultivo, sendo seu controle ainda um desafio (CUNHA; SANTOS FILHO; NASCIMENTO, 2000; TAVARES, 2002).

A ocorrência dessas doenças no Brasil surgiu inicialmente na década de 90, em pomares de Petrolina- PE e Juazeiro- BA. Essas doenças surgiram à medida que foi adotado o uso da tecnologia de indução floral da mangueira na referida região semi-árida. Essas doenças vêm se acentuando, principalmente nas áreas irrigadas do Nordeste do Brasil, devido a intensificação de áreas cultivadas, intensificação também dos processos tecnológicos fitotécnicos de indução para duas produções ou colheitas anuais, o desequilíbrio de alguns macro e micronutrientes e as condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento desses patógenos (TAVARES, 2003)

A morte descendente é uma doença, cujo patógeno, pode infectar a planta em qualquer estágio de desenvolvimento. O fungo torna-se mais agressivo em plantas sob estresse hídrico (falta ou excesso de água) e com nutrição desbalanceada. O fungo penetra a planta por meio de aberturas naturais, ferimentos resultantes de injúrias mecânicas e podas, rachaduras na casca do tronco e ramos, onde a infecção tem início, principalmente, na ausência de proteção química. O patógeno sobrevive em plantas infectadas e restos de cultura que permanecem na área de cultivo. O fungo é disseminado por meio de respingos de chuva, vento, insetos, mudas infectadas e tesouras de poda. A sintomatologia pode iniciar nos ponteiros da copa, principalmente na panícula da frutificação anterior, progredindo para os ramos, atingindo as gemas vegetativas, que reagem com a produção de exsudados gomosos de coloração clara a escura. Observa-se, também, morte de ramos com folhas de coloração palha e com pecíolo necrosado. A penetração nas folhas também pode ocorrer através das bordas, causando necrose de cor palha com halo escuro. Nos ramos podados e sem proteção, a podridão acontece iniciando pelo ferimento, avança de forma progressiva e contínua, podendo, também, se observar necrose e abortamento de flores e de frutos. Nos ramos mais grossos e no tronco, a infecção acontece de fora para dentro do lenho, iniciando nas rachaduras naturais do tronco e das bifurcações e sob o córtex, onde são observadas lesões escuras, que progridem para o interior do lenho, causando anelamento do órgão afetado (RIBEIRO, 2005).

Entre os prejuízos causados pela doença, destaca-se o aumento dos custos de produção, a redução da vida útil do pomar, a redução na produtividade, além da perda de frutas devido às infecções quiescentes (RIBEIRO, 2005)

Condições de chuva e altas temperaturas na época da colheita da manga favorecem as podridões que afetam o pedúnculo e a porção basal da fruta. Essas podridões causam sérios prejuízos no transporte, armazenamento e exportação da manga, pois os tratamentos pós-colheita não têm sido eficientes para controlá-las (RIBEIRO, 2005).

A podridão peduncular é uma doença que pode ser causada por um complexo de fungos pertencentes a diversos gêneros como: *Botryodiplodia*, *Dothiorella*, *Diplodia Phomopsis*, *Aspergillus*, *Cytosphaera*, *Pestalotiopsis*, etc. Os fungos que causam podridão peduncular ocorrem como endófitos em tecidos maduros da planta, colonizando a inflorescência e atingindo de forma descendente até o pedúnculo onde, posteriormente, penetram a fruta (LINS et al, 2010), onde permanecem quiescentes até o amadurecimento da fruta (POETZ et al., 1994). Os prejuízos causados pela infecção podem ser significativos quando as frutas são armazenadas a baixas temperaturas por longos períodos ou quando amadurecem em temperaturas superiores a 28 °C. Frutas infectadas apresentam áreas difusas de tecido encharcado, inicialmente na região do pedúnculo, projetando-se em direção à porção mediana da fruta. A necrose permanece abaixo da cutícula e pode afetar toda a polpa da fruta, em torno de sete dias, podendo romper a casca da fruta por onde é liberado um fluido decorrente da destruição celular. Em estágio avançado é comum observar o crescimento micelial com posterior produção de picnídios ao redor da lesão (ANGEL et al., 2006).

ASPECTOS TAXONÔMICOS DA FAMÍLIA BOTRYOPSHAERIAEAE

A família Botryosphaeriaceae pertence à ordem Botryosphaerales, à classe Dothideomycetes, ao filo Ascomycota e por fim ao Reino Fungi. Historicamente, mais de 2000 nomes já foram associados à esta família, incluindo estados teleomorfo e anamorfo, os quais *Diplodia*, *Botryosphaeria*, *Fusicoccum*, *Dothiorella*, *Lasiodyplodia* e *Sphaeropsis* representam a maioria das espécies (SLIPPERS et al., 2007). Recentemente, Liu et al. (2012) relatou 29 gêneros e cerca de 1485 espécies associadas a esta família. No entanto, suspeita-se que existem numerosas espécies ainda não descritas.

O gênero *Botryosphaeria* Ces & De Not. foi descrito por Cesati e De Notaris em 1863, revisado por Saccardo em 1877 (PHILLIPS et al., 2005), posteriormente, por Crous et al. (2006) e mais recentemente por Liu et al. (2012). Trata-se de um Loculoascomycetes com ascos bitunicados, produzidos num tecido estromático denominado pseudotécio. Os ascósporos são hialinos, unicelulares e variam de fusóide, elipsóide a ovóide, tornando-se, em algumas espécies, marrom e com 1 a 2-septos com a idade.

A identificação destes fungos ao nível de espécie é complicada por vários aspectos. A diversidade morfológica entre os teleomorfos é, muitas vezes, insuficiente para permitir clara identificação das espécies. Por esta razão, as espécies são identificadas por caracteres morfológicos do anamorfo, que é a forma mais comum encontrada na natureza (DENMAN et

al., 2000; JACOBS et al., 1998). Esses caracteres incluem: tamanho, forma, cor, septação, espessura da parede e textura dos conídios, bem como detalhes da conidiogênese. No entanto, os tamanhos dos conídios de diferentes espécies de *Botryosphaeria* se sobrepõem, enquanto idade e estado de maturidade afetam a pigmentação e septação dos conídios (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007).

Aspectos culturais, tais como a morfologia da colônia e uso de diferentes temperatura na taxa de crescimento micelial também são usados para o reconhecimento de espécies. Porém, os caracteres culturais podem variar muito entre isolados de qualquer espécie, e, portanto, são de valor limitado na determinação de espécies (ABDOLLAHZADEH et al., 2010). Um conceito de espécie ecológica, centrada na especialização do hospedeiro, também tem sido utilizado para identificar espécies de Botryosphaeriaceae, no entanto, uma única espécie é capaz de colonizar uma ampla gama de hospedeiros e várias espécies podem ocorrer no mesmo hospedeiro, não sendo um critério confiável para determinação de espécies (SLIPPERS et al., 2007). Apesar das características morfológicas e culturais terem sido amplamente utilizadas para identificação dessas espécies, o uso apenas desses marcadores, torna-se uma tarefa difícil e não confiável, necessitando, assim, ferramentas que possam fornecer identificações mais precisas e reprodutíveis. Com isso, a aplicação de métodos de biologia molecular, principalmente técnicas baseadas em PCR, tem fornecido importantes contribuições nesta área (ALVES et al., 2007; PHILLIPS et al., 2008).

ASPECTOS FILOGENÉTICOS DA FAMÍLIA BOTRYOPSHAERIACEAE

Estudos utilizando sequências de nucleotídeos da região ITS (espaço interno transcrito) têm sido largamente usado para elucidar a taxonomia dessa família, e juntamente com caracteres morfológicos dos anamorfos tem se tornado uma ferramenta poderosa na separação de espécies e em reavaliar a colocação dos seus anamorfos. Jacobs e Rehner (1998) foram os primeiros a usar as sequências de rDNA em análises filogenéticas de *Botryosphaeria* e mostrar que havia alguma congruência entre caracteres morfológicos, culturais e as sequências de ITS, pelo menos para alguns táxons.

Apesar do impacto que os dados de sequência de nucleotídeos da região ITS apresentaram sobre a taxonomia e filogenia de espécies de *Botryosphaeria*, o uso apenas desse gene pode subestimar a verdadeira diversidade especialmente entre espécies estreitamente relacionadas ou crípticas (TAYLOR et al., 2000). Portanto os dados de sequência de nucleotídeos do gene ITS associados a outros genes como EF1- α , β – tubulina,

entre outros, têm sido aplicados com sucesso para discriminar espécies crípticas e elucidar as relações filogenéticas em Botryosphaeriaceae e anamorfos associados como verificado em inúmeros trabalhos (DE WET et al., 2003; DE WET et al., 2008; INDERBITZIN et al., 2010; PHILLIPS et al., 2008; SLIPPERS et al., 2004; URBEZ-TORRES et al., 2012; VAN NIEKERK et al. 2004).

Apesar dos inúmeros trabalhos existentes, a taxonomia e a nomenclatura dos fungos pertencentes à família Botryosphaeriaceae permanece confusa e a compreensão filogenética dos principais grupos dentro do gênero *Botryosphaeria* continua problemática. Isso pode ser explicado, em parte, pelo uso limitado de espécies, não representando a ampla diversidade de anamorfos associados a *Botryosphaeria* (CROUS et al., 2006).

Denman et al. (2000) revisando os gêneros anamorfos associados à *Botryosphaeria*, verificaram na base da sua filogenia que as espécies estudadas separavam-se em dois cladogramas principais, que correspondiam aos gêneros anamorfos *Fusicoccum* e *Diplodia*. Assim, espécies de *Fusicoccum* apresentavam conídios hialinos com paredes finas, enquanto espécies de *Diplodia* apresentavam conídios pigmentados com paredes grossas. Phillips et al. (2002) e Zhou e Stanosz (2001) também apoiaram essa idéia. Porém, a separação em apenas dois gêneros anamorfos apresentou-se muito simplista, quando um número maior de espécies com maior diversidade do gênero foi analisado, mostrando que espécies de *Botryosphaeria* residem em outros gêneros anamorfos além de *Diplodia* e *Fusicoccum* (VAN NIEKERK et al., 2004).

Em um amplo estudo filogenético, Crous et al. (2006) avaliaram dados de sequência da região 28S do rDNA de 113 isolados, representando as principais variações morfológicas reconhecidas em Botryosphaeriaceae. As análises revelaram 10 linhagens em Botryosphaeriaceae e, neste estudo, os gêneros *Neofusicoccum*, *Pseudofusicoccum* Mohali, Slippers & M.J. Wingf., *Neoscytalidium* Crous & Slippers e *Dothiorella* foram descritas. Posteriormente, Damm et al. (2007b) acrescentaram um gênero adicional, *Aplosporella*. O gênero *Botryosphaeria*, atualmente, apresenta-se restrito a *B. dothidea* e *B. corticis* (Demaree & Wilcox) Arx & E. Müll. Apesar do trabalho de Crous et al. (2006) ter trazido vários esclarecimentos para a taxonomia de Botryosphaeriaceae, problemas taxonômicos referente aos gêneros *Diplodia* e *Lasiodiplodia* não conseguiram ser totalmente resolvidos. No entanto, em uma abordagem multigênica, Phillips et al. (2008) separou este clado em seis gêneros, incluindo *Diplodia*, *Lasiodiplodia*, *Neodeightonia*, *Barriopsis*, *Phaeobotryon* e *Phaeobotryosphaeria*, suportados com características morfológicas e apoiados pelo seus estados teleomorfos. Gêneros assexuados da família Botryosphaeriaceae foram listados em

Hyde et al. (2011), sendo eles: *Aplosporella*, *Bahusutrabeeja*, *Barriopsis*, *Dichomera*, *Diplodia*, *Dothichiza*, *Dothiorella*, *Fusicoccum*, *Lasiodiplodia*, *Macrophomina*, *Microdiplodia*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium*, *Phaeobotryon*, *Phyllosticta*, *Pseudofusicoccum* e *Sphaeropsis*. Recentemente, dois novos gêneros, *Botryobambusa* e *Cophinforma* foram descritos em Botryosphaeriaceae (LIU et al., 2012).

Nos últimos anos, diversos trabalhos foram realizados e novas espécies de Botryosphaeriaceae associados a diversos hospedeiros foram publicadas. Pavlic et al. (2008) identificaram sete novas espécies em vegetação nativa da Austrália utilizando dados da região ITS e EF-1 α . Baseado em genealogias de genes, três novas espécies de *Neofusicoccum* foram identificadas por Pavlic et al. (2009) dentro do complexo *N. parvum/N. ribis* na África do sul. Em 2010, *N. batangarum* e *Lasiodiplodia mahajangana* foram descritas em *Terminalia catappa* (BEGOUDE et al., 2010). Recentemente, *Fusicoccum ramosum* (PAVLIC et al., 2008), *F. atrovirens* (MEHL et al., 2011) *F. fabicercianum* (CHEN et al., 2011) e *B. schariffi* (ABDOLLAHZADEH et al., 2013) foram descritas em Botryosphaeriaceae. Considerando o gênero *Lasiodiplodia*, 15 novas espécies foram relatadas desde 2004. (ABDOLLAHZADEH et al., 2010; ALVES et al., 2008; BEGOUDE et al., 2010; BURGESS et al., 2006; DAMM et al., 2007a; ISMAIL et al., 2012; PAVLIC et al., 2004; 2008; URBEZ-TORRES et al., 2012).

O recente aumento no número de espécies é reconhecido em grande parte devido à utilização de dados filogenéticos, mas é também devido à amostragem em regiões relativamente pouco exploradas, incluindo Venezuela (BURGESS et al., 2006), Austrália (PAVLIC et al., 2008) Irã (ABDOLLAHZADEH et al., 2010) e Brasil (COSTA et al., 2010; MARQUES et al., 2012)

A prevalência de espécies de Botryosphaeriaceae e suas distribuições demonstram ser influenciadas por fatores climáticos, como demonstrado em trabalhos realizados nos EUA, Austrália e México (PITT et al., 2010; URBEZ-TORRES et al., 2006, 2008). Informações sobre incidência, distribuição e patogenicidade de cada espécie são fundamentais para o desenvolvimento de medidas de controle adequadas. Padrões de associação de hospedeiro em Botryosphaeriaceae são largamente inexplorados, devido, parcialmente, a problemas taxonômicos associados essa família (De WET et al., 2008)

No Brasil, não há estudos sobre a diversidade genética de espécies de Botryosphaeriaceae. Portanto, há a necessidade de desenvolver estudos de identificação, prevalência e distribuição de espécies de Botryosphaeriaceae nas diversas regiões produtoras de frutas tropicais, sendo de extrema importância para a prevenção e controle das doenças, já

que as medidas de controle são específicas para cada patógeno (URBEZ-TORRES et al., 2006).

ESPÉCIES DE BOTRYOSPHAERIACEAE ASSOCIADAS À CULTURA DA MANGUEIRA

No mundo, diversas espécies de Botryosphaeriaceae têm sido associadas à doenças da mangueira, sendo as mais prevalentes *N. parvum*, *N. mangiferae*, *B. dothidea* and *L. theobromae* (COSTA et al., 2010; J. JAVIER-ALVA et al., 2009; Ni et al., 2012; SLIPPERS et al., 2005). Atualmente, com a ampla utilização de métodos moleculares e maior amostragem em regiões pouco exploradas, novas espécies foram associadas à esse hospedeiro. No Irã, quatro novas espécies de *Lasiodiplodia* (*L. citricola*, *L. gilanensis*, *L. hormozganensis* e *L. iraniensis*) e posteriormente *B. schariffi* e *N. mediterraneum* foram associadas a essa cultura (ABDOLLAHZADEH et al., 2010, 2013). Na Austrália, *Neoscytalidium novaehollandiae*, *Ne. dimidiatum*, *Pseudofusicoccum adansoniae*, *P. ardesiacum*, *P. kimberleyense*, *L. iraniensis* e *L. pseudotheobromae* foram relatados na cultura da mangueira (RAY et al., 2010; SAKALIDIS et al., 2011;). Recentemente, a nova espécie *L. egyptiaca*, *L. theobromae* e *L. pseudotheobromae* foram relatadas no Egito (ISMAIL et al., 2012).

No Brasil, por muito tempo, a morte descendente e a podridão peduncular foram atribuídas exclusivamente à *L. theobromae*. Posteriormente foi relatado *B. dothidea*, *N. parvum* e *P. stromaticum* associadas à essas doenças (COSTA et al., 2010; MARQUES et al., 2012).

Considerando o grande número de espécies de Botryosphaeriaceae descritas nos últimos anos e associadas à cultura da mangueira, especula-se que possivelmente existam outras espécies envolvidas com esse hospedeiro no Nordeste do Brasil.

Diante disso, o objetivo do trabalho foi identificar e caracterizar espécies de Botryosphaeriaceae associadas à morte descendente e podridão peduncular na cultura da mangueira no Nordeste do Brasil, através de dados morfológicos e moleculares, assim como avaliar a patogenicidade e virulência dessas espécies, buscando o conhecimento sobre a etiologia e epidemiologia da doença, fundamentais para desenvolver estratégias de ação específicas aos agentes causais, contribuindo para diminuir as perdas de produção e consequentemente aumentar a competitividade do agronegócio da mangicultura no Nordeste do Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABDOLLAHZADEH, J.; JAVADI, A.; ZARE, R.; PHILLIPS, A. J. L. Phylogeny and Taxonomy of *Botryosphaeria* and *Neofusicoccum* species in Iran, with description of *Botryosphaeria scharifii* sp. nov. **Mycologia**, New York, v. 105, n. 1, p. 210–220, 2013.

AGRIBIENAL. Anuário da agricultura brasileira. Informa Economics/FNP South America, São Paulo. 2012. 482 p.

AL ADAWI, A. O.; DEADMAN, M. L.; AL RAWAHI, A. K.; KHAN, A. J.; AL MAQBALI, Y. M. *Diplodia theobromae* associated with sudden decline of mango in the Sultanate of Oman. **Plant Pathology**, Oxford, v. 52, n. 3, p. 419, 2003.

ALVES, A.; PHILLIPS, A. J. L.; HENRIQUES, I.; CORREIA, A. Rapid differentiation of species of Botryosphaeriaceae by PCR fingerprinting. **Research in Microbiology**, Paris, v. 158, n. 2, p. 112–121, 2007.

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

ANGEL, N.D.; RAMOS, M.A.; ORTIZ, D.T.; JOSE, A.R. “Enfermidades del mango”. In: Oliveira S.M.A., Terão M., Dantas S.A.F., Tavares, S.C.C.H. (Ed). **Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**, Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 1 ed. p. 733–774.

BEGOUDE, B. A. D.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; ROUX, J. Botryosphaeriaceae associated with *Terminalia catappa* in Cameroon, South Africa and Madagascar. **Mycological Progress**, Heidelberg, v. 9, n. 1, p. 101–123, 2010.

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

CHEN, S. F.; PAVLIC, D.; ROUX, J.; SLIPPERS, B.; XIE, Y. J.; WINGFIELD, M. J.; ZHOU, X. D. Characterization of Botryosphaeriaceae from plantation grown *Eucalyptus* species in South China. **Plant Pathology**, Oxford, v. 60, n. 4, p. 739–751, 2011.

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

CROUS, P. W.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; RHEEDER, J.; MARASAS, W. F.O.; PHILLIPS, A. J. L.; ALVES, A.; BURGESS, T.; BARBER, P.; GROENEWALD, J. Z. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 55, n. 2, p. 235–253. 2006.

CUNHA, M. M.; SANTOS FILHO, H. P.; NASCIMENTO, A. S. **Manga**: fitossanidade. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. 2000. 104 p. (Frutas do Brasil, 6).

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

DAMM, U.; FOURIE, P. H.; CROUS, P. W. *Aplosporella prunicola*, a novel species of anamorphic Botryosphaeriaceae. **Fungal Diversity**, Kummung, v. 27, p. 35–43, 2007b.

DE WET, J.; BURGESS, T.; SLIPPERS, B.; PREISIG, O.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M.J. Multiple gene genealogies and microsatellite markers reflect relationships between morphotypes of *Sphaeropsis sapinea* and distinguish a new species of *Diplodia*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, n. 5, p. 557–566. 2003.

DE WET, J.; SLIPPERS, B.; PRELSIG, O.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Phylogeny of the Botryosphaeriaceae reveals patterns of host association. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 46, n. 1, p. 116–126, 2008.

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

FAO - **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

HYDE, K. D.; MCKENZIE, E. H. C.; KOKO, T. W. Towards incorporating anamorphic fungi in a natural classification—checklist and notes for 2010. **Mycosphere**, Chiang Rai, v. 2, n. 1, p. 1–88, 2011.

IBRAF. **Produção de frutas no Brasil**. 2011 Disponível em: http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est_frutas.asp. Acesso em: 22 dez. 2012.

INDERBITZIN, P.; BOSTOCK, R. M.; TROUILLAS, F. P.; MICHAILIDES, T. J. A. Six locus phylogeny reveals high species diversity in Botryosphaeriaceae from California almond. **Mycologia**, New York, v. 102, n. 6, p. 1350–1368, 2010.

- ISMAIL, A. M.; CIRVILLERI, G.; POLIZZI, G.; CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z.; LOMBARD, L. *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica*) in Egypt. **Australasian Plant Pathology**, New York, v. 41, n. 6, p. 649–660, 2012.
- JAVIER-ALVA, J.; GRAMAJE, D.; ALVAREZ, L. A.; ARMENGOL, J. First report of *Neofusicoccum parvum* associated with dieback of mango trees in Peru. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 93, n. 4 p. 426, 2009.
- JACOBS, K. A.; REHNER, S. A. Comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of *Botryosphaeria* and related taxa. **Mycologia**, New York, v. 90, n. 4, p. 601–610, 1998.
- JOHNSON, G. I. Mango. In: PLOETZ, R. C.; ZENTMYER, G. A.; NISHIJIMA, W. T.; ROHRBACH, K. G.; OHR, H. D. (Eds.). **Compendium of tropical fruit Diseases**. St. Paul: American Phytopathological Society. 1994, p. 33–43.
- KHANZADA, M. A.; LODHI, A. M.; SHAHZAD, S. Pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Fusarium solani* on mango. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 36, n. 1, p. 181–189, 2004.
- LINS, S. R. O.; ALVES, E.; OLIVEIRA, S. M. A. Estudos da interação *Lasiodiplodia theobromae* x mangueira e caracterização morfológica de isolados do patógeno. **Acta Microscopica**, Oxford, v. 19, p. 221–231, 2010.
- LIU, J. K.; PHOOKAMSAK, R.; MINGKHUAN, M.; WIKEE, S.; LI, Y. M.; ARIYAWANSHA, H.; BOONMEE, S.; CHOMNUNTI, P.; DAI, D. Q.; D. BHAT, J.; ROMERO, A. I.; ZHUANG, W. Y.; MONKAI, J.; GARETH JONES, E. B.; CHUKEATIROTE, E.; KO KO, T. W.; ZHAO, Y. C.; WANG, Y.; HYDE, K. D. Towards a natural classification of Botryosphaeriales. **Fungal Diversity**, Kuming, v. 57, n. 1, p. 149–210, 2012.
- MARQUES, M. W.; LIMA, N. B.; MICHEREFF, S. J.; CÂMARA, M. P. S.; SOUZA, C. R. B. First report of mango dieback caused by *Pseudofusicoccum stromaticum* in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 96, n. 1, p. 144–145, 2012.
- MEHL, J. W.; SLIPPERS, B.; ROUX, J.; WINGFIELD, M. J. Botryosphaeriaceae associated with *Pterocarpus angolensis* (kiaat) in South Africa. **Mycologia**, New York, v. 103, n. 3, p. 534–553, 2011.
- NI, H. F.; LIOU, R. F.; HUNG, T. H.; CHEN, R. S.; YANG, H. R. First Report of Fruit Rot Disease of Mango Caused by *Botryosphaeria dothidea* and *Neofusicoccum mangiferae* in Taiwan. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n. 1, p. 128–128, 2010.
- NI, H. F.; YANG, H. R.; CHEN, R. S.; LIOU, R. F.; HUNG, T. H. New Botryosphaeriaceae fruit rot of mango in Taiwan: identification and pathogenicity. **Botanical Studies**, Taipei, v. 53, n. 4, p. 467–478, 2012.

NIETO-ÁNGEL, D.; RAMOS, M. A.; ORTÍZ, D. T.; SÃO JOSÉ, A. R. Enfermedades del mango. In: OLIVEIRA, S. M. A.; TERAPO, D.; DANTAS, S. A. F.; TAVARES, S. C. C. H. (Eds.). **Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. p. 731–774.

NOGUEIRA, E. M. C.; FERRARI, J. T.; LOUZEIRO, I. M. Ocorrência de *Lasiodiplodia theobromae* causando perdas severas de frutos em mangueira no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, p. 53, 2001.

PAVLIC, D.; SLIPPERS, B.; COUTINHO, T. A.; GRYZENHOUT, M.; WINGFIELD, M. J. *Lasiodiplodia gonubiensis* sp. nov., a new *Botryosphaeria* anamorph from native *Syzygium cordatum* in South Africa. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 50, n. 1, p. 313–322, 2004.

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

PAVLIC, D.; SLIPPERS, B.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, M. J. Multiple gene genealogies and phenotypic data reveal cryptic species of the Botryosphaeriaceae: a case study on the *Neofusicoccum parvum*/*N. ribis* complex. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 51, n. 2, p. 259–68, 2009a.

PAVLIC, D.; SLIPPERS, B.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, M. J. Molecular and phenotypic characterization of three phylogenetic species discovered within the *Neofusicoccum parvum*/*N. ribis* complex. **Mycologia**, New York, v. 101, n. 5, p. 636–647, 2009b.

PHILLIPS, A.J.L., FONSECA, F., POVOA, V., CASTILHO, R. AND NOLASCO, G. A reassessment of the anamorphic fungus *Fusicoccum luteum* and description of its teleomorph *Botryosphaeria lutea* sp. nov. **Sydowia**, Horn, v. 54, n.1, p. 59–77. 2002.

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

PHILLIPS, A. J. L.; ALVES, A.; PENNYCOOK, S.R.; JOHNSTON, P.R.; RAMALEY, A.; AKULOV, A.; CROUS, P.W. Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the Botryosphaeriaceae. **Persoonia**, Leiden, v. 21, n.1, p. 29–55, 2008.

PITT, W. M.; HUANG, R.; STEEL, C. C.; SAVOCCHIA, S. Identification, distribution and current taxonomy of Botryosphaeriaceae species associated with grapevine decline in New South Wales and South Australia. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, New York, v. 16, n. 1, p. 258–271, 2010.

POETZ, R. C.; ZENTMYER, G. G.; NISHIJIMA, W. T.; ROHRBACH, K. G.; OHR, H. D. (Ed.). **Compendium of tropical fruit diseases**. St. Paul: APS PRESS. 1994. 88 p.

PLOETZ, R. C.; BENSCHER, D.; VÁZQUEZ, A.; COLLS, A.; NAGEL, J.; SCHAFFER, B. A reexamination of mango decline in Florida. **Plant Disease**, St. Paul, v. 80, n. 6, p. 664–668, 1996.

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

RAY, J. D.; BURGESS, T. I.; LANOISELET, V. M. First record of *Neoscytalidium dimidiatum* and *N. novaehollandiae* on *Mangifera indica* and *N. dimidiatum* on *Ficus carica* in Australia. **Plant Disease Notes**, St. Paul, v. 5, n. 1, p. 48–50, 2010.

RIBEIRO, I. J. A. Doenças da mangueira (*Mangifera indica* L.) In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, Cap. 4, p. 457–465.

SAKALIDIS, M. L.; RAY, J. D.; LANOISELET, V.; HARDY, G. E. StJ.; BURGESS, T. I. Pathogenic Botryosphaeriaceae associated with *Mangifera indica* in the Kimberley Region of Western Australia. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 130, n. 3, p. 379–391, 2011.

SILVA, C. R. R.; FONSECA, E. B. A.; MOREIRA, M. A. **A cultura da mangueira**. Lavras: UFLA, 2002. 116 p.

SILVA, P. C. G.; CORREIA, R. C. Socioeconomia. In: MOUCO, M. A. C. (Ed.). **Cultivo da mangueira**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2004. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira/socioeconomia.htm>> Acesso em: 26 de jan. de 2013.

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

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

SLIPPERS, B.; SMIT, W. A.; CROUS, P. W.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Taxonomy, phylogeny and identification of Botryosphaeriaceae

associated with pome and stone fruit trees in South Africa and other regions of the world. **Plant Pathology**, Oxford, v. 56, n. 1, p. 128–139, 2007.

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

TAVARES, S. C. C. H. Epidemiologia e manejo integrado de *Botryodiplodia theobromae* - situação atual no Brasil e no mundo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 3, p. 46–52, 2002.

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

TAVARES, S. C. C. H. Perigo ronda as frutas. **Cultivar - Hortaliças e Frutas**, Pelotas, v. 4, n. 20, p. 18-23, 2003.

TAYLOR, J. W.; JACOBSON, D.J.; KROKEN, S.; KASUGA, T.; GEISER, D.M.; HIBBETT, D. S.; FISHER, M. C. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 31, n. 1, p. 21–32, 2000.

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

ÚRBEZ-TORRES, J. R.; LEAVITT, G. M.; VOEGEL, T. M.; GUBLER, W. D. Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine cankers in California. **Plant Disease**, St. Paul, v. 90, n. 12, p. 1490–1503, 2006.

ÚRBEZ-TORRES, J. R.; PEDUTO, F.; STRIEGLER, R. K.; URREA-ROMERO, K. E.; RUPE, J. C.; CARTWRIGHT, R. D.; GUBLER, W. D. Characterization of fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Arkansas and Missouri. **Fungal Diversity**, Kummerow, v. 52, n. 1, p. 169–189, 2012.

VAN NIEKERK, J. M.; CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z. E.; FOURIE, P. H.; HALLEEN, F. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. **Mycologia**, New York, v. 96, n. 4, p. 781–798, 2004.

ZHOU, S.; STANOSZ, G. R. Relationships among *Botryosphaeria* species and associated anamorphic fungi inferred from the analyses of ITS and 5.8S rDNA sequences. **Mycologia**, New York, v. 93, n. 3, p. 516–527, 2001.

CAPITULO II

Espécies de *Lasiodiplodia* associadas à cultura da mangueira no Nordeste do Brasil

Espécies de *Lasiodiplodia* associadas à cultura da mangueira no Nordeste do Brasil

Marília W. Marques¹, Nelson B. Lima¹, Marcos A. Morais Junior², Maria Angélica G. Barbosa³, Breno O. Souza¹, Sami J. Michereff¹, Alan J.L. Phillips⁴, Marcos P.S. Câmara¹

¹Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife, Brasil

²Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, 50732-970 Recife, Brasil

³Embrapa Semi-Árido, 56302-970 Petrolina, Brasil

⁴Centro de Recursos Microbiológicos, Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal

M. P. S. Câmara (✉) - e-mail: mcamara@depa.ufrpe.br

Telephone number: +55 8133206205

Fax number: +55 8133206200

Resumo

A mangueira (*Mangifera indica*) é uma das principais espécies de frutas tropicais cultivadas no Brasil. O objetivo deste estudo foi identificar espécies de *Lasiodiplodia* associadas a morte descendente e podridão peduncular na cultura da mangueira na região semi-árida do Nordeste do Brasil e comparar as espécies em relação ao crescimento micelial, patogenicidade e virulência. Um total de 120 isolados de *Lasiodiplodia* foram analisados e identificações foram feitas usando uma combinação de morfologia e análise filogenética da sequência parcial do gene fator de alongação (EF1- α) e da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA. Foram identificadas as seguintes espécies: *Lasiodiplodia crassispora*, *L. egyptiaca*, *L. hormozganensis*, *L. iraniensis*, *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae* e *Lasiodiplodia* sp.. *Lasiodiplodia theobromae* foi a espécie mais frequentemente isolada, representando 41% de todos os isolados. Somente esta espécie tinha sido relatada em mangueira no Brasil, enquanto as outras espécies representam o primeiro relato associadas à esta cultura no país. *L. crassispora* é relatada pela primeira vez causando doenças em mangueira no mundo. Houve diferenças significativas na taxa de crescimento micelial entre as espécies de *Lasiodiplodia* e também em relação à temperatura ótima para o crescimento. Todas as espécies de *Lasiodiplodia* foram patogênicos em manga. Houve diferenças significativas na virulência entre as espécies, onde *Lasiodiplodia* sp. e *L. hormozganensis* foram as mais virulentas, enquanto as menos virulentas foram *L. iraniensis*, *L. pseudotheobromae*, *L. crassispora* e *L. egyptiaca*.

Palavras-chave: Botryosphaeriaceae, *Mangifera indica*, ITS, EF1- α , filogenia, virulência

Introdução

A mangueira (*Mangifera indica* L.) é uma das principais espécies de frutas tropicais cultivadas no Brasil. Em 2010, a produção brasileira atingiu 1.197.694 toneladas de frutos em uma área de aproximadamente 75.416 hectares, gerando cerca de 334 milhões de dólares. Considerando tanto a renda quanto o volume exportado, a manga ocupou o terceiro lugar no segmento de frutas frescas, com faturamento de 119.929 milhões de dólares e 124.694 toneladas de frutas, respectivamente (Agrianual 2012). A maior parte da manga exportada é produzida na região semi-árida do Nordeste, principalmente no Vale do São Francisco e Vale do Assu (Costa et al. 2010). Esta cultura desempenha um importante papel social, gerando mais de 25.000 empregos diretos e 75.000 indiretos no Vale do São Francisco (Souza et al.

2002). Entre a vasta gama de doenças que causam impacto na produção de manga no Brasil, a morte descendente e a podridão peduncular tornam-se cada vez mais importante (Costa et al. 2010).

Morte descendente e podridão peduncular da mangueira são doenças causadas por um complexo de fungos, mas os membros de Botryosphaeriaceae são considerados os mais importantes (Johnson, 1992; Al Adawi et al. 2003; Slippers et al. 2005; Javier-Alva et al. 2009; Costa et al. 2010; Ismail et al. 2012). Botryosphaeriaceae é uma família constituída de inúmeros gêneros em Dothideomycetes, compreendendo numerosas espécies e com uma distribuição cosmopolita (Crous et al. 2006; Phillips et al. 2008). Espécies de Botryosphaeriaceae estão associadas a diversos hospedeiros, e podem atuar como patógenos, endofíticos ou saprófitas (Denman et al. 2000; Crous et al. 2006). *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl, um membro de Botryosphaeriaceae, ocorre principalmente em regiões tropicais e subtropicais, causando danos em cerca de 500 plantas hospedeiras (Punithalingam 1980; Burgess et al. 2006). Este fungo tem sido relatado como patógeno de manga no mundo todo e associado a inúmeros sintomas, incluindo morte descendente, podridão peduncular, declínio, gomose e cancro (Ploetz et al. 1996; Jacobs 2002; Khanzada et al. 2004; Abdollahzadeh et al. 2010; Costa et al. 2010; Sakalidis et al. 2011a; Ismail et al. 2012). Além de manga, diversas outras culturas de importância econômica são afetadas por *L. theobromae* no Brasil, especialmente abacate (*Persea americana* Mill.), banana (*Musa* spp.), acerola (*Malpighia glabra* L.), caju (*Anacardium occidentale* L.), citros (*Citrus* spp.), coqueiro (*Cocos nucifera* L.), pinha (*Annona squamosa* L.) videira (*Vitis* sp.), goiaba (*Psidium guajava* L.), melão (*Cucumis melo* L.), mamão (*Carica papaya* L.), maracujá (*Passiflora edulis* Sims.), graviola (*Annona muricata* L.) e melancia (*Citrullus lanatus* Thunb.) (Tavares 2002; Freire et al. 2003).

De acordo com Sutton (1980) e Phillips et al. (2008), as principais características que distinguem *Lasiodiplodia* de outros gêneros estreitamente relacionados são a presença de paráfises e estrias longitudinais em conídios maduros. Estudos recentes baseados em dados de sequência do ITS e EF-1 α , levaram à identificação de espécies crípticas dentro do complexo de espécie *L. theobromae* (Pavlic et al. 2004; Burgess et al. 2006; Damm et al. 2007; Alves et al. 2008; Pavlic et al. 2008; Abdollahzadeh et al. 2010; Begoude et al. 2010; Úrbez-Torres et al. 2012; Ismail et al. 2012). Atualmente, 16 espécies são reconhecidas em *Lasiodiplodia*.

Mundialmente, diversas espécies de *Lasiodiplodia* têm sido associadas à doenças na mangueira. *Lasiodiplodia theobromae* foi relatada na Austrália (Slippers et al. 2005), Brasil (Costa et al. 2010), Egito (Ismail et al. 2012), Irã (Abdollahzadeh et al. 2010), África do Sul

(Jacobs 2002) e EUA (Ploetz et al. 1996). Recentemente, quatro novas espécies de *Lasiodiplodia* (*L. citricola* Abdollahzadeh, Zare & Phillips AJL, *L. gilanensis* Abdollahzadeh, Javadi & Phillips AJL, *L. hormozganensis* Abdollahzadeh, Zare & Phillips AJL, *L. iraniensis* Abdollahzadeh, Zare & Phillips AJL) e *L. pseudotheobromae* AJL Phillips, A. Alves & Crous foram associados com este hospedeiro no Irã (Abdollahzadeh et al. 2010). Na Austrália, *L. iraniensis* e *L. pseudotheobromae* foram isoladas a partir de sintomas de cancos e morte descendente da mangueira (Sakalidis et al. 2011a). Em 2012, *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae* e *L. egyptiaca* (AM Ismail, L. Lombard & Crous) foram relatadas no Egito associadas à essa cultura (Ismail et al. 2012).

No Brasil, por muito tempo, a morte descendente e a podridão peduncular da mangueira foram atribuídas exclusivamente a *L. theobromae*, mas estudos recentes baseados em métodos moleculares revelaram a presença de outras espécies de Botryosphaeriaceae, tais como *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers e AJL Phillips, *Fusicoccum aesculi* (Corda) Crous, Slippers e AJL Phillips e *Pseudofusicoccum stromaticum* (Mohali, Slippers e MJ Wingf.) Mohali, Slippers e MJ Wingf. associadas à estas doenças (Costa et al. 2010; Marques et al. 2012).

A importância econômica crescente de doenças de plantas causadas por *Lasiodiplodia* e a recente descoberta de novas espécies de fungos associadas à plantas tropicais nos leva a especular que mais do que uma espécie de *Lasiodiplodia* pode estar associada a doenças de manga no Nordeste do Brasil. A etiologia da doença é crucial para estudos epidemiológicos e para uma melhor compreensão da distribuição e da importância das espécies individuais, bem como para encontrar estratégias eficazes de controle para cada patógeno. Portanto, o objetivo deste estudo foi identificar espécies de *Lasiodiplodia* a partir de um grande número de isolados associados à morte descendente e podridão peduncular da mangueira no Nordeste do Brasil.

Materiais e Métodos

Coleta e isolamento de fungos

Entre os meses de Janeiro a Fevereiro de 2010, ramos e frutos com sintomas de morte descendente e podridão peduncular foram coletados de 14 pomares de manga (25 amostras por pomar) localizados no Vale do São Francisco e Vale do Assu, região Nordeste do Brasil. Amostras foram coletadas de cultivares: Tommy Atkins, Keitt, Haden e Palmer. Pequenos

fragmentos (4-5 mm) de tecido foram obtidos a partir da margem entre o tecido necrótico e aparentemente saudável. Os tecidos foram desinfestados em etanol a 70% durante 30 s e 1% de hipoclorito de sódio durante 1 min. As amostras foram lavadas em água destilada esterilizada durante 30 s, secas em papel toalha esterilizado e transferidos para placas de petri contendo batata dextrose ágar (BDA) (Acumedia, Lansing, EUA) modificado com 0.5 g/l de sulfato de estreptomicina (BDAs). As placas foram incubadas à 25 °C no escuro por três a quatro dias e colônias fúngicas emergidas de cada fragmento com características de espécies de Botryosphaeriaceae, como descrito no site Botryosphaeria (http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site/), foram repicadas para novas placas com BDA e incubadas a 25 °C no escuro, com observações aos 3, 5 e 15 dias. Para obtenção de isolados monospóricos, picnídios foram obtidos em meio ágar água 2% - AA com acículas de pinheiro esterilizadas como substrato após três semanas de incubação a 25 °C sob fotoperíodo de 12 h com luz próxima à ultravioleta (Slippers et al. 2004). Um único picnídio foi retirado de cada isolado sob microscópio estereoscópico (Zeiss Stemi DV4; Carl Zeiss, Berlin, Germany) e macerado em água destilada esterilizada para produção de uma suspensão de conídios. Uma alíquota dessa suspensão foi distribuída em BDA e incubada a 25 °C no escuro por 24 h. Um único isolado monospórico foi recuperado de cada amostra individual e transferido para placa de petri contendo BDA. Todos os isolados foram identificados morfológicamente como *Lasiodiplodia* quando características típicas do gênero estavam presentes, tais como presença de paráfises e estrias longitudinais em conídios maduros (Sutton, 1980; Alves et al. 2008). Os isolados obtidos foram armazenados em tubos de BDA a 5 °C no escuro.

Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

Utilizando uma ponta de pipeta esterelizada de 10 ul, uma pequena quantidade de micélio aéreo foi raspada da superfície de uma cultura de 5 dias de idade crescido em BDA à 25 °C. O DNA genômico foi extraído utilizando o Kit AxyPrep™ Multisource Genomic DNA Miniprep (Axygen Scientific Inc., Union City, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A região ITS foi amplificada utilizando os oligonucleotídeos ITS1 e ITS4 (White et al. 1990), como descrito por Slippers et al (2004) e o gene EF1- α foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos EF1-688F e EF1-1251R (Alves et al. 2008) como descrito por Phillips et al. (2005). Uma porção do gene do fator de alongação (EF1- α) foi sequenciado para todos os isolados de *Lasiodiplodia* coletados a partir de pomares de mangueira. A região ITS1-5.8S-

ITS2 do rDNA foi sequenciada para confirmar a identidade dos isolados representativos dentro de cada espécie identificada pelo EF1- α .

Cada reação em cadeia de polimerase (PCR) foi realizada em um volume final de 50 μ l contendo 21 μ l de água, 1 μ l de DNA, 1.5 μ M de cada primers e 25 μ l de PCR Master Mix (2X) (0.05 u μ l⁻¹ de *Taq* DNA polimerase, reaction buffer, 4 mM MgCl₂, 0.4 mM de cada dNTP; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). As reações de PCR foram realizadas em termociclador (Biocycler MJ 96; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os produtos de PCR amplificados foram separados por eletroforese em géis de agarose a 1,5% em Tris-acetato 1.0 \times ácido EDTA (TAE) e foram fotografadas sob luz UV, após coloração em brometo de etídio (0.5 μ g/ml) durante 1 min. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit de limpeza da AxyPrep™ PCR (Axygen), seguindo as instruções do fabricante. As regiões ITS e EF1- α foram sequenciadas em ambas as direções, utilizando um ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) na Plataforma de Sequenciamento LABCEN / CCB na Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Brasil).

Análises filogenéticas

Sequências foram editadas utilizando o programa Chromas v. 2.32 (Technelysium Pty Lda., Brisbane, Austrália). As sequências foram alinhadas com ClustalX v. 1.83 (Thompson et al. 1997) e ajustadas manualmente, quando necessário. Informações filogenéticas contendo indels (gaps) foram incorporadas nas análises filogenéticas conforme descrito por Young and Healy (2003). O teste de homogeneidade de partição determinou a possibilidade de combinar o conjunto de dados da região ITS e EF1- α (Farris et al. 1995; Huelsenbeck et al. 1996). Sequências nucleotídicas de espécies de *Lasiodiplodia* obtidas no GenBank foram incluídas nas análises (Tabela 1). *Diplodia seriata* De Not. (CBS 112555) and *D. mutila* Fr. (CBS 112553) foram utilizadas como grupo externo.

As análises filogenéticas foram realizadas com o programa PAUP v. 4.0b10 (Swofford 2003) para a máxima parcimônia e MrBayes v. 3.0b4 (Ronquist e Huelsenbeck 2003) para análises bayesianas.

As análises de Máxima-parcimônia foram realizadas utilizando a opção de busca heurística com 1000 taxa de adição aleatória e árvore com bissecção e reconexão (TBR) com o algoritmo “branch-swapping”. A robustez das árvores mais parcimoniosas foi avaliada a partir de 1000 replicações de bootstrap (Hillis and Bull 1993). Outras medidas foram obtidas como índice de consistência (CI), índice de retenção (RI) e índice de homoplasia (HI).

As análises Bayesianas foram realizadas empregando o método de Monte Carlo via Cadeia de Markov. O modelo evolutivo general time-reversible (Rodriguez et al. 1990), incluindo a estimativa dos sítios invariáveis e assumindo a distribuição gamma discreta com seis categorias de taxa (GTR+ Γ +I) foi utilizado. Quatro cadeias MCMC foram realizadas simultaneamente, iniciando a partir de árvores aleatórias por 1.000.000 de gerações. As árvores foram amostradas a cada 100 gerações para um total de 10.000 árvores. As primeiras 1.000 árvores foram descartadas como a fase de *burn-in* de cada análise. As probabilidades posteriores (Rannala and Yang 1996) foram determinadas a partir de uma árvore consenso da regra da maioria gerada com as 9.000 árvores remanescentes. Esta análise foi repetida três vezes iniciando de árvores aleatórias diferentes para assegurar que árvores do mesmo espaço tenham sido amostradas durante cada análise.

Árvores filogenéticas foram visualizadas com Treeview (Page 1996). Sequências obtidas neste estudo foram depositadas no GenBank e o alinhamento no TreeBASE (S13281). Isolados representativos das diferentes espécies de *Lasiodiplodia* obtidos neste estudo foram depositados na Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos "Prof Menezes Maria"(CMM) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Recife, Brasil).

Caracterização morfológica

Os isolados identificados nas análises filogenéticas foram utilizados para os estudos de morfologia da colônia e características de conídios. A morfologia das colônias dos isolados foram registradas durante 15 dias de crescimento em BDA a 25 °C no escuro. Características de conídios foram observadas em meio AA 2% contendo acículas de pinheiro autoclavadas e incubadas em condições próximas da luz ultravioleta, tal como descrito anteriormente.

O comprimento e a largura de 50 conídios por isolado foram mensurados usando microscópio composto (Olympus BX41; Olympus Co., Tokyo, Japão) com câmara digital (Samsung SDC-415; Samsung Co., Seoul, Korea) e dispositivo de imagem (Motic Image Plus 2.0; Motic Group Co., Beijing, China). A média e o desvio padrão das medidas dos conídios, incluindo a proporção comprimento e largura (C/L), foram obtidos usando o programa STATISTIX v. 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA).

Os isolados também foram utilizados para determinar o efeito da temperatura sobre o crescimento micelial para as diferentes espécies. Um disco de BDA de 3 mm de diâmetro, contendo estruturas fúngicas dos isolados, foi retirado das margens da colônia com 3 dias de crescimento e colocado no centro de uma placa de petri (90mm de diâmetro) contendo BDA.

Quatro repetições de cada isolado foram incubadas à temperaturas que variam entre 5 a 35 °C em intervalos de 5 °C no escuro. Após um período de incubação de 2 dias, o diâmetro das colônias (mm) foi medido em duas direções perpendiculares. O experimento foi feito duas vezes. Os valores dos diâmetros das colônias versus temperatura foram ajustados para curva de regressão usando modelo polinomial cúbico ($y = a + bx + cx^2 + dx^3$) e a temperatura ótima foi estimada usando modelo de regressão e o sumário numérico com o auxílio do programa TableCurve™ 2D v. 5.01 Software (SYSTAT Software Inc., Chicago, IL, USA). A temperatura ótima foi definida como a temperatura que apresentou maior crescimento radial. Os diâmetros das colônias a 30 °C foram usados para calcular a taxa de crescimento radial (mm/dia). Análises de variância de um fator (ANOVA) foram conduzidas com os dados obtidos pela temperatura ótima e taxa do crescimento micelial e as médias comparadas pelo teste da diferença mínima significativa de Fisher (LSD) ao nível de significância de 5%, utilizando STATISTIX v 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, USA).

Virulência em frutas

Os isolados utilizados na caracterização morfológica foram selecionados para este teste. Manga da cv. Tommy Atkins no estágio três de maturação (Assis 2004) foram lavados em água de torneira, desinfestados em etanol a 70% durante 1 minuto e hipoclorito de sódio a 1.5% durante 5 minutos, em seguida, enxaguados em água destilada esterilizada. Após serem secos, as mangas foram mantidos em umidade relativa próxima de 100% pela deposição em bandejas plásticas forradas com quatro camadas de papel toalha umedecidas com água. Cada manga foi colocado sobre uma tampa de placa de Petri esterilizada, para evitar o contato direto com a água. Cada fruta foi ferida na região mediana com a ponta de quatro alfinetes estéreis através da superfície da casca a uma profundidade de 3 mm. Sobre cada ferimento foi depositado um disco de BDA de 5 mm de diâmetro, contendo estruturas fúngicas dos isolados, retirado da borda da colônia com 3 dias de idade crescidos em BDA a 25 °C no escuro. Como testemunha foram utilizadas mangas contendo discos de BDA sem crescimento fúngico depositados sobre os ferimentos. As bandejas foram colocadas em sacos de plástico e incubada a 25 °C no escuro. Os sacos de plástico e o papéis toalha foram removidos após 48 horas e os frutos foram mantidos à mesma temperatura. Os isolados foram considerados patogênicos quando a área lesionada ultrapassou o diâmetro da lesão de 5 mm inicial. A virulência dos isolados foi avaliada pela medição do comprimento da lesão após 72 horas da inoculação em duas direções perpendiculares. O experimento foi conduzido em delineamento

inteiramente casualizado, com seis repetições por tratamento (isolado) e um fruto por repetição. Diferenças na virulência causada por espécies *Lasiodiplodia* foram determinadas por uma análise de variância e as médias comparadas pelo teste de LSD ao nível de significância de 5% utilizando STATISTIX.

Resultados

Sequenciamento e análises filogenéticas

Um total de 120 isolados de *Lasiodiplodia* spp. foi obtido a partir de ramos e frutos de mangueira. Desse total, sete espécies de *Lasiodiplodia* foram identificadas a partir da análise filogenética da sequência parcial do gene fator de alongação (EF1- α): *L. crassispora* Burgess & Barber, *L. egyptiaca*, *L. hormozganensis*, *L. iraniensis*, *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae* e *Lasiodiplodia* sp.. Para confirmar a identidade desses isolados, representantes das supostas espécies tiveram a região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA sequenciada. Os fragmentos de PCR da região ITS e EF1- α foram aproximadamente 580 e 450 pares de base, respectivamente. O teste de homogeneidade de partição não apresentou nenhuma diferença significativa entre os dados das diferentes regiões do gene, o que indica que eles podem ser combinados em um único conjunto de dados ($P = 0.08$). O conjunto de dados combinados continha 78 táxons e 2 espécies como grupo externo, gerando 747 caracteres. Desses, 548 foram constantes, 43 variáveis e não informativos e 147 informativos para parcimônia. Busca heurística gerou três árvores igualmente parcimoniosas (TL=327; CI=0.758; RI=0.918; HI=0.242). As análises filogenéticas de máxima parcimônia e método Bayesiano produziram topologias semelhantes (árvore Bayesiana não apresentado). Sequências nucleotídicas de várias espécies de *Lasiodiplodia* obtidas do GenBank foram incluídas na análise, juntamente com as sequências dos isolados obtidos neste estudo (Tabela 1). A análise filogenética resultou em 17 clados bem suportados. Cada clado corresponde à espécie previamente descritas. Os isolados obtidos neste estudo agruparam em sete clados. A maioria dos isolados (17 isolados) agruparam juntamente com um grande clado contendo a espécie *L. theobromae* (CBS 164.96; CBS111530). Esses isolados se subdividiram em cinco sub-clados, com baixo suporte. O segundo grupo com sete isolados agruparam com *L. viticola*, com um baixo apoio de bootstrap (64%), mas um elevado suporte Bayesiano (100%). Sete isolados agruparam juntamente com *L. iraniensis* apresentando um clado bem suportado (MP / MB: 99/1.0), subdividido em dois outros sub-clados. Seis isolados agruparam com *L. hormozganensis* (MP

/ MB: 80/0.72). Quatro isolados apresentaram sequências quase idênticas a espécie tipo de *L. pseudotheobromae*, sendo fortemente apoiados (MP / MB: 99/1.0). Dois isolados agruparam com uma espécie recentemente descrita em manga, *L. egyptiaca* (MP / MB: 74/0.90) e um isolado residiu juntamente com a espécie *L. crassipora* fortemente apoiada por um valor de bootstrap de 100%.

Lasiodiplodia theobromae foi a espécie prevalente neste estudo (44%), seguido por *Lasiodiplodia* sp. (18%), *L. iraniensis* (17%), *L. pseudotheobromae* (13%), *L. hormozganensis* (5%), *L. egyptiaca* (2 %) e *L. crassipora* (1%). A distribuição das espécies de *Lasiodiplodia* diferiu entre os Vales do Assu e São Francisco. *L. theobromae* foi a espécie predominante nas duas regiões. *L. pseudotheobromae*, *L. iraniensis*, *L. hormozganensis* e *Lasiodiplodia* sp. também foram encontradas em ambas as regiões, enquanto as espécies *L. egyptiaca* e *L. crassipora* foram encontradas apenas no Vale do São Francisco (Fig. 2).

Características morfológicas e culturais

Os isolados que foram identificados nas análises filogenéticas a partir do conjunto de dados combinados de ITS e EF1- α também foram utilizados para estudos de morfologia da colônia e características dos conídios. Estruturas anamórficas formaram-se sobre acículas de pinheiro em ágar-água (AA) 2% dentro de 2-4 semanas. Estruturas sexuais (teleomorfo) não foram observadas durante este estudo. Todas as espécies mostraram características morfológicas típicas do gênero, ou seja, uma lenta maturação de conídios com paredes espessas e estrias longitudinais resultantes da deposição de melanina na superfície interna da parede (Punithalingam 1976, 1980). Todos os isolados cresceram rapidamente em BDA, cobrindo toda a superfície das placas de Petri dentro de 3 dias. O micélio aéreo era inicialmente branco, convertendo-a um cinza escuro esverdeado ou acinzentado após 4-5 dias em 25 ° C no escuro. Houve diferenças nas dimensões de conídios entre as espécies de *Lasiodiplodia* (Tabela 2). Os conídios produzidos pelas espécies obtidas no presente estudo foram semelhantes às dimensões de conídios de espécies de *Lasiodiplodia* previamente descritas na literatura, apesar de em todos os casos apresentarem-se ligeiramente maiores (Tabela 2).

Houve diferenças significativas ($P \leq 0.05$) na taxa de crescimento entre as espécies de *Lasiodiplodia* e diferenças na temperatura ótima para o crescimento micelial. A temperatura ótima para o crescimento de *L. iraniensis* (28.2°C) foi significativamente menor do que a de *L. hormozganensis* (31.1 °C), *Lasiodiplodia* sp. (29.9 °C) e *L. theobromae* (29.9 °C). As outras

espécies (*L. crassispora*, *L. egyptiaca* e *L. pseudotheobromae*) apresentaram valores intermediários de temperatura ideal para o crescimento, sem diferir dos extremos observados. As taxas de crescimento micelial de *L. hormozganensis* e *Lasiodiplodia* sp. (49.1 mm / dia) foram significativamente maior do que *L. crassispora*, *L. iraniensis*, *L. pseudotheobromae* e *L. theobromae*, as quais variaram entre 35.9 e 41.4 mm/dia. Apenas *L. egyptiaca* (41.9 mm/dia) não diferiu significativamente dos extremos (Tabela 3).

virulência em frutas

Todos os isolados de *Lasiodiplodia* foram patogênicos em frutos de manga. Sintomas observados na superfície dos frutos apresentaram lesões castanho-escuras com forma aproximadamente circular e de consistência aquosa em torno dos locais de inoculação. Houve diferença significativa ($P \leq 0.05$) na virulência entre as espécies, *L. hormozganensis* e *Lasiodiplodia* sp. foram as mais virulentas, causando as maiores lesões (33.8 mm e 33.6 mm, respectivamente). As espécies menos virulentas foram *L. iraniensis*, *L. pseudotheobromae*, *L. egyptiaca* e *L. crassispora*, com lesões variando de 22.51 a 17.2 mm. O tamanho da lesão induzida por *L. theobromae* diferiu dos extremos e apresentou uma virulência intermediária (Fig. 3).

Discussão

Sete espécies de *Lasiodiplodia* associadas à morte descendente e podridão peduncular da mangueira no Nordeste brasileiro foram identificadas no presente estudo: *L. crassispora*, *L. egyptiaca*, *L. hormozganensis*, *L. iraniensis*, *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae* e *Lasiodiplodia* sp.. Atualmente, várias espécies de *Lasiodiplodia* têm sido relatadas mundialmente na cultura da mangueira (Jacobs 2002; Slippers et al. 2005; Abdollahzadeh et al. 2010; Costa et al. 2010; Sakalidis et al. 2011a; Ismail et al. 2012).

Neste estudo, *L. theobromae* foi a espécie mais frequentemente isolada com 42% e 48% de todos os isolados no Vale do São Francisco e Vale do Assu, respectivamente, indicando que é a espécie mais comum de *Lasiodiplodia* no Nordeste do Brasil. Esta espécie é conhecida por sua distribuição cosmopolita e sua ampla gama de hospedeiros (Punithalingam 1980; Burgess et al. 2006) e é relatada como um importante patógeno associado à doenças de mangueiras nas regiões tropicais e subtropicais (Ploetz et al. 1996; Jacobs 2002; Khanzada et al. 2004; Abdollahzadeh et al. 2010; Costa et al. 2010; Sakalidis et al. 2011a; Ismail et al.

2012). A análise filogenética do clado *L. theobromae* revela baixo suporte nas análises de máxima parcimônia e método Bayesiano, indicando uma grande diversidade intra-específica. Esta variação intraespecífica também foi observada em outros estudos com esta espécie (Pavlic et al. 2004; Begoude et al. 2010; Ismail et al. 2012). Durante os últimos 150 anos, este fungo teve muitos nomes e foi tratado como muitas espécies diferentes. Esta tendência terminou com a monografia de Punithalingam (1976), que reduziu a maioria das espécies para sinonímia de *L. theobromae*. No entanto, recentemente, várias espécies têm sido descritas no complexo *L. theobromae*, principalmente devido à crescente aplicação de dados de sequência de DNA, mas também por causa do aumento das áreas de amostragem relativamente inexploradas, incluindo Venezuela (Burgess et al. 2006), Austrália (Pavlic et al. 2008), Irã (Abdollahzadeh et al. 2010), Egito (Ismail et al. 2012) e Brasil (este estudo).

Lasiodiplodia sp. foi a segunda espécie mais prevalente no Vale do São Francisco, com 17% e a terceira no Vale do Assu, com 19% de todos os isolados. Considerando os dados filogenéticos, os isolados de manga que agruparam com *L. viticola* formaram um subgrupo, fortemente apoiados na análise Bayesiana (1.00), mas com apoio moderado de Máxima parcimônia (64%). Análises adicionais são necessárias para esclarecer este subgrupo. Tal estudo está em andamento e será abordada em um artigo futuro.

As espécies *L. hormozganensis* e *L. iraniensis* foram recentemente descritas no Irã associadas a vários hospedeiros, incluindo manga (Abdollahzadeh et al. 2010). Neste trabalho, *L. iraniensis* foi a terceira espécie mais prevalente, e *L. hormozganensis*, juntamente com *Lasiodiplodia* sp., foram as espécies mais virulentas em manga. Resultado semelhante foi encontrado por Sakalidis et al. (2011a), cujos isolados de *L. hormozganensis* produziram as maiores lesões em ramos de mangueira.

Nesse estudo, *L. crassispora* foi a espécie menos abundante com apenas um isolado. Esta espécie apresenta paredes celulares espessas nos esporos imaturos e as estrias mais largas nos esporos maduros, diferenciando-se das demais espécies (Burgues et al. 2006). Atualmente, a gama de hospedeiros é considerada limitada e esta espécie tem sido relatada apenas em *Santalum album* L., *Eucalyptus urophylla* ST Blake., *V. vinifera*, *Corymbia* sp. Hook., e *Syzygium* spp. Gaertn. (Sakalidis et al. 2011b; Perez et al. 2010; Burgues et al. 2006; Úrbez-Torres et al. 2010). Informações sobre patogenicidade desta espécie são escassas. *L. crassispora* foi isolada como endofítica a partir de *Adansonia gregorii* F. Muell. e os ensaios de patogenicidade demonstraram ser uma espécie patogênica (Sakalidis et al. 2011b). É provável que este fungo também ocorra como endofítico em manga, mas com a capacidade de causar doença. Este estudo representa o primeiro relato desta espécie na cultura da mangueira

no mundo, com comprovada patogenicidade, mas baixa virulência comparado com outras espécies encontradas no Nordeste do Brasil.

Lasiodiplodia pseudotheobromae difere de *L. theobromae* em seus conídios maiores e mais elipsóides. Esta espécie foi descrita a partir de *Acacia*, *Citrus*, *Coffea*, *Gmelina* e espécies de *Rosa* (Alves et al. 2008). Mundialmente, *L. pseudotheobromae* tem sido relatada em diversos hospedeiros, mas no Brasil foi reportada apenas em *Vitis* spp. (Correia et al. 2012). O presente trabalho representa o primeiro relato desta espécie em mangueira no Brasil. Em relação à patogenicidade, Sakalidis et al (2011a) destaca *L. pseudotheobromae* como a espécie mais virulenta em manga na Austrália. Em outro trabalho, um teste de patogenicidade em mudas de mangueira revelaram que alguns isolados de *L. pseudotheobromae* foram mais virulentos do que *L. theobromae* (Ismail et al. 2012). Em *Terminalia catappa* L., esta espécie também foi considerada como sendo a mais agressiva (Begoude et al. 2010). No entanto, neste estudo, em comparação com outras espécies, *L. pseudotheobromae* não apresentou virulência elevada em frutos de manga. Dados de patogenicidade em muitas culturas ainda são escassos, pois por muito tempo esta espécie foi identificada como *L. theobromae*. No entanto, trabalhos recentes sugerem que, como *L. theobromae*, *L. pseudotheobromae* também apresenta distribuição mundial e uma ampla gama de hospedeiros (Abdollahzadeh et al. 2010; Begoude et al. 2010; Sakalidis et al. 2011a; Ismail et al. 2012).

Outra espécie encontrada neste estudo foi *L. egyptiaca*, com apenas dois isolados. Esta espécie foi descrita recentemente em mangueira no Egito. Este é o primeiro relato de *L. egyptiaca* fora do Egito. Testes de patogenicidade realizados por Ismail et al. (2012) mostraram que esta espécie é menos virulenta em manga quando comparada a outras espécies de *Lasiodiplodia*. Neste estudo, *L. egyptiaca* também apresentou níveis baixos de virulência em manga. Maior amostragem é necessário para compreender a gama de hospedeiros, distribuição e variabilidade desta espécie.

Em relação às características culturais, a temperatura ótima para o crescimento micelial para as espécies de *Lasiodiplodia* variou entre 28 e 31 °C. Além disso, todas as espécies neste estudo cresceram a uma temperatura de 10 °C. Este crescimento a baixa temperatura corrobora com o trabalho de Abdollahzadeh et al. (2010) e está em contraste com outros estudos que mostram apenas *L. pseudotheobromae* como capaz de crescer a esta temperatura (Alves et al. 2008; Ismail et al. 2012). Como pode ser observado, as características culturais variam grandemente entre isolados de mesma espécies e são, portanto, de valor limitado para a determinação da espécie.

Todas as espécies encontradas no Nordeste do Brasil têm potencial de causar doenças em mangueira, mas *L. hormozganensis* e *Lasiodiplodia* sp. foram as espécies mais virulentas. Informações sobre estas espécies são escassas por causa de suas recentes descrições. São necessários estudos sobre a epidemiologia e impacto na produção de manga, juntamente com as informações referentes à distribuição, ecologia e gama de hospedeiros de todas as espécies de *Lasiodiplodia* encontradas neste estudo.

A correta identificação de fungos patogênicos de plantas é de extrema importância para a quarentena e medidas de controle, uma vez que as medidas de controle são específicas para cada patógeno. Este estudo encontrou sete espécies de *Lasiodiplodia* associada a morte descendente e podridão peduncular em mangueira. Futuras pesquisas sobre a distribuição e epidemiologia são importantes e podem auxiliar na busca de estratégias eficazes de gestão desses patógenos que representam uma ameaça para a cultura da mangueira no Brasil.

Agradecimentos

Agradecemos à equipe da Plataforma de sequenciamento LABCEN / CCB da Universidade Federal de Pernambuco para o uso de suas instalações. Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 141275/2009-0) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES / BEX 0245/12-7). MPS Câmara, Marcos A. Morais Junior e SJ Michereff também reconhecem a bolsa de pesquisa do CNPq. AJL Phillips agradece a Fundação para a Ciência e a Tecnologia (Portugal) pelo apoio financeiro através de concessão PEst-OE/BIA/UI0457/2011

Referências

Abdollahzadeh J, Javadi A, Mohammadi-Goltapeh E, Zare R, Phillips, AJL (2010) Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia* 25:1–10

Agriannual (2012) Anuário da agricultura brasileira. Informa Economics/FNP South America, São Paulo. 482 p

Al Adawi AO, ML Deadman AK, Al Rawahi AJ, Khan, YM Al Maqbali (2003) *Diplodia theobromae* associated with sudden decline of mango in the Sultanate of Oman. *Plant Pathol* 52:419–419

Alves A, Crous PW, Correia A, Phillips AJL (2008) Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Divers* 28:1–13

Assis JS (2004) Cultivo da mangueira: colheita e pós-colheita. Embrapa Semi-Árido, Petrolina.

<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira/colheita.htm> Accessed 23 June 2012

Batista, AC (1947) Mal do Recife, grave doença da mangueira. Escola Superior de Agricultura de Pernambuco, Recife. 5 p

Begoude BAD, Slippers B, Wingfield MJ, Roux J (2010) Botryosphaeriaceae associated with *Terminalia catappa* in Cameroon, South Africa and Madagascar. *Mycol Prog* 9:101–123

Burgess TI, Barber PA, Mohali S, Pegg G, Beer W de, Wingfield MJ (2006) Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA comparisons and morphology. *Mycologia* 98:423–435

Correia KC, Câmara MPS, Barbosa MAG, Sales Jr. R, Agustí-Brisach C, Gramaje D, García-Jiménez J, Abad-Campos P, Armengol J, Michereff SJ (2012) Fungal species associated with trunk diseases of table grapes in Northeastern Brazil. *Phytopathol Mediterr* 51:427

Costa VSO, Michereff SJ, Martins RB, Gava CAT, Mizubuti ESG, Camara MPS (2010) Species of Botryosphaeriaceae associated on mango in Brazil. *Eur J Plant Pathol* 127:509-519

Crous PW, Slippers B, Wingfield MJ, Rheeder J, Marasas WFO, Philips AJL, Alves A, Burgess T, Barber P, Groenewald JZ (2006) Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Stud Mycol* 55:235–253

Damm U, Crous PW, Fourie PH (2007) Botryosphaeriaceae as potential pathogens of *Prunus* in South Africa, with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. *Mycologia* 99:664–680

Denman S, Crous PW, Taylor JE, Kang JC, Pasco I, Wingfield MJ (2000) An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Stud Mycol* 45:129–140

Farris JS, Källersjö M, Kluge AG, Bult C (1995) Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10:315–319

Freire FCO, Cardoso JE, Viana FMP (2003) Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília. 687 p

Hillis DM, Bull JJ (1993) An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst Biol* 42:182–192

Huelsenbeck JP, Bull JJ, Cunningham CV (1996) Combining data in phylogenetic analysis. *Trends Ecol Evol* 11:152–158

Ismail AM, Cirvilleri G, Polizzi G, Crous PW, Groenewald JZ, Lombard L (2012) *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica*) in Egypt. *Australas Plant Path* 41:649–660

Jacobs R (2002) Characterization of *Botryosphaeria* species from mango in South Africa. Thesis, University of Pretoria. 162 p

Javier-Alva J, Gramaje D, Alvarez LA, Armengol J (2009) First report of *Neofusicoccum parvum* associated with dieback of mango trees in Peru. *Plant Dis* 93:426

Johnson GI (1992) Biology and control of stem end rot pathogens of mango. Thesis, University of Queensland. 530 p

Khazada MA, Lodhi AM, Shahzad S (2004). Pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Fusarium solani* on mango. Pak J Bot 36:181–189

Marques MW, Lima NB, Michereff SJ, Câmara MPS, Souza CRB (2012) First report of mango dieback caused by *Pseudofusicoccum stromaticum* in Brazil. Plant Dis 96:144–145

Page RD (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Comput Appl Biosci 12:357–358

Pavlic D, Slippers B, Coutinho TA, Gryzenhout M, Wingfield MJ (2004) *Lasiodiplodia gonubiensis* sp. nov., a new *Botryosphaeria* anamorph from native *Syzygium cordatum* in South Africa. Stud Mycol 50:313–322

Pavlic D, Wingfield MJ, Barber P, Slippers B, Harder GES, Burgess TI (2008) Seven new species of the Botryosphaeriaceae from baobab and other native trees in Western Australia. Mycologia 100:851–866

Perez CA, Wingfield MJ, Slippers B, Altier NA, Blanchette RA (2010) Endophytic and canker-associated Botryosphaeriaceae occurring on non-native Eucalyptus and native Myrtaceae trees in Uruguay. Fung Divers 41:53-69

Phillips AJL, Alves A, Correia A, Luque J (2005) Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. Mycologia 97:513–29

Phillips AJL (2006) The *Botryosphaeria* site. http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site. Accessed 10 June 2010

Phillips AJL, Alves A, Pennycook SR, Johnston PR, Ramaley A, Akulov A, Crous PW (2008) Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the Botryosphaeriaceae. Persoonia 21:29–55

Ploetz RC, Bensch D, Vázquez A, Colls A, Nagel J, Schaffer B (1996) A re-examination of mango decline in Florida. Plant Dis 80:664–668

Punithalingam E (1976) *Botryodiplodia theobromae*. CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria, No. 519. Commonwealth Mycological Institute, Kew. 2 p

Punithalingam E (1980). Plant diseases attributed to *Botryodiplodia theobromae* Pat. Cramer, Vaduz. 123 p

Rannala B, Yang Z (1996) Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *J Mol Evol* 43:304–311

Rodriguez F, Oliver JF, Marin A, Medina JR (1990) The general stochastic model of nucleotide substitutions. *J Mol Evol* 142:485–501

Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572–1574

Sakalidis ML, Ray JD, Lanoiselet V, Hardy GESTJ, Burgess TI (2011a) Pathogenic Botryosphaeriaceae associated with *Mangifera indica* in the Kimberley Region of Western Australia. *Eur J Plant Pathol* 130:379–391

Sakalidis ML, Hardy GESTJ, Burgess TI (2011b) Endophytes as potential pathogens of the baobab species *Adansonia gregorii*: a focus on the Botryosphaeriaceae. *Fungal Ecol* 4:1–14

Slippers B, Crous PW, Denman S, Coutinho TA, Wingfield BD, Wingfield MJ (2004) Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia* 96:83–101

Slippers B, Johnson GI, Crous PW, Coutinho TA, Wingfield B, Wingfield MJ (2005) Phylogenetic and morphological re-evaluation of the *Botryosphaeria* species causing diseases of *Mangifera indica*. *Mycologia* 97:99–110

Souza JS, Almeida CO, Araújo JLP, Cardoso CEL (2002) Aspectos socioeconômicos. In: Genú PJC, Pinto ACQ (ed) A cultura da mangueira. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília. pp 19–29

Sutton BC (1980) *The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata*. Commonwealth Mycological Institute, Kew. 696 p

Swofford DL (2003) *PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods) Version 4*. Sinauer Associates, Sunderland MA

Tavares SCCH (2002) Epidemiologia e manejo integrado de *Botryodiplodia theobromae* - situação atual no Brasil e no mundo. *Fitopatol Bras* 27:46–52

Tavares SCCH, Menezes M, Choudhury MM (1991) Infecção da mangueira por *Botryodiplodia theobromae* Pat. na região semi-árida de Pernambuco. *Rev Bras Frutic* 13:163–166

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25:4876–4882

Úrbez-Torres JR, Peduto F, Gubler WD (2010) First report of grapevine cankers caused by *Lasiodiplodia crassispora* and *Neofusicoccum mediterraneum* in California. *Plant Dis* 94:785

Úrbez-Torres JR, Peduto F, Striegler RK, Urrea-Romero KE, Rupe JC, Cartwright RD, Gubler W D (2012) Characterization of fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Arkansas and Missouri. *Fungal Divers* 52:169–189

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR protocols, a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, pp 315–322

Young ND, Healey J (2003) GapCoder automates the use of indel characters in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics* 4:6. <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2105-4-6.pdf>

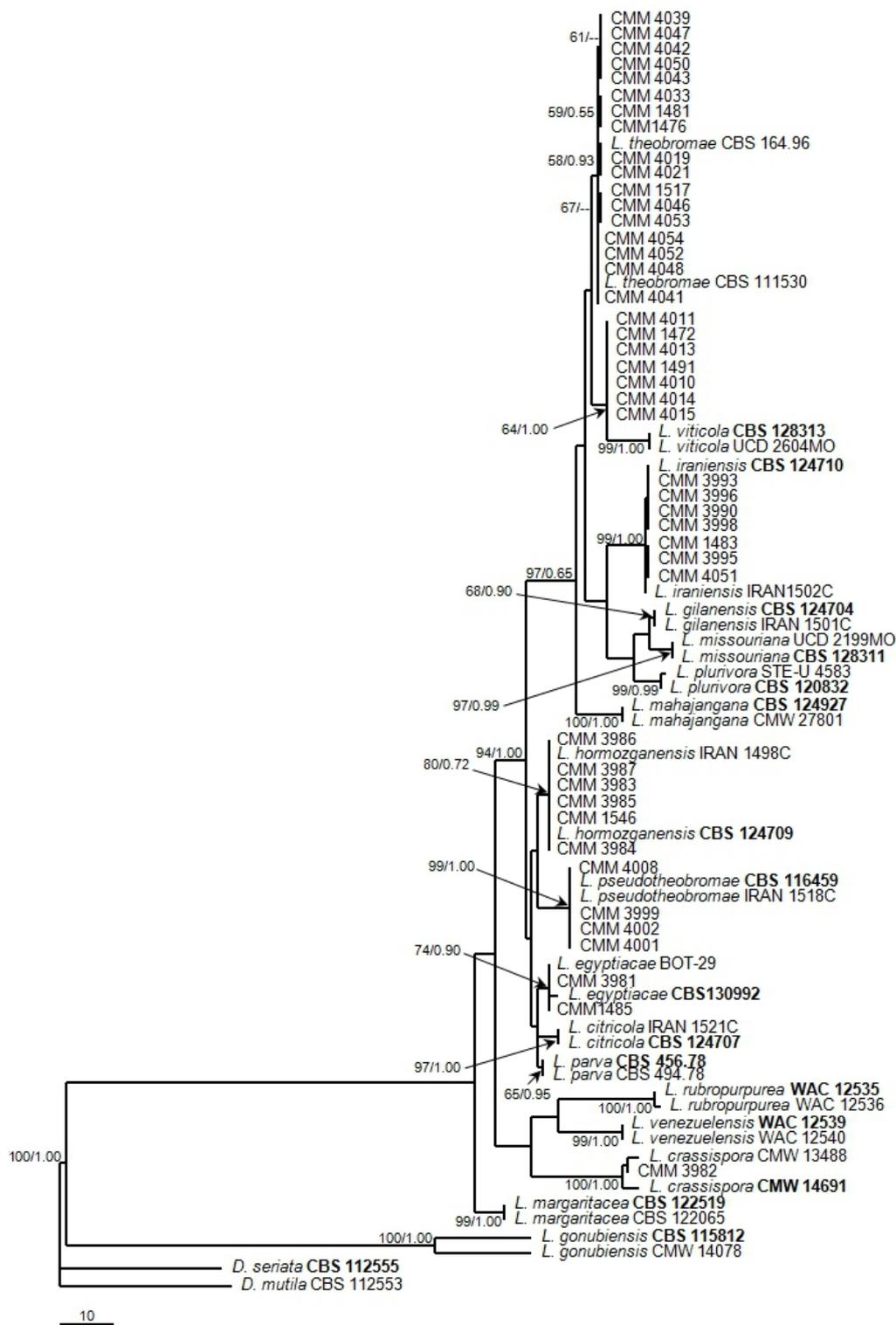


Figura 1 Uma das 3 árvores igualmente parcimoniosas (TL=327; CI=0.758; RI=0.918; HI=0.242) obtidas a partir da análise combinada das sequências de dados da região ITS e EF1- α . Os suportes de Máxima parcimônia e análise Bayesiana são mostrados nos nós.

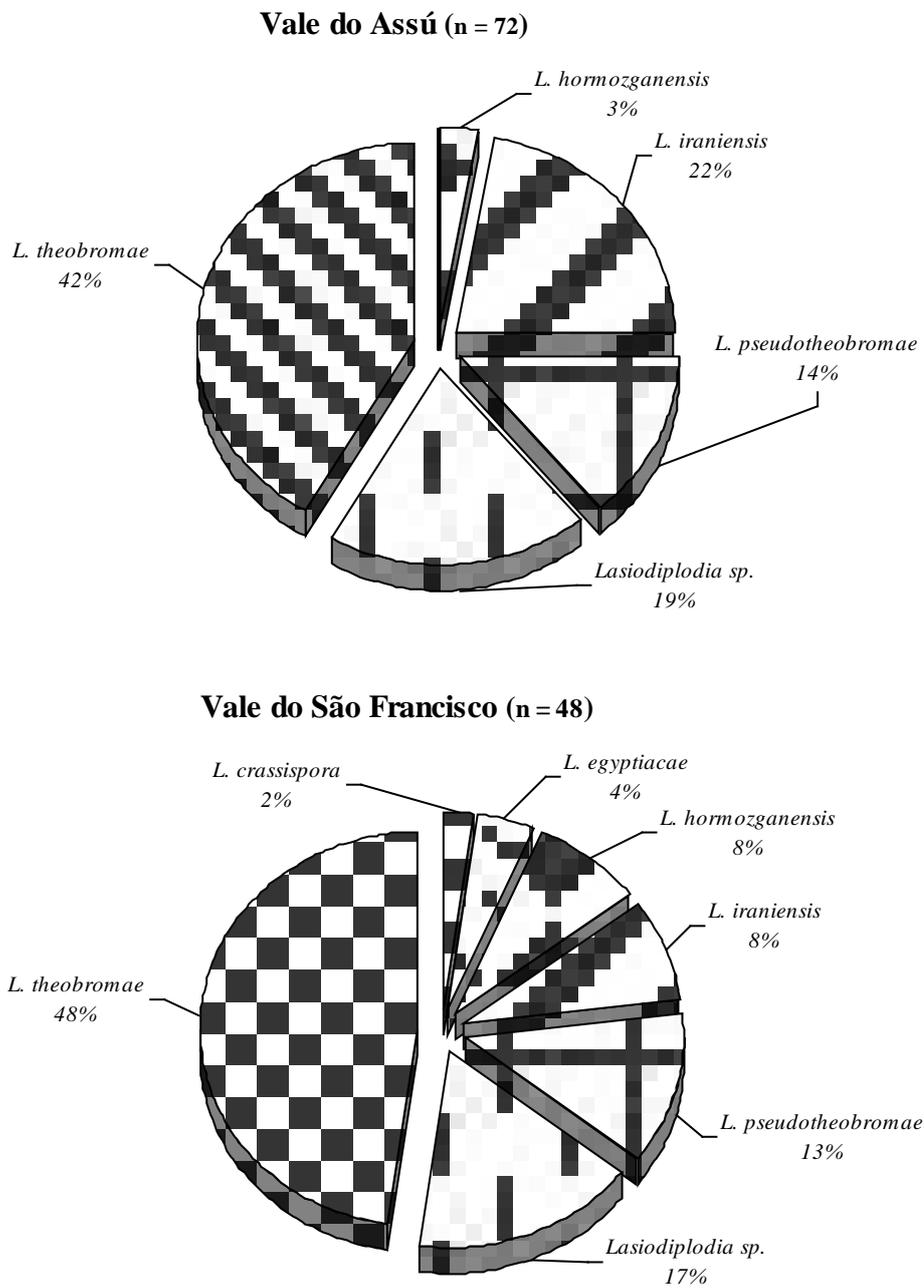


Figura 2 Frequência (%) de espécies de *Lasiodiplodia* associadas à morte descendente e podridão peduncular da mangueira no vale do São Francisco e Vale do Assu no Nordeste do Brasil.

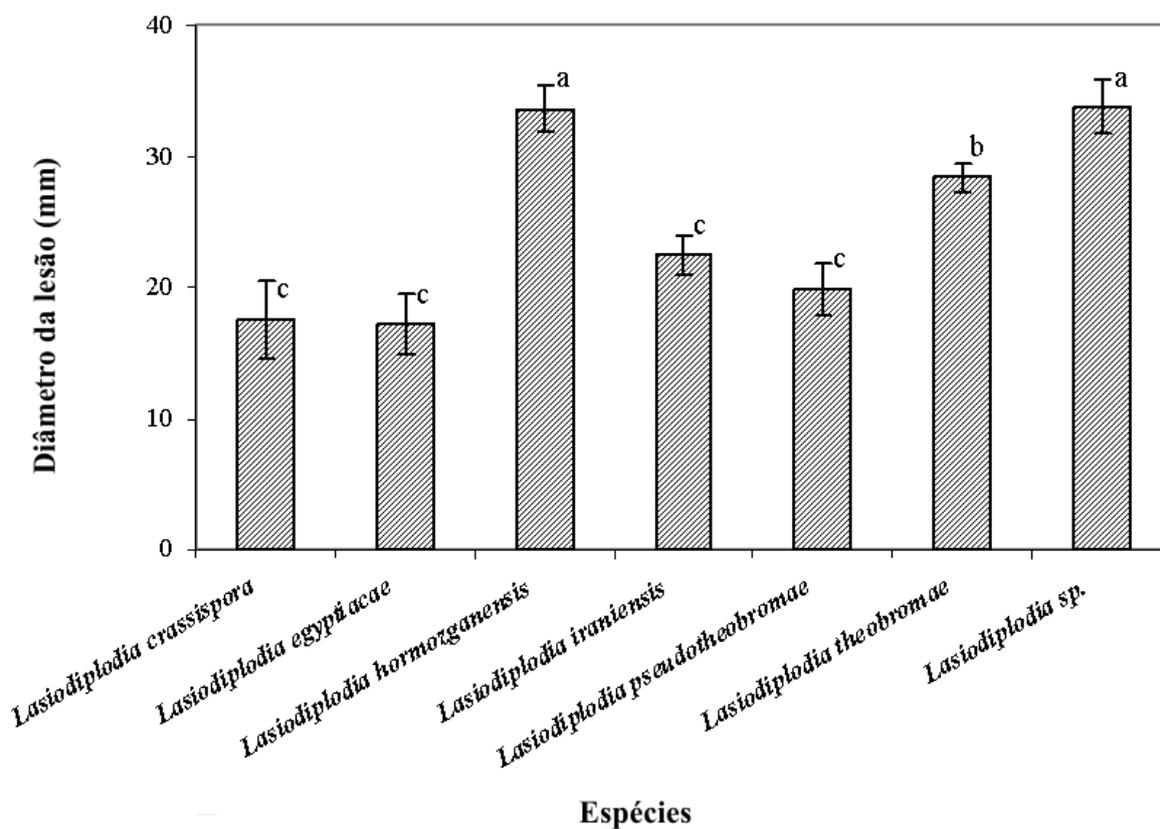


Figura 3 Diâmetro médio da lesão (mm) causada por espécies de *Lasiodiplodia* associadas à morte descendente e podridão peduncular da mangueira no nordeste do Brasil, 72 h após a inoculação em frutos da cultivar Tommy Atkins. Barras acima das colunas correspondem ao erro padrão da média. Colunas com a mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Fisher ($P \leq 0,05$).

Tabela 1 Isolados utilizados nas análises filogenéticas.

Espécie	Isolado ^a	Hospedeiro	Origem	Coletor	Acesso GenBank	
					ITS	EF-1 α
<i>Diplodia mutila</i>	CBS 112553	<i>Vitis vinifera</i>	Portugal	A.J.L. Phillips	AY259093	AY573219
<i>D. seriata</i>	CBS 12555	<i>Vitis vinifera</i>	Portugal	A.J.L. Phillips	AY259094	AY573220
<i>Lasiodiplodia citricola</i>	CBS 124707	<i>Citrus</i> sp.	Irã	J. Abdollahzadeh & A. Javadi	GU945354	GU945340
<i>L. citricola</i>	IRAN 1521C	<i>Citrus</i> sp.	Irã	A. Shekari	GU945353	GU945339
<i>L. crassispora</i>	CMW 13488	<i>Eucalyptus urophylla</i>	Venezuela	S. Mohali	DQ103552	DQ103559
<i>L. crassispora</i>	CMW 14691	<i>Santalum album</i>	Australia	T.I. Burgess & G. Pegg	DQ103550	DQ103557
<i>L. crassispora</i>	CMM 3982	<i>Mangifera indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464058	JX464015
<i>L. egyptiaca</i>	CBS 130992	<i>M. indica</i>	Egito	A.M. Ismail	JN814397	JN814424
<i>L. egyptiaca</i>	BOT 29	<i>M. indica</i>	Egito	A.M. Ismail	JN814401	JN814428
<i>L. egyptiaca</i>	CMM 3981	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464072	JX464035
<i>L. egyptiaca</i>	CMM 1485	<i>M. indica</i>	Brasil	V.S.O. Costa	JX464076	JX464044
<i>L. gilaniensis</i>	IRAN 1501C	desconhecido	Irã	J. Abdollahzadeh & A. Javadi	GU945352	GU945341
<i>L. gilaniensis</i>	CBS 124704	desconhecido	Irã	J. Abdollahzadeh & A. Javadi	GU945351	GU945342
<i>L. gonubiensis</i>	CMW 14078	<i>Syzigium cordatum</i>	Sul da África	D. Pavlic	AY639594	DQ103567
<i>L. gonubiensis</i>	CBS 115812	<i>S. cordatum</i>	Sul da África	D. Pavlic	DQ458892	DQ458860
<i>L. hormozganensis</i>	CBS 124709	<i>Olea</i> sp.	Irã	J. Abdollahzadeh & A. Javadi	GU945355	GU945340

Continuação.

<i>L. hormozganensis</i>	IRAN 1498C	<i>M. indica</i>	Irã	J. Abdollahzadeh & A. Javadi	GU945356	GU945344
<i>L. hormozganensis</i>	CMM 1546	<i>M. indica</i>	Brasil	V.S.O. Costa	JX464077	JX464053
<i>L. hormozganensis</i>	CMM 3983	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464069	JX464033
<i>L. hormozganensis</i>	CMM 3984	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464080	JX464052
<i>L. hormozganensis</i>	CMM 3985	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464084	JX464101
<i>L. hormozganensis</i>	CMM 3986	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464085	JX464022
<i>L. hormozganensis</i>	CMM 3987	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464094	JX464034
<i>L. iraniensis</i>	CBS 124710	<i>Salvadora persica</i>	Irã	J. Abdollahzadeh & A. Javadi	GU945348	GU945336
<i>L. iraniensis</i>	IRAN 1502C	<i>Juglans</i> sp.	Irã	A. Javadi	GU945347	GU945335
<i>L. iraniensis</i>	CMM 3990	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464067	JX464028
<i>L. iraniensis</i>	CMM 1483	<i>M. indica</i>	Brasil	V.S.O. Costa	JX464073	JX464023
<i>L. iraniensis</i>	CMM 3993	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464068	JX464029
<i>L. iraniensis</i>	CMM 3995	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464097	JX464046
<i>L. iraniensis</i>	CMM 3996	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464100	JX464019
<i>L. iraniensis</i>	CMM 3998	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464059	JX464045
<i>L. iraniensis</i>	CMM 4051	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464071	JX464030
<i>L. mahajangana</i>	CBS 124927	<i>Terminalia catappa</i>	Madagascar	J. Roux	FJ900597	FJ900643
<i>L. mahajangana</i>	CMW 27801	<i>T. catappa</i>	Madagascar	J. Roux	FJ900595	FJ900641

Continuação.

<i>L. margaritaceae</i>	CBS 122065	<i>Adansonia gibbosa</i>	Austrália	T.I. Burgess	EU144051	EU144066
<i>L. margaritaceae</i>	CBS 122519	<i>A. gibbosa</i>	Austrália	T.I. Burgess	EU144050	EU144065
<i>L. missouriana</i>	UCD 2199MO	<i>Vitis vinifera</i>	Estados Unidos	K. Striegler & G.M. Leavitt	HQ288226	HQ288268
<i>L. missouriana</i>	CBS 128311	<i>V. vinifera</i>	Estados Unidos	K. Striegler & G.M. Leavitt	HQ288225	HQ288267
<i>L. parva</i>	CBS 494.78	Cassava-field soil	Colômbia	O. Rangel	EF622084	EF622064
<i>L. parva</i>	CBS 456.78	Cassava-field soil	Colômbia	O. Rangel	EF622083	EF622063
<i>L. plurivora</i>	CBS 120832	<i>Prunus salicina</i>	Sul da África	U. Damm	EF445362	EF445395
<i>L. plurivora</i>	STE-U4583	<i>V. vinifera</i>	Sul da África	F. Halleen	AY343482	EF445396
<i>L. pseudotheobromae</i>	CBS 116459	<i>Gmelina arborea</i>	Costa Rica	J. Carranza-Velásquez	EF622077	EF622057
<i>L. pseudotheobromae</i>	IRAN 1518C	<i>Citrus</i> sp.	Irã	J. Abdollahzadeh/A. Javadi	GU973874	GU973866
<i>L. pseudotheobromae</i>	CMM 3999	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464075	JX464018
<i>L. pseudotheobromae</i>	CBS 116459	<i>G. arborea</i>	Costa Rica	J. Carranza-Velásquez	EF622077	EF622057
<i>L. pseudotheobromae</i>	CMM 4001	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464092	JX464039
<i>L. pseudotheobromae</i>	CMM 4002	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464086	JX464020
<i>L. pseudotheobromae</i>	CMM 4008	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464090	JX464016
<i>L. gonubiensis</i>	CMW 14078	<i>S. cordatum</i>	Sul da África	D. Pavlic	AY639594	DQ103567
<i>L. gonubiensis</i>	CBS 115812	<i>S. cordatum</i>	Sul da África	D. Pavlic	DQ458892	DQ458877
<i>L. rubropurpurea</i>	WAC 12535	<i>E. grandis</i>	Áustrália	T.I. Burgess & G. Pegg	DQ103553	DQ103571

<i>Continuação</i>						
<i>L. rubropurpurea</i>	WAC 12536	<i>E. grandis</i>	Áustrália	T.I. Burgess & G. Pegg	DQ103554	DQ103572
<i>L. theobromae</i>	CBS 164.96	Fruit on coral reef coast	Nova Guiné	A. Aptroot	AY640255	AY640258
<i>L. theobromae</i>	CBS 111530	desconhecido	desconhecido	Unknown	AY622074	AY622054
<i>L. theobromae</i>	CMM 1476	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464083	JX464057
<i>L. theobromae</i>	CMM 1481	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464095	JX464021
<i>L. theobromae</i>	CMM 1517	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464060	JX464054
<i>L. theobromae</i>	CMM 4019	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464096	JX464026
<i>L. theobromae</i>	CMM 4033	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464081	JX464032
<i>L. theobromae</i>	CMM 4039	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464065	JX464041
<i>L. theobromae</i>	CMM 4041	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	KC184891	JX464042
<i>L. theobromae</i>	CMM 4042	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464070	JX464017
<i>L. theobromae</i>	CMM 4043	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464087	JX464056
<i>L. theobromae</i>	CMM 4046	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464091	JX464027
<i>L. theobromae</i>	CMM 4047	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464082	JX464025
<i>L. theobromae</i>	CMM 4048	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464093	JX464048
<i>L. theobromae</i>	CMM 4050	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464062	JX464024
<i>L. theobromae</i>	CMM 4052	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464088	JX464050
<i>L. theobromae</i>	CMM 4053	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464089	JX464051

Continuação.

<i>L. theobromae</i>	CMM 4054	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464099	JX464038
<i>L. theobromae</i>	CMM 4021	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464064	JX464047
<i>L. venezuelensis</i>	WAC 12539	<i>Acacia mangium</i>	Venezuela	S. Mohali	DQ103547	DQ103568
<i>L. venezuelensis</i>	WAC 12540	<i>A. mangium</i>	Venezuela	S. Mohali	DQ103548	DQ103569
<i>L. viticola</i>	UCD 2604MO	<i>V. vinifera</i>	Estados Unidos	K. Striegler & G.M. Leavitt	HQ288228	HQ288270
<i>L. viticola</i>	CBS 128313	<i>V. vinifera</i>	Estados Unidos	R.D. Cartwright & W.D. Gubler	HQ288227	HQ288269
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	CMM 1472	<i>M. indica</i>	Brasil	V.S.O. Costa	JX464061	JX464040
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	CMM 1491	<i>M. indica</i>	Brasil	V.S.O. Costa	JX464079	JX464036
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	CMM 4010	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464078	JX464043
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	CMM 4011	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464074	JX464037
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	CMM 4013	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464066	JX464055
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	CMM 4014	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464098	JX464031
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	CMM 4015	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464063	JX464049

^aAs identificações em negrito representam as espécies tipo

Tabela 2 Comparação das dimensões conidiais de espécies de *Lasiodiplodia* encontradas neste estudo

Espécies	Dimensões conidiais (μm)	Razão C/L *	Referências
<i>Lasiodiplodia crassispora</i>	26.61–28.61 \times 16.34–18.84	1.6	Neste estudo
	27–30 \times 14–17	1.8	Burgess et al. 2006
<i>L. egyptiaca</i>	20.69–22.96 \times 10.86–13.14	1.8	Neste estudo
	20–24 \times 11–13	1.8	Ismail et al. 2012
<i>L. hormozganensis</i>	20.62–22.89 \times 11.8–13.09	1.8	Neste estudo
	19.6–23.4 \times 11.7–13.3	1.7	Abdollahzadeh et al. 2010
<i>L. iraniensis</i>	22.51–26.09 \times 12.75–14.97	1.7	Neste estudo
	18.7–23.0 \times 12.1–13.9	1.6	Abdollahzadeh et al. 2010
<i>L. pseudotheobromae</i>	25.07–28.23 \times 13.4–15.6	1.8	Neste estudo
	25.5–30.5 \times 14.8–17.2	1.7	Alves et al. 2008
<i>L. theobromae</i>	24.49–27.49 \times 13.3–14.79	1.8	Neste estudo
	23.6–28.8 \times 13–15.4	1.9	Alves et al. 2008
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	25.1–27.3 \times 14.1–15.0	1.8	Neste estudo

*Razão comprimento/Largura

Tabela 3 Temperatura ideal para o crescimento micelial e taxa de crescimento micelial a 30°C de espécies de *Lasiodiplodia* associadas com morte descendente e podridão peduncular da mangueira no Nordeste do Brasil

Espécie	n	Temperatura ótima (°C) ± DP	Taxa de crescimento micelial (mm/dia) ± DP
<i>Lasiodiplodia crassispora</i>	1	29.0 ± 1.27 ab	35.9 ± 4.20 b
<i>L. egyptiaca</i>	1	29.3 ± 1.27 ab	41.9 ± 4.20 ab
<i>L. hormozganensis</i>	5	31.1 ± 0.57 a	49.1 ± 1.88 a
<i>L. iraniensis</i>	7	28.2 ± 0.48 b	41.4 ± 1.67 b
<i>L. pseudotheobromae</i>	4	29.8 ± 0.64 ab	36.4 ± 2.30 b
<i>L. theobromae</i>	20	29.9 ± 0.28 a	41.3 ± 0.96 b
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	6	29.9 ± 0.52 a	49.0 ± 1.71 a

Média ± Desvio padrão (DP). Valores na mesma coluna seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Fisher ($P \leq 0.05$).

CAPITULO III

Espécies de *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* e *Pseudofusicoccum* associadas à mangueira no Nordeste do Brasil

Espécies de *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* e *Pseudofusicoccum* associadas à mangueira no Nordeste do Brasil

Marília W. Marques^a, Nelson B. Lima^a, Marcos A. Morais Junior^b, Maria Angélica G. Barbosa^c, Sami J. Michereff^a, Alan J.L. Phillips^d, Marcos P.S. Câmara^a

^aDepartamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife, Brasil

^bDepartamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, 50732-970 Recife, Brasil

^cEmbrapa Semi-Árido, 56302-970 Petrolina, Brasil

^dCentro de Recursos Microbiológicos, Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829- 516 Caparica, Portugal

M. P. S. Câmara (✉) - e-mail: mcamara@depa.ufrpe.br

Telephone number: +55 8133206205

Fax number: +55 8133206200

Resumo

Os membros de Botryosphaeriaceae são fungos associados à morte descendente, cancro e podridões em inúmeros hospedeiros, incluindo manga. O objetivo deste estudo foi identificar uma grande coleção de isolados de Botryosphaeriaceae associados à morte descendente e podridão peduncular da mangueira na região semi-árida do Nordeste do Brasil e comparar as espécies em relação ao crescimento micelial, patogenicidade e virulência. Um total de 115 isolados foram amostrados e através de dados de sequências de DNA (ITS, BT e EF1- α) e características morfológicas, sete espécies foram identificadas: *Botryosphaeria dothidea*, *B. mamane*, *Fusicoccum fabicercianum*, *Neofusicoccum parvum*, *Neofusicoccum* sp., *Neoscytalidium dimidiatum* e *Pseudofusicoccum stromaticum*. *B. dothidea* e *P. stromaticum* foram as espécies mais frequentemente isoladas, representando 37% e 33%, de todos os isolados, respectivamente. *B. mamane* representa o primeiro relato causando doenças em mangueira no mundo. Houve diferenças significativas entre as espécies de Botryosphaeriaceae obtidas neste estudo em relação à temperatura ótima e taxas de crescimento micelial. Todas as espécies foram patogênicas em frutos de manga. E houve diferenças significativas na virulência entre as espécies. *Ne. dimidiatum* e *N. parvum* foram as espécies mais virulentas, enquanto *P. stromaticum* apresentou as menores lesões em frutos de manga.

Palavras-chave: Botryosphaeriaceae, morte descendente, podridão peduncular, *Mangifera indica*, patogenicidade, filogenia

Introdução

O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de frutas tropicais do mundo, sendo a manga (*Mangifera indica* L.) uma das frutas mais exportadas. A maior parte da manga cultivada para o mercado internacional é proveniente do Vale do São Francisco, região localizada na parte Nordeste do país. Em 2010, a produção nacional foi de 1.197 milhões de toneladas e a área plantada atingiu 75.416 hectares, gerando cerca de 334 milhões de dólares. (Agrianual 2012).

A cultura da mangueira é afetada por uma variedade de pragas e patógenos. Entre a vasta gama de patógenos fúngicos que causam impacto na produção de manga no Brasil estão os membros da Botryosphaeriaceae (Costa et al. 2010). O primeiro relato dessas espécies

associadas à cultura da mangueira no Brasil ocorreu em 1947 (Batista 1947) e, desde então, tornaram-se cada vez mais importantes (Tavares 2002; Tavares et al 1991).

As espécies pertencentes a família Botryosphaeriaceae apresentam distribuição mundial e ocorrem em uma grande variedade de plantas hospedeiras, incluindo monocotiledôneas, dicotiledôneas, gimnospermas e angiospermas, nas quais são encontradas como saprófitas, parasitas e fungos endofíticos (Slippers e Wingfield 2007; von Arx 1987). Estes fungos estão relacionados a diferentes sintomas, tais como, cancos, podridões em frutos, morte descendente e gomose (Von Arx, 1987).

Espécies de Botryosphaeriaceae são geralmente identificadas pelas características morfológicas de seus anamorfos uma vez que os teleomorfos são raramente encontrados na natureza. Os caracteres morfológicos dos anamorfos, considerados úteis para sua delimitação taxonômica, incluem a morfologia dos conídios como ornamentação, forma, tamanho, cor, septação, espessura e textura da parede, entre outros (Slippers e Wingfield 2007). No entanto, devido à sobreposição dessas características morfológicas têm-se enfatizado a importância da utilização de métodos moleculares para identificação dessas espécies (De Wet et al. 2008).

A taxonomia dos anamorfos da família Botryosphaeriaceae é complexa e mudanças consideráveis têm ocorrido recentemente. Historicamente, mais de 18 gêneros de anamorfos foram associados à *Botryosphaeria* Ces. & De. Not. Em um amplo estudo usando a região 28S do rDNA e incluindo a grande diversidade morfológica de Botryosphaeriaceae foi verificado que *Botryosphaeria* é composto por várias linhagens distintas que correspondem a gêneros individuais. Apenas *B. dothidea* (Moug.: Fr) Ces. & Not De. e *B. corticis* (Demaree & Wilcox MS) Arx & E. Müll. foram mantidas em *Botryosphaeria*, enquanto as outras espécies de *Fusicoccum* Corda foram transferidos para o novo gênero *Neofusicoccum* Crous, Slippers & A.J.L. Phillips. Os gêneros *Pseudofusicoccum* (Mohali, Slippers & M.J. Wingf.) Mohali, Slippers & M.J. Wingf. e *Neoscytalidium* Crous & Slippers também foram descritos neste estudo (Crous et al. 2006).

O uso de ferramentas moleculares vem provocando avanços significativos na identificação de Botryosphaeriaceae e inúmeras espécies têm sido descritas nos últimos tempos, tanto em vegetação nativa, quanto em diversas culturas de importância econômica (Luque et al. 2005; Phillips et al. 2005; Phillips et al. 2002; Slippers et al. 2004a, b). Pavlic et al (2008) identificaram sete novas espécies em vegetação nativa na Austrália. Três novas espécies de *Neofusicoccum* foram identificados por Pavlic et al. (2009a, b) dentro do complexo *N. parvum* / *N. Ribis* na África do Sul baseado em uma análise multigênica. Em 2010, duas novas espécies, *N. batangarum* Begoude, Jol. Roux, Slippers e *Lasiodiplodia*

mahajangana Begoude, Jol. Roux, Slippers foram descritos em *Terminalia catappa* L (Begoude et al. 2010). Recentemente, *Fusicoccum ramosum* Pavlic, Burgess, M.J. Wingfield (Pavlic et al. 2008), *F. atrovirens* J.W.M. Mehl & B. Slippers (Mehl et al. 2011), *F. fabicercianum* S.F. Chen, D. Pavlic, M.J. Wingf. & X.D. Zhou (Chen et al. 2011) e *B. schariffi* Abdollahzadeh, Zare, A.J.L. Phillips (Abdollahzadeh, et al. 2013) foram descritos em *Botryosphaeria*. Em relação ao gênero *Lasiodiplodia*, 16 novas espécies foram relatadas desde 2004. (Pavlic et al. 2004, 2008; Burgess et al, 2006; Damm et al. 2007; Alves et al. 2008; Begoude et al. 2010; Abdollahzadeh et al. 2010; Urbez-Torres et al. 2012; Ismail et al. 2012). O aumento do número de espécies é reconhecido não só devido a utilização de dados filogenéticos, mas também por causa de regiões geográficas relativamente pouco exploradas.

Várias espécies de Botryosphaeriaceae são relatadas causando doenças em mangueira no mundo todo: *N. parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *N. mangiferae* (Syd. & P. Syd.) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *B. dothidea* e *L. theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl são os patógenos mais comuns (Slippers et al. 2005; Javier-Alva et al. 2009; Costa et al. 2010). Recentemente, quatro novas espécies de *Lasiodiplodia*, *B. schariffi* e *N. mediterraneum* Crous, M.J. Wingf. & A.J.L. Phillips foram associadas à este hospedeiro no Irã (Abdollahzadeh et al. 2010, 2013). Na Austrália, *Neoscytalidium novaehollandiae* Pavlic, Burgess, M.J. Wingfield, *Ne. dimidiatum* (Penz.) Crous & Slippers, *Pseudofusicoccum adansoniae* Pavlic, Burgess, M.J. Wingfield, *P. ardesiacum* Pavlic, Burgess, M.J. Wingfield, *P. kimberleyense* Pavlic, Burgess, M.J. Wingfield, *L. iraniensis* Abdollahzadeh, Zare & A.J.L. Phillips e *L. pseudotheobromae* A.J.L. Phillips, A. Alves & Crous foram isoladas de mangueira (Sakalidis et al. 2011; Ray et al. 2010). Em 2012, uma nova espécie *L. egyptiacae* A.M. Ismail, L. Lombard & Crous, *L. theobromae* e *L. pseudotheobromae* foram descritas no Egito a partir de sintomas de morte descendente (Ismail et al. 2012).

No Brasil, a morte descendente e a podridão peduncular são doenças atribuídas principalmente à *L. theobromae*. No entanto, estudos recentes utilizando métodos moleculares revelaram a presença de espécies como *Botryosphaeria dothidea*, *Fusicoccum aesculi* e *Pseudofusicoccum stromaticum* (Mohali, Slippers & M.J. Wingf.) Mohali, Slippers & M.J. Wingf. envolvidas com essas doenças no Nordeste do Brasil (Costa et al. 2010; Marques et al. 2012).

Considerando o número de espécies associadas à cultura da mangueira no mundo, parece provável que existam outras espécies envolvidas com este hospedeiro no Brasil. Portanto, o objetivo deste estudo foi combinar caracteres morfológicos e dados de sequências de DNA (ITS, BT e EF1- α) para caracterizar um grande número de isolados e identificar as

espécies de Botryosphaeriaceae associadas à *Mangifera indica* no Nordeste Brasil e comparar estas espécies em relação ao seu crescimento micelial, patogenicidade e virulência.

Materiais e Métodos

Coleta e isolamento fúngico

Entre os meses de abril e junho de 2010, ramos e frutos com sintomas de morte descendente e podridão peduncular foram coletados de plantações comerciais de mangueira no Vale do São Francisco, região Nordeste do Brasil. Os tecidos de plantas foram desinfestados em etanol a 70% durante 30 s e hipoclorito de sódio 1.5% durante 1 min. As amostras foram lavadas em água destilada esterilizada durante 30 s e secas em papel toalha esterilizado. Pequenos fragmentos (4-5 mm) de tecido foram obtidos a partir da margem entre o tecido necrótico e aparentemente saudável e plaqueados em batata dextrose ágar (BDA) (Acumedia, Lansing, EUA) modificado com 0.5 g/l de sulfato de estreptomicina (BDAs). As placas foram incubadas a 25 °C no escuro por 3 a 4 dias e colônias fúngicas emergidas dos fragmentos com características de espécies de Botryosphaeriaceae como descrito no site *Botryosphaeria* (http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site/) foram repicadas para novas placas contendo BDA e incubadas à 25 °C no escuro, com observações aos 3, 5 e 15 dias. Para obtenção de isolados monospóricos, picnídios foram obtidos em meio ágar água 2% - AA com acículas de pinheiro esterilizadas como substrato após três semanas de incubação a 25 °C sob fotoperíodo de 12 h com luz próxima à ultravioleta (Slippers et al. 2004). Um único picnídio foi retirado de cada isolado sob microscópio estereoscópico (Zeiss Stemi DV4; Carl Zeiss, Berlin, Germany) e macerado em água destilada esterilizada para produção de uma suspensão de conídios. Uma alíquota dessa suspensão foi distribuída em BDA e incubada a 28°C no escuro por 24 h. Um único isolado monospórico foi recuperado de cada amostra individual e transferido para uma nova placa contendo BDA. Os isolados obtidos foram armazenados em tubos de BDA a 5 °C no escuro.

Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

Uma porção do gene do fator de alongação (EF1- α) foi sequenciado para os 115 isolados obtidos da cultura da mangueira. A partir daí, isolados representativos de cada espécie foram selecionados, totalizando 28 isolados, os quais foram sequenciados com a

sequência completa do ITS do rDNA e seis isolados de *Neofusicoccum* foram sequenciadas com a sequência parcial da β -tubulina (Tabela 1). Os genes foram usados para esclarecer as relações entre isolados obtidos neste estudo. Utilizando uma ponta de pipeta esterilizada de 10 μ l, uma pequena quantidade de micélio aéreo foi raspada da superfície de uma cultura de 5 dias de idade em BDA à 25 °C e o DNA genômico foi extraído utilizando o AxyPrep™ Multisource Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen Scientific Inc. , Union City, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A região ITS foi amplificada utilizando os oligonucleotídeos ITS1 e ITS4 (White et al. 1990), como descrito por Slipper et al (2004b) e o gene EF1- α foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos EF1-688F e EF1-1251R (Alves et al. 2008) como descrito por Phillips et al. (2005).

Cada reação em cadeia de polimerase (PCR) foi realizada em um volume final de 50 μ l contendo 21 μ l de água, 1 μ l de DNA, 1.5 μ M de cada primers e 25 μ l de PCR Master Mix (2X) (0.05 u μ l-1 de Taq DNA polimerase, reaction buffer, 4 mM MgCl₂, 0.4 mM de cada dNTP; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). As reações de PCR foram realizadas em termociclador (Biocycler MJ 96; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os produtos amplificados de PCR foram separados por eletroforese em géis de agarose a 1.5% em Tris-acetato 1.0 \times ácido EDTA (TAE) e foram fotografadas sob luz UV, após coloração com brometo de etídio (0.5 μ g/ml) durante 1 min. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit de limpeza da AxyPrep™ PCR (Axygen) seguindo as instruções do fabricante. As regiões ITS e EF1- α foram sequenciadas em ambas as direções, utilizando um ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) na Plataforma de Sequenciamento LABCEN / CCB na Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Brasil).

Análises filogenéticas

Sequências foram editadas utilizando o programa Chromas v. 2.32 (Technelysium Pty Lda., Brisbane, Austrália), alinhadas com ClustalX v. 1.83 (Thompson et al. 1997) e ajustadas manualmente quando necessário. Informações filogenéticas contendo indels (gaps) foram incorporadas às análises filogenéticas conforme descrito por Young and Healy (2003). O teste de homogeneidade de partição determinou a possibilidade de combinar o conjunto de dados da região ITS e EF1- α (Farris et al. 1995; Huelsenbeck et al. 1996). Sequências de espécies de Botryosphaeriaceae obtidas no GenBank foram incluídas nas análises (Tabela 1).

As análises filogenéticas foram realizadas com o programa PAUP v. 4.0b10 (Swofford 2003) para a máxima parcimônia e MrBayes v. 3.0b4 (Ronquist e Huelsenbeck 2003) para análises bayesianas.

As análises de Máxima-parcimônia foram realizadas utilizando a opção de busca heurística com 1000 taxa de adição aleatória e árvore com bissecção e reconexão (TBR) com o algoritmo “branch-swapping”. A robustez das árvores mais parcimoniosas foi avaliada a partir de 1000 replicações de bootstrap (Hillis and Bull 1993). Outras medidas foram utilizadas como índice de consistência (CI), índice de retenção (RI) e índice de homoplasia (HI).

As análises Bayesianas foram realizadas empregando o método de Monte Carlo via Cadeia de Markov. O modelo evolutivo general time-reversible (Rodriguez et al. 1990), incluindo a estimativa dos sítios invariáveis e assumindo a distribuição gamma discreta com seis categorias de taxa (GTR+ Γ +I) foi utilizado. Quatro cadeias MCMC foram realizadas simultaneamente, iniciando a partir de árvores aleatórias por 1.000.000 de gerações. As árvores foram amostradas a cada 100 gerações para um total de 10.000 árvores. As primeiras 1.000 árvores foram descartadas como a fase de burn-in de cada análise. As probabilidades posteriores (Rannala and Yang 1996) foram determinadas a partir de uma árvore consenso da regra da maioria gerada com as 9.000 árvores remanescentes. Esta análise foi repetida três vezes iniciando de árvores aleatórias diferentes para assegurar que árvores do mesmo espaço de árvore tenham sido amostradas durante cada análise.

Árvores filogenéticas foram visualizadas com Treeview (Page 1996). Sequências obtidas neste estudo foram depositadas no GenBank e o alinhamento no TreeBASE (S13281). Isolados representativos de diferentes espécies de Botryosphaeriaceae obtidos neste estudo foram depositados na Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos "Prof Menezes Maria" (CMM) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Recife, Brasil).

Caracterização morfológica

Os isolados identificados nas análises filogenéticas foram utilizados para os estudos de morfologia de colônia e características de conídios. A morfologia das colônias dos isolados foi avaliada durante 15 dias de crescimento em BDA a 25 °C no escuro. Características de conídios foram observadas em meio AA 2% contendo acículas de pinheiro autoclavadas e incubadas em condições próximas da luz ultravioleta, tal como descrito anteriormente.

O comprimento e a largura de 50 conídios por isolado foram mensurados usando microscópio composto (Olympus BX41; Olympus Co., Tokyo, Japão) com câmara digital (Samsung SDC-415; Samsung Co., Seoul, Korea) e dispositivo de imagem (Motic Image Plus 2.0; Motic Group Co., Beijing, China). A média e o desvio padrão das medidas dos conídios, incluindo a proporção comprimento e largura (C/L), foram obtidos usando o programa STATISTIX v. 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA).

Os isolados também foram utilizados para determinar o efeito da temperatura sobre o crescimento micelial das diferentes espécies. Um disco de BDA de 3 mm de diâmetro, contendo estruturas fúngicas dos isolados, foi retirado da borda da colônia com 3 dias de crescimento e colocado no centro de uma placa de petri (90mm de diâmetro) contendo BDA. Quatro repetições de cada isolado foram incubadas à temperaturas que variam entre 5 a 35 °C em intervalos de 5 °C no escuro. Após um período de incubação de 3 dias, o diâmetro das colônias (mm) foi medido em duas direções perpendiculares. O experimento foi feito duas vezes. Os valores dos diâmetros das colônias versus temperatura foram ajustados para curva de regressão usando modelo polinomial cúbico ($y = a + bx + cx^2 + dx^3$) e a temperatura ótima foi estimada usando modelo de regressão e o sumário numérico com o auxílio do programa TableCurve™ 2D v. 5.01 Software (SYSTAT Software Inc., Chicago, IL, USA). A temperatura ótima foi definida como a temperatura que apresentou maior crescimento radial.

Os diâmetros da colônia a 30 °C foram usadas para calcular a taxa de crescimento radial (mm/dia). Análises de variância de um fator (ANOVA) foram conduzidas com os dados obtidos pela temperatura ótima e taxa do crescimento micelial e as médias comparadas pelo teste da diferença mínima significativa de Fisher (LSD) ao nível de significância de 5%, utilizando STATISTIX v 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, USA).

Patogenicidade e virulência em frutas

Os isolados utilizados na caracterização morfológica foram selecionados para este teste. Manga da cultivar Tommy Atkins no estágio três de maturação (Assis 2004) foram lavados em água de torneira, desinfestados em etanol a 70% durante 1 minuto e hipoclorito de sódio a 1.5% durante 5 min, em seguida, lavadas em água destilada esterilizada. Após serem secos, os frutos foram mantidos em umidade relativa próxima de 100% pela deposição em bandejas plásticas forradas com quatro camadas de papel toalha umedecidas com água. Cada fruto foi colocado sobre uma tampa de placa de Petri esterilizada, para evitar contato direto com a água. Cada fruto foi ferido na região mediana, ferindo com a ponta de quatro alfinetes

esterilizados através da superfície da casca a uma profundidade de 3 mm. Sobre cada ferimento foi depositado um disco de BDA de 5 mm de diâmetro, contendo estruturas fúngicas dos isolados, extraído da borda da colônia com 3 dias de idade crescidos em BDA a 25 °C no escuro. Como testemunha foram utilizados frutos contendo discos de BDA sem crescimento fúngico depositados sobre os ferimentos. As bandejas foram colocadas em sacos de plástico e incubada a 25 °C no escuro. Os sacos de plástico e o papel toalha foram removidos após 48 horas e os frutos foram mantidos à mesma temperatura. Os isolados foram considerados patogênicos quando a área lesionada ultrapassou o diâmetro de 5 mm inicial. A virulência dos isolados foi avaliada pela medição do comprimento da lesão após 5 dias da inoculação em duas direções perpendiculares, em cada fruto. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições por tratamento (isolado) e um fruto por repetição. O experimento foi realizado duas vezes. Diferenças na virulência causadas por espécies de Botryosphaeriaceae foram determinadas por uma análise de variância e as médias comparadas pelo teste de LSD ao nível de significância de 5% utilizando STATISTIX.

Resultados

Análises filogenéticas

Um total de 115 isolados foi obtido a partir de ramos e frutos de mangueira no Nordeste do Brasil. Desse total, sete espécies de Botryosphaeriaceae foram identificadas a partir da análise filogenética da sequência parcial do fator de alongação (EF1- α): *Botryosphaeria dothidea*, *B. mamane*, *N. parvum*, *Fusicoccum fabicercianum*, *Neofusicoccum* sp., *Neoscytalidium dimidiatum* e *Pseudofusicoccum stromaticum*. Para confirmar essas identidades, representantes de cada espécie, totalizando 28 isolados, foram sequenciados com a região do espaço interno transcrito (ITS) e seis isolados de *Neofusicoccum* foram sequenciados também com a sequência parcial do gene β -tubulina. As reações de PCR foram realizadas com sucesso para os três pares de oligonucleotídeos selecionados. O produto de PCR da região ITS foi de aproximadamente 580 pares de base e dos genes β -tubulina e EF1- α foram de aproximadamente 450 pares de base.

Neste estudo, três árvores filogenéticas foram geradas. A análise filogenética de máxima parcimônia do conjunto de dados combinados do ITS e EF1- α de *Botryosphaeria* e *Neoscytalidium* apresentou 827 caracteres. Desses, 543 foram constantes, 11 variáveis e não

informativos e 273 caracteres informativos para parcimônia (TL = 387; IC = 0.902; IR = 0.965; HI = 0.098). A busca heurística gerou 16 árvores igualmente parcimoniosas com semelhantes topologias, das quais uma é apresentada (Fig. 1). Nesta árvore, os isolados de manga se agruparam em três diferentes clados de espécies conhecidas. Os isolados CMM3928, CMM3925, CMM3923, CMM3899 e CMM3905 agruparam com *F. fabricercianum*, apoiados por um suporte de 95 e 83% para análises de Máxima Parcimônia e Método Bayesiano, respectivamente. Os isolados CMM3937, CMM3938, CMM3940 foram agrupados juntamente com a espécie *B. dothidea*. Os Isolados CMM3941 e CMM1390 agruparam dentro de *B. mamane*, com um elevado suporte (MP / MB: 100/1.0), enquanto CMM3979 e CMM3980 residiram juntamente com *Ne. dimidiatum*.

O conjunto de dados combinados de ITS e EF1- α do gênero *Neofusicoccum* continha 10 isolados deste estudo e 40 sequências obtidas do GenBank. A análise de parcimônia mostrou que dos 766 caracteres, 549 foram constantes, 14 variáveis e não informativos e 203 informativos. (TL = 246; IC = 0.786; IR = 0.925; HI = 0.214). A busca heurística gerou 87 árvores igualmente parcimoniosas com topologias semelhantes, das quais uma é apresentada (Fig. 2). Neste conjunto de dados, os isolados do Brasil agruparam em dois clados. A maioria dos isolados (CMM3945, CMM3944, CMM1271, CMM3943, CMM1291, CMM1465) se agrupou em *N. parvum* (CBS 116459), apoiado por suporte de 96% na Máxima Parcimônia e 100% para o método bayesiano. Os isolados CMM1285, CMM1338 e CMM1269 não foram claramente resolvidos. Portanto, para resolver este clado, o gene β -tubulina foi adicionado e uma nova árvore foi gerada. O conjunto de dados concatenados de ITS, β -tubulina e EF1- α do gênero *Neofusicoccum* apresentou 1.184 caracteres, dos quais 1087 foram constantes, 27 variáveis e não informativos e 70 informativos para parcimônia (TL = 109; IC = 0.908; IR = 0.93; HI = 0.092). Os Isolados CMM1285, CMM1338 e CMM1269 apresentaram um bom suporte (MP / MB: 76/0.99), representando uma nova espécie filogenética. Os demais isolados agruparam com *N. parvum* (MP / MB: 73/0.98) (Fig. 2). Os dados moleculares combinados de ITS e EF1- α do gênero *Pseudofusicoccum* apresentaram 864 caracteres, dos quais 521 foram constantes, 308 variáveis e não informativos e 35 informativos (TL = 364 passos; IC = 0.975; IR = 0.920; HI = 0.025). A busca heurística gerou apenas uma árvore (Fig. 3). Neste conjunto de dados, os isolados de manga agruparam com *P. stromaticum* com 51% e 94% de suporte para a análise de Máxima Parcimônia e Método Bayesiano, respectivamente.

O resultado deste estudo demonstra que *B. dothidea* (37%) e *P. stromaticum* (33%) foram os fungos mais prevalentes isolados de mangueira no Vale do São Francisco, seguido

por *N. parvum* (9%), *F. fabicercianum* (7%), *Neofusicoccum sp.* (10%), *Neoscytalidium dimidiatum* (2%) (Fig. 4).

Morfologia e características culturais

Os isolados que foram utilizados nas análises filogenéticas foram utilizados para o estudo de morfologia da colônia e características de conídios. Isolados de *Neofusicoccum sp.* não produziram conídios, não sendo possível descrever a nova espécie. Os conídios dos isolados de *Ne. dimidiatum* foram elipsóide a ovóide, hialino, inicialmente asseptados, tornando-se castanho-escuros com 2-septos com a maturidade, com uma célula central mais escura do que as células da extremidade e compostas por cadeias de artroconídios. Todos os outros isolados produziram estruturas anamórficas sobre acículas de pinheiro em ágar água (AA) dentro de 2-4 semanas. Estruturas sexuais (teleomorfo) não foram observadas durante este estudo. As demais espécies produziram conídios hialinos, fusóides, alongados e de paredes finas. Todos os isolados cresceram rapidamente em BDA, cobrindo toda a superfície das placas de Petri em 4 dias. O micélio aéreo era inicialmente branco, convertendo-se para cinza escuro-esverdeado ou acinzentado, após 4-5 dias a 25 °C. As dimensões dos conídios produzidos pelas espécies obtidas neste estudo foram semelhantes às dimensões conidiais das espécies previamente descritas na literatura (Tabela 2)

Houve diferenças significativas ($P \leq 0,05$) na taxa de crescimento entre as espécies obtidas neste estudo e diferenças na temperatura ótima para o crescimento micelial. A temperatura ótima variou entre 25.4 a 30.8 °C. *Ne. dimidiatum* (30.8 °C) e *P. stromaticum* (30.4 °C) apresentaram as maiores temperaturas, enquanto *N. parvum* apresentou a menor temperatura ótima para o crescimento micelial, diferindo significativamente das demais. A taxa de crescimento micelial de *Ne. dimidiatum* (41.2 mm/dia) foi significativamente maior, diferindo das demais espécies, que variaram de 29.5 a 19.7 mm/dia. *B. dothidea* e *F. fabicercianum* apresentaram as menores taxas de crescimento micelial 21.9 e 19.7 mm/dia, respectivamente (Tabela 3).

Patogenicidade e virulência em frutos

Todas as espécies de *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* e *Pseudofusicoccum* coletadas neste estudo foram patogênicas em manga. Inoculações resultaram em lesões de cor castanho escuros aproximadamente circulares de consistência

aquosa sobre a superfície do fruto. A análise de variância mostrou que houve diferença significativa ($P \leq 0.05$) de virulência entre as espécies. *Ne. dimidiatum*, *N. parvum* e *B. dothidea* foram as espécies mais virulentas. Os isolados de *P. stromaticum* produziram as menores lesões em frutos. O comprimento das lesões produzidas por *B. mamane*, *F. fabicercianum* e *Neofusicoccum* sp. apresentaram virulência intermediária (Fig. 5).

Discussão

Neste estudo, sete diferentes espécies de Botryosphaeriaceae distribuídas em quatro gêneros foram identificadas a partir da cultura da mangueira no Nordeste do Brasil. Estas identificações foram apoiadas por características morfológicas e dados de sequências de DNA (ITS, BT e EF1- α).

No mundo, há vários estudos que relatam espécies de Botryosphaeriaceae causando doenças em mangueira, anteriormente as espécies mais comumente encontradas eram *Botryosphaeria dothidea*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Neofusicoccum parvum* e *N. mangiferum*. Atualmente, diversas espécies estão associadas a este hospedeiro (Sakalidis et al. 2011; Ray et al. 2010; Abdollahzadeh et al. 2010, 2013, Ismail et al. 2012; Marques et al. 2012).

No Nordeste brasileiro, a expansão da área cultivada e a intensificação das técnicas de manejo na cultura da mangueira têm favorecido a ocorrência de doenças tais como a podridão peduncular e morte descendente. Estas doenças foram associadas exclusivamente ao patógeno *L. theobromae* e, posteriormente *N. parvum*, *B. dothidea* e *P. stromaticum* foram relatadas (Costa et al. 2010; Marques et al. 2012). Neste estudo, mais quatro espécies foram encontradas associadas à essas doenças, incluindo: *B. mamane* D.E. Gardner, *Fusicoccum fabicercianum*, *Neofusicoccum* sp. e *Neoscytalidium dimidiatum*. Todas estas espécies representam o primeiro relato na cultura da mangueira no Brasil.

As espécies *B. dothidea* e *N. parvum* são frequentemente associadas à doenças da mangueira no mundo todo (Slippers et al. 2005) e geralmente são encontradas em regiões temperadas (Burgess et al. 2006; Pavlic et al. 2007; Sakalidis et al. 2011). Pesquisa recente relatou *B. dothidea* em uma ampla distribuição no Irã, sendo encontrada em uma variedade de climas que vão desde regiões temperadas e úmidas para regiões semi-áridas e tropicais (Abdollahzadeh et al. 2013). No presente trabalho, *B. dothidea* foi a espécie mais prevalente na região semi-árida do Brasil, representando 37% de todos os isolados amostrados.

Mundialmente, esta espécie está associada à uma ampla variedade de hospedeiros. No Brasil, ela tem sido relatada em pera, maçã, videira, eucalipto e manga (Becker e Ieki 2002, Costa et al. 2010, Mendes et al. 1998).

Neofusicoccum parvum é um dos patógenos mais comuns em mangueira causando morte descendente e podridão peduncular (Slippers et al. 2005; Johnson 1992). Foi relatado em mangueira no Brasil pela primeira vez em 2009 (Costa et al. 2010). Esta espécie está intimamente relacionada com *N. ribis*, mostrando sobreposição de características morfológicas com *N. parvum*, levando à confusão e erros de identificação, exigindo, portanto, o uso de métodos moleculares para distinção dessas espécies. No entanto, a utilização de apenas um gene pode subestimar a diversidade real, principalmente entre as espécies estritamente relacionadas ou crípticas (Taylor et al. 2000). Assim, dados de sequências de nucleotídeos da região ITS, associados com os outros genes, como EF1- α e β -tubulina têm sido aplicados com sucesso para discriminar espécies crípticas e elucidar as relações filogenéticas de inúmeras espécies de Botryosphaeriaceae (De Wet et al. 2008; Phillips et al. 2008; Sakalidis et al. 2011; Mohali et al. 2007). Recentemente, quatro espécies: *N. batangarum*, *N. cordaticola* Pavlic, Slippers, M.J. Wingfield, *N. kwambonambiense* Pavlic, Slippers, M.J. Wingfield e *N. umdonicola* Pavlic, Slippers, M.J. Wingfield foram identificadas neste complexo com base na genealogia de genes (Pavlic et al 2009a, b; Begoude et al 2010). Outra espécie não descrita de *Neofusicoccum* foi encontrada neste trabalho.

F. fabicercianum foi recentemente descrita em *Eucalyptus* sp. no Sul da China (Chen et al. 2011). Filogeneticamente, *F. fabicercianum* está intimamente relacionado com *B. corticis*, *B. dothidea*, *B. schariffi* e *F. ramosum*. Este trabalho constitui o primeiro relato desta espécie no Brasil e pela primeira vez na cultura da manga.

Um dado curioso desse estudo foi a identificação de *B. mamane* associada à mangueira, uma vez que esta espécie só tinha sido relatada em vegetação nativa da Venezuela e Havaí (Gardner, 1997). Assim como a espécie *P. stromaticum*, somente relatada em *Eucalyptus* e *Acacia* ssp na Venezuela (Mohali et al. 2006, 2007). Posteriormente, essa espécie foi relatada em mangueira no Brasil (Marques et al. 2012). De acordo com Pavlic et al. (2008), o fato de todas as espécies de *Pseudofusicoccum* ocorrerem em hospedeiros nativos em uma área relativamente intacta da Austrália ou, no caso de *P. Stromaticum*, em plantas australianas na Venezuela, sugere que as espécies são provavelmente nativas da Austrália. No entanto, neste estudo, *P. stromaticum* foi a segunda espécie mais abundante, com 38% dos isolados, indicando que este gênero é mais amplamente distribuído do que se acreditava anteriormente.

A espécie *Ne. dimidiatum* é caracterizada por hifas pigmentadas, septadas, cadeias de artroconídios e micélio aéreo com aspecto pulverulento. *Ne. dimidiatum* tem sido isolada a partir de diferentes substratos, incluindo tecidos de plantas, solo, pele humana e unhas, além de ser conhecido como patógeno de planta (Punithalingam e Waterston 1970; Crous et al. 2006). Na Austrália, este fungo foi isolado a partir de sintomas de morte descendente da mangueira e produziu sintomas em manga durante os ensaios de patogenicidade (Sakalidis et al. 2011; Ray et al. 2010). O mesmo ocorreu neste estudo: esta espécie foi isolada somente de sintomas de morte descendente. No entanto, foi capaz de causar lesões em manga, sendo a espécie mais virulenta, comparada com as demais espécies obtidas neste estudo. No Brasil, esta espécie foi relatada pela primeira vez causando podridão radicular na planta *Jatropha curcas* L. (Machado et al. 2012). Para nosso conhecimento, este é o primeiro relato desta espécie associada à mangueira no Brasil. Estudos sobre o papel dessa espécie na epidemiologia da doença devem ser realizados.

Especificidade regional dentro de espécies de Botryosphaeriaceae tem sido observada (Slippers and Wingfield 2007). Na Austrália Ocidental, oito táxons de Botryosphaeriaceae foram identificados em mangueira, as espécies mais encontradas foram: *Neo. novaehollandiae*, *Neo. dimidiatum* e *P. adansoniae* (Sakalidis et al. 2011). No leste da Austrália, as espécies identificadas foram *N. parvum*, *N. mangiferum*, *B. dothidea* e *P. kimberleyense* (Slippers et al. 2005). No Brasil, *B. dothidea*, *N. parvum* e *L. theobromae* foram encontradas nas principais regiões produtoras de manga, mas a prevalência diferiu em cada região. No Vale do São Francisco, *F. aesculi* e *N. parvum* foram as espécies mais prevalentes, enquanto no Vale Assú *L. theobromae* foi a espécie mais predominante (Costa et al. 2010). Neste estudo, todas as espécies relatadas foram encontradas no Vale do São Francisco. Essas diferenças podem ser devido a inúmeros fatores, incluindo as cultivares predominantes, as diferenças de clima e tipo de solo e as práticas de manejo (Lazziera et al. 2008).

A inoculação em manga foi realizada e todas as espécies apresentaram potencial em causar danos na cultura. *Neo. dimidiatum* e *N. parvum* causaram as maiores lesões nos frutos. Dados semelhantes foram encontrados por Sakalidis et al. (2011). Estudos sobre a epidemiologia e o impacto dessas espécies na cultura da manga devem ser realizados.

Este estudo encontrou sete espécies de Botryosphaeriaceae associadas à morte descendente e podridão peduncular da mangueira no Nordeste do Brasil. Talvez, pelas condições climáticas favoráveis aos patógenos e controle inespecífico aplicado ao hospedeiro, essas doenças venham adquirindo importância cada vez maior no Nordeste. Assim, futuras

pesquisas sobre estratégias de controle devem ser desenvolvidas para estas novas espécies encontradas, as quais representam uma ameaça para a cultura da mangueira no Brasil.

Agradecimentos

Agradecemos à Plataforma de sequenciamento LABCEN / CCB da Universidade Federal de Pernambuco para o uso de suas instalações. Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 141275/2009-0) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES / BEX 0245/12-7). MPS Câmara, Marcos A. Moraes Junior e SJ Michereff também reconhecem a bolsa de pesquisa do CNPq. AJL Phillips agradece a Fundação para a Ciência e a Tecnologia (Portugal) pelo apoio financeiro através de concessão PEst-OE/BIA/UI0457/2011

Referências

Abdollahzadeh J, Javadi A, Mohammadi-Goltapeh E, Zare R, Phillips, AJL (2010) Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia* 25:1–10

Abdollahzadeh J, Javadi A, Zare R, Phillips AJL (2013) Phylogeny and Taxonomy of *Botryosphaeria* and *Neofusicoccum* species in Iran, with description of *Botryosphaeria scharifii* sp. nov. *Mycologia* 105:210–220

Agrianual (2012) Anuário da agricultura brasileira. Informa Economics/FNP South America, São Paulo. 482 p

Alves A, Crous PW, Correia A, Phillips AJL (2008) Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Divers* 28:1–13

Assis JS (2004) Cultivo da mangueira: colheita e pós-colheita. Embrapa Semi-Árido, Petrolina.

<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira/colheita.htm> Accessed 23 June 2012

- Batista, AC (1947) Mal do Recife, grave doença da mangueira. Escola Superior de Agricultura de Pernambuco, Recife. 5 p
- Becker WF, Ieki H (2002) Ocorrência e patogenicidade de *Botryosphaeria dothidea* como agente causal da seca de ramos em pereira japonesa no Estado de Santa Catarina, Brasil. *Summa Phytopathologica* 28: 201–203
- Begoude BAD, Slippers B, Wingfield MJ, Roux J (2010) Botryosphaeriaceae associated with *Terminalia catappa* in Cameroon, South Africa and Madagascar. *Mycol Prog* 9:101–123
- Burgess TI, Barber PA, Mohali S, Pegg G, Beer W de, Wingfield MJ (2006) Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA comparisons and morphology. *Mycologia* 98:423–435
- Chen SF, Pavlic D, Roux J, Slippers B, Xie YJ, Wingfield MJ, Zhou XD (2011) Characterization of Botryosphaeriaceae from plantation grown Eucalyptus species in South China. *Plant Pathol* 60:739–751
- Costa VSO, Michereff SJ, Martins RB, Gava CAT, Mizubuti ESG, Camara MPS (2010) Species of Botryosphaeriaceae associated on mango in Brazil. *Eur J Plant Pathol* 127:509–519
- Crous PW, Slippers B, Wingfield MJ, Rheeder J, Marasas WFO, Philips AJL, Alves A, Burgess T, Barber P, Groenewald JZ (2006) Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Stud Mycol* 55:235–253
- Damm U, Crous PW, Fourie PH (2007) Botryosphaeriaceae as potential pathogens of Prunus in South Africa, with descriptions of *Diplodia Africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. *Mycologia* 99:664–680
- De Wet J, Slippers B, Preisig O, Wingfield DB, Wingfield MJ Phylogeny of the Botryosphaeriaceae reveals patterns of host association (2008) *Mol Phylogenet Evol* 46:116–126

Farris JS, Kallersjo M, Kluge AG, Bult C (1995) Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10:315–319

Gardner, DE (1997) *Botryosphaeria mamane* sp. nov. associated with witches'-brooms on the endemic forest tree *Sophora chrysophylla* in Hawaii. *Mycologia* 89: 298–303.

Hillis DM, Bull JJ (1993) An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst Biol* 42:182–192

Huelsenbeck JP, Bull JJ, Cunningham CV (1996) Combining data in phylogenetic analysis. *Trends Ecol Evol* 11:152–158

Ismail AM, Cirvilleri G, Polizzi G, Crous PW, Groenewald JZ, Lombard L (2012) *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica*) in Egypt. *Australas Plant Path* 41: 649–660

Javier-Alva J, Gramaje D, Alvarez LA, Armengol J (2009) First report of *Neofusicoccum parvum* associated with dieback of mango trees in Peru. *Plant Dis* 93:426

Johnson GI (1992) Biology and control of stem-end rot pathogens of mango. Ph.D. Thesis, University of Queensland, Queensland, Australia

Lazzizzera C, Frisullo S, Alves A, Phillips AJL (2008) Morphology, phylogeny and pathogenicity of *Botryosphaeria* and *Neofusicoccum* species associated with drupe rot of olives in southern Italy. *Plant Pathol* 57: 948–956

Luque J, Martos S, Phillips AJL (2005) *Botryosphaeria viticola* sp. nov. on grapevines: a new species with a *Dothiorella* anamorph. *Mycologia* 97:1111–1121

Machado AR, Pinho DB, Dutra DC, Pereira OL (2012) First Report of Collar and Root Rot of Physic Nut (*Jatropha curcas*) Caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in Brazil. *Plant Dis* 96:1697–1697

Marques MW, Lima NB, Michereff SJ, Câmara MPS, Souza CRB (2012) First report of mango dieback caused by *Pseudofusicoccum stromaticum* in Brazil. *Plant Dis* 96:144–145

Mehl JW, Slippers B, Roux J, Wingfield MJ (2011) Botryosphaeriaceae associated with *Pterocarpus angolensis* (kiaat) in South Africa. *Mycologia* 103:534–553

Mendes MAS, da Silva VL, Dianese JC, Ferreira MASV, Santos CEN, Gomes Neto E, Urban AF, Castro C (1998) *Fungos em Plantas no Brasil*. Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, Brasília. 555 p

Mohali S, Slippers B, Wingfield MJ (2006) Two new *Fusicoccum* species from *Acacia* and *Eucalyptus* in Venezuela, based on morphology and DNA sequence data. *Mycol Res* 110:405–413

Mohali S, Slippers B, Wingfield MJ (2007) Identification of Botryosphaeriaceae from *Eucalyptus*, *Acacia* and *Pinus* in Venezuela. *Fungal Diversity* 25: 103–125

Page RD (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12:357–358

Pavlic D, Slippers B, Coutinho TA, Gryzenhout M, Wingfield MJ (2004) *Lasiodiplodia gonubiensis* sp. nov., a new *Botryosphaeria* anamorph from native *Syzygium cordatum* in South Africa. *Stud Mycol* 50:313–322

Pavlic D, Wingfield MJ, Barber P, Slippers B, Harder GES, Burgess TI (2008) Seven new species of the Botryosphaeriaceae from baobab and other native trees in Western Australia. *Mycologia* 100:851–866

Pavlic D, Slippers B, Coutinho TA, Wingfield MJ (2007) Botryosphaeriaceae occurring on native *Syzygium cordatum* in South Africa and their potential threat to *Eucalyptus*. *Plant Pathol* 56: 624–636

- Pavlic D, Slippers B, Coutinho TA, Wingfield MJ (2009a) Multiple gene genealogies and phenotypic data reveal cryptic species of the Botryosphaeriaceae: a case study on the *Neofusicoccum parvum*/*N. ribis* complex. *Mol Phylogenet Evol* 51: 259–68
- Pavlic D, Slippers B, Coutinho TA, Wingfield MJ (2009b) Molecular and phenotypic characterization of three phylogenetic species discovered within the *Neofusicoccum parvum*/*N. ribis* complex. *Mycologia* 5: 636–47
- Phillips AJL, Alves A, Pennycook SR, Johnston PR, Ramaley A, Akulov A, Crous PW (2008) Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the Botryosphaeriaceae. *Persoonia* 21:29–55
- Phillips AJL, Fonseca F, Pova V, Castilho R, Nolasco G (2002) A reassessment of the anamorphic fungus *Fusicoccum luteum* and description of its teleomorph *Botryosphaeria lutea* sp. nov. *Sydowia* 54:59–77
- Phillips AJL, Alves A, Correia A, Luque J (2005) Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. *Mycologia* 97: 513–529
- Phillips A.J.L. (2006) The Botryosphaeria site.
http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site. Accessed 10 June 2010
- Punithalingam E, Waterston JM (1970) *Hendersonula toruloidea*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria, No. 274. Kew, Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute. 2 p
- Rannala B, Yang Z (1996) Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *J Mol Evol* 43:304–311
- Ray JD, Burgess TI, Lanoiselet V M (2010) First record of *Neoscytalidium dimidiatum* and *N. novaehollandiae* on *Mangifera indica* and *N. dimidiatum* on *Ficus carica* in Australia. *Plant Dis Notes* 5:48–50

Rodriguez F, Oliver JF, Marin A, Medina JR (1990) The general stochastic model of nucleotide substitutions. *J Mol Evol* 142:485–501

Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572–1574

Sakalidis ML, Ray JD, Lanoiselet V, Hardy GESTJ, Burgess TI (2011) Pathogenic Botryosphaeriaceae associated with *Mangifera indica* in the Kimberley Region of Western Australia. *Eur J of Plant Pathol* 130:379–391

Slippers B, Crous PW, Denman S, Coutinho TA, Wingfield BD, Wingfield MJ (2004a) Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia* 96:83–101.

Slippers B, Fourie G, Crous PW, Coutinho TA, Wingfield BD, Wingfield MJ (2004b) Multiple gene sequences delimit *Botryosphaeria australis* sp. nov. from *B. lutea*. *Mycologia* 96:1028–39

Slippers B, Johnson GI, Crous PW, Coutinho TA, Wingfield B, Wingfield MJ (2005) Phylogenetic and morphological re-evaluation of the Botryosphaeria species causing diseases of *Mangifera indica*. *Mycologia* 97:99–110

Slippers B, Wingfield, MJ (2007) Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* 21: 90–106

Sutton BC (1980) The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Commonwealth Mycological Institute, Kew 696 p

Swofford DL (2003) PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods) Version 4. Sinauer Associates, Sunderland MA

Tavares SCCH (2002) Epidemiologia e manejo integrado de *Botryodiplodia theobromae* - situação atual no Brasil e no mundo. *Fitopatol Bras* 27:46–52

- Tavares SCCH, Menezes M, Choudhury MM (1991) Infecção da mangueira por *Botryodiplodia theobromae* Pat. na região semi-árida de Pernambuco. *Rev Bras Frutic* 13:163–166
- Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC (2000) Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 31:21–32
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25:4876–4882
- Úrbez-Torres JR, Peduto F, Striegler RK, Urrea-Romero KE, Rupe JC, Cartwright RD, Gubler W D (2012) Characterization of fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Arkansas and Missouri. *Fungal Divers* 52:169–189
- Arx JA von (1987) *Plant-pathogenic fungi*. Cramer, Berlin.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR protocols, a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, pp 315–322
- Young ND, Healey J (2003) GapCoder automates the use of indel characters in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics* 4:6. <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2105-4-6.pdf>
- Zhou, S, Stanoxz GR (2001) Relationship among *Botryosphaeria* species and associated anamorphic fungi inferred from the analyses of ITS and 5.8S rDNA sequences. *Mycologia* 95:516–527

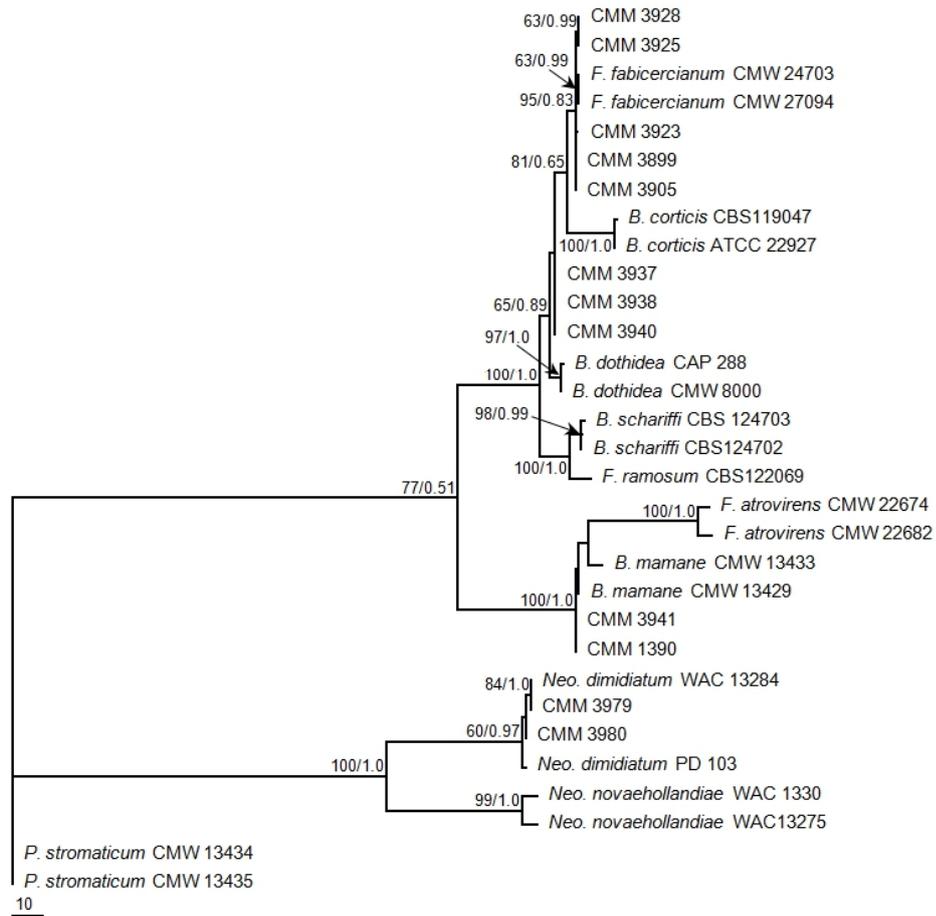


Figura 1 Uma das 16 árvores igualmente parcimoniosas obtidas a partir da análise combinada das sequências de dados da região ITS e EF1- α das espécies de *Botryosphaeria* e *Neoscytalidium* (CI=0.902; RI=0.965; HI=0.098). Os suportes de Máxima Parcimônia e análise Bayesiana são mostradas nos nós. A árvore foi enraizada com *P. stromaticum* (CMW 13434 e CMW 13435).

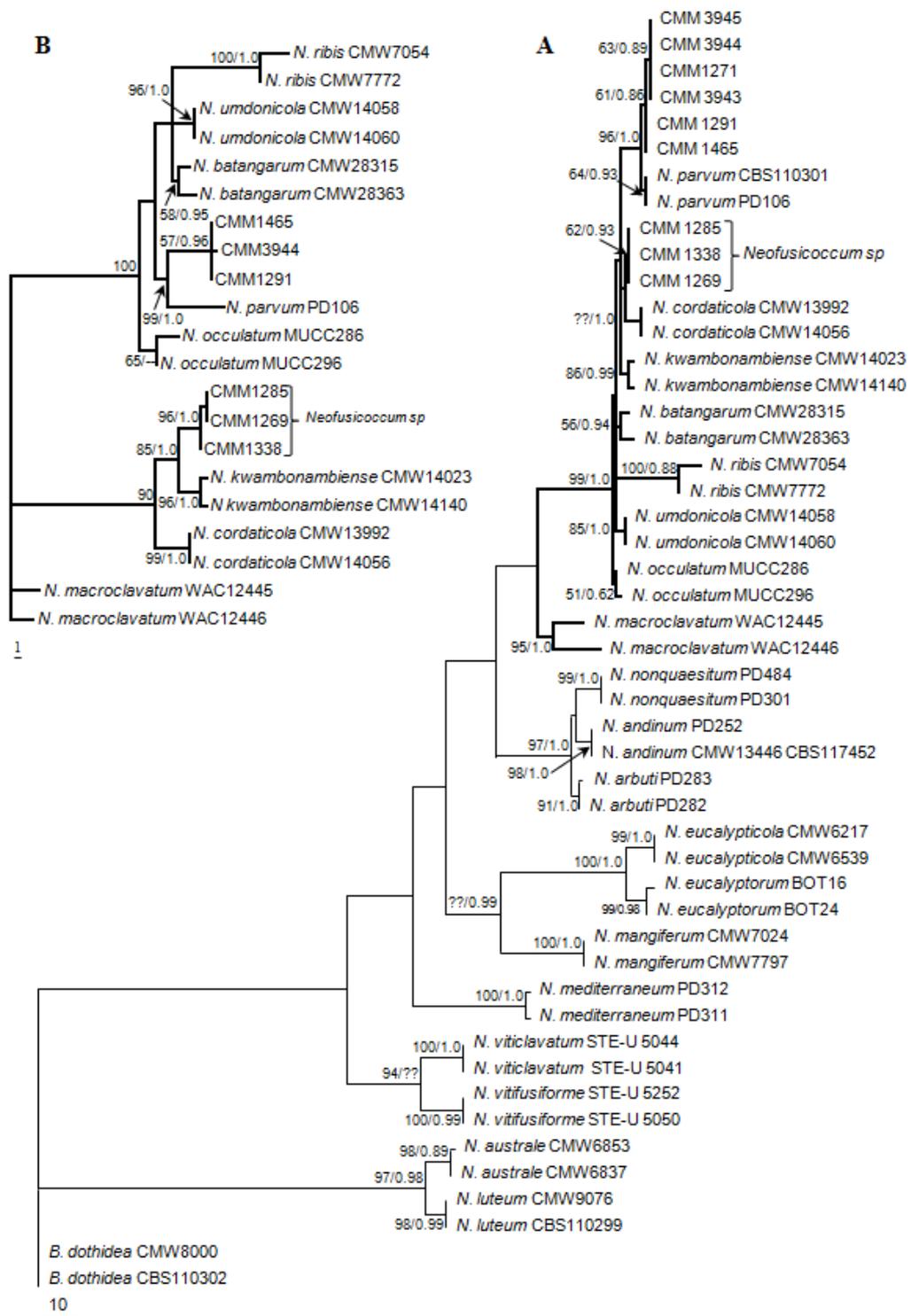


Figura 2 A. Uma das 87 árvores igualmente parcimoniosas (CI=0.767; RI=0.923; HI=0,233) obtidas a partir da análise combinada das sequências de dados da região ITS and EF1- α . **B.** Árvore mais parcimoniosa (CI=0.908; RI=0.931; HI=0.092) resultante da análise de máxima parcimônia da análise combinada das sequências de dados da região ITS, BT e EF1- α para espécies de *Neofusicoccum*. Os suportes de Máxima Parcimônia e análise Bayesiana são mostrados nos nós.

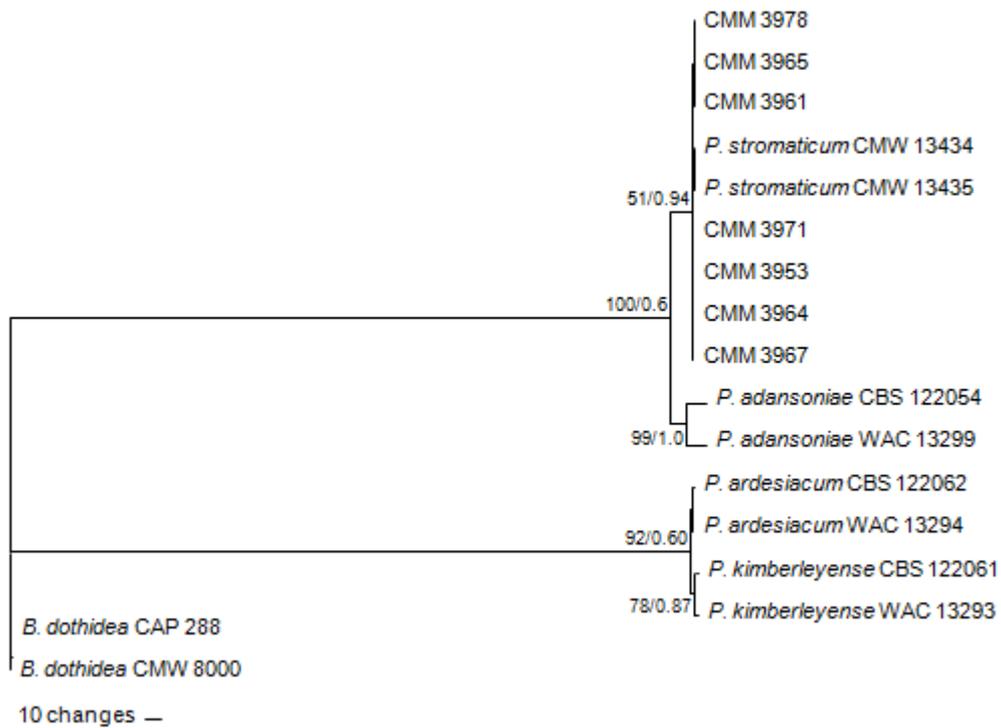


Figura 3 Árvore mais parcimoniosa (CI=0.987; RI=0.989; HI=0.013) obtida a partir da análise combinada das sequências de dados da região ITS e EF1- α para as espécies de *Pseudofusicoccum*. Os suportes de Máxima Parcimônia e análise Bayesiana são mostrados nos nós. A árvore foi enraizada com *B. dothidea* (CAP 288 e CMW 8000).

Vale do São Francisco (n = 115)

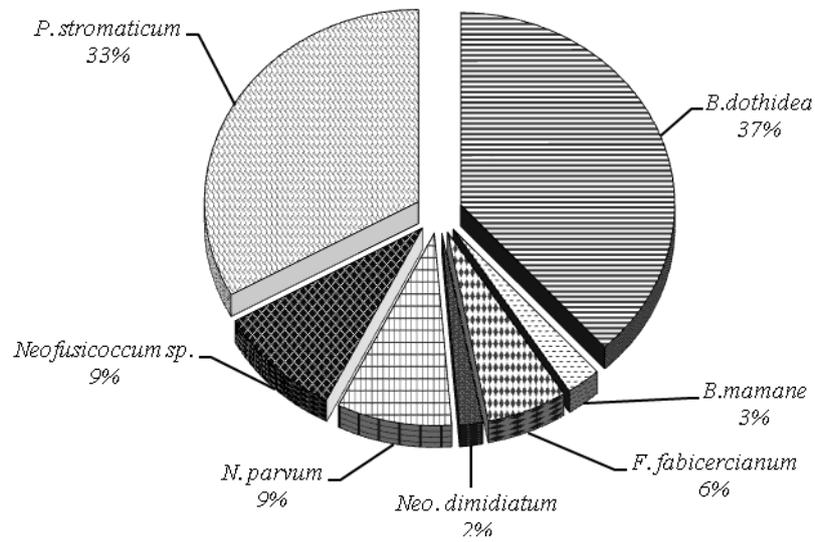


Figura 4 Frequência (%) de espécies de Botryosphaeriaceae associadas a morte descendente e podridão peduncular da mangueira no vale do São Francisco no Nordeste do Brasil.

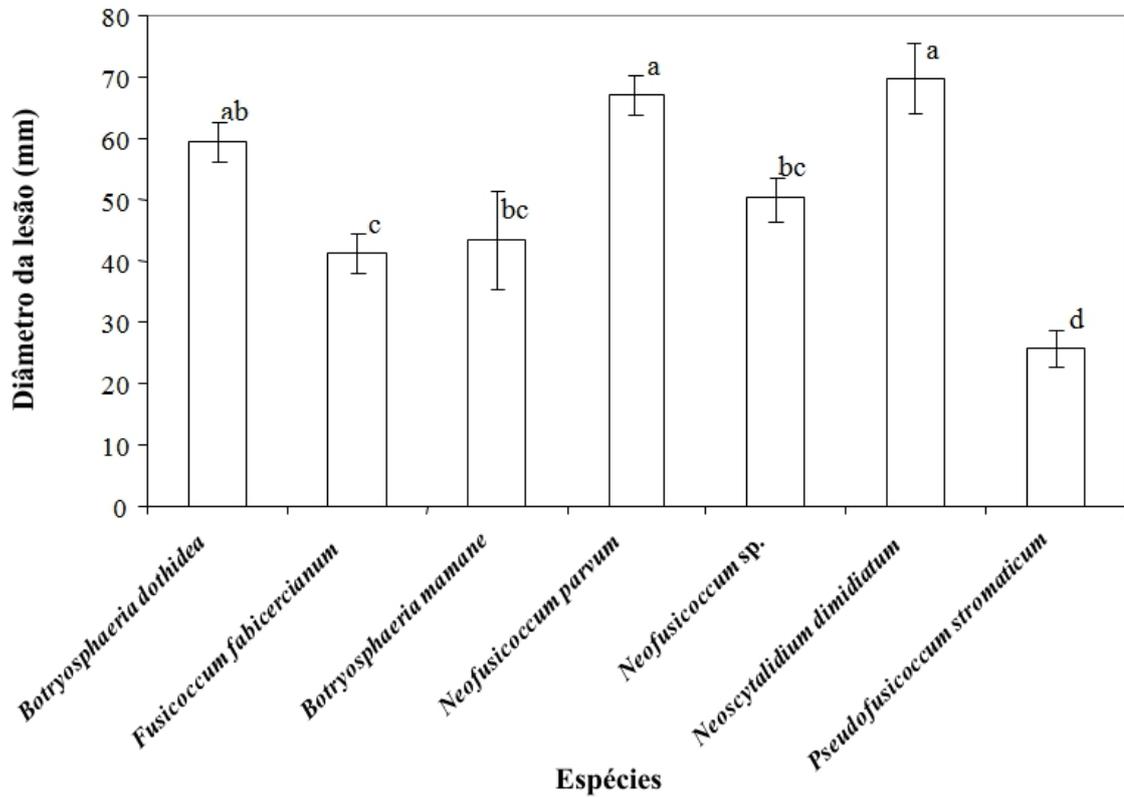


Figura 5 Diâmetro médio da lesão (mm) causada por espécies de Botryosphaeriaceae associada à morte descendente e podridão peduncular da mangueira no Nordeste do Brasil, 72 h após a inoculação em frutos da cultivar Tommy Atkins. Barras acima das colunas correspondem o erro padrão da média. Colunas com a mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Fisher ($P \leq 0,05$).

Tabela 1 Isolados de Botryosphaeriaceae utilizados nas análises filogenéticas.

Taxon	Isolado	Hospedeiro	Origem	Coletor	Acesso GenBank		
					ITS	EF-1 α	BT
<i>Botryosphaeria atrovirens</i>	CMW 22682	<i>Pterocarpus angolensis</i>	Sul da África	J. Mehl & J. Roux	FJ888476	FJ888457	
<i>B. atrovirens</i>	CMW 22674	<i>P. angolensis</i>	Sul da África	J. Mehl & J. Roux	FJ888473	FJ888456	
<i>B. corticis</i>	CBS 119047	<i>Vaccinium corymbosum</i>	Estados Unidos	P.V. Oudemans	DQ299245	EU017539	
<i>B. corticis</i>	ATCC 22927	<i>Vaccinium sp.</i>	Estados Unidos	R.D. Millholland	DQ299247	EU673291	
<i>B. dothidea</i>	CMW 8000	<i>Prunus sp</i>	Suíça	B. Slippers	AY236949	AY236898	
<i>B. dothidea</i>	CAP 288	<i>olive</i>	Itália	C. Lazzizzera	EF638755	EF638732	
<i>B. dothidea</i>	CMM 3937	<i>Mangifera indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX513643	JX513622	
<i>B. dothidea</i>	CMM 3938	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX513645	JX513624	
<i>B. dothidea</i>	CMM 3940	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX513644	JX513623	
<i>B. mamane</i>	CMW 13429	<i>Eucalyptus hybrid</i>	Venezuela	S. Mohali	EF118048	GU134940	
<i>B. mamane</i>	CMW 13433	<i>E. hybrid</i>	Venezuela	S. Mohali	EF118049	GU134941	
<i>B. mamane</i>	CMM 1390	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	KC184893	JX513627	
<i>B. mamane</i>	CMM 3941	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	KC184892	JX513626	
<i>B. scharifii</i>	CBS 124703	<i>M. indica</i>	Irã	J. Abdollahzadeh	JQ772020	JQ772057	
<i>B. scharifii</i>	CBS 124702	<i>M. indica</i>	Irã	J. Abdollahzadeh & A. Javadi	JQ772019	JQ772056	
<i>Fusicoccum fabicercianum</i>	CMW 24703	<i>E. grandis hybrid</i>	China	M.J. Wingfield & X.D. Zhou	HQ332195	HQ332211	
<i>F. fabicercianum</i>	CMW 27094	<i>Eucalyptus sp.</i>	China	M.J. Wingfield	HQ332197	HQ332213	
<i>F. fabicercianum</i>	CMM 3899	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX513646	JX513625	
<i>F. fabicercianum</i>	CMM 3905	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX513642	JX513621	
<i>F. fabicercianum</i>	CMM 3923	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX513641	KC184894	
<i>F. fabicercianum</i>	CMM 3925	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX513640	JX513620	
<i>F. fabicercianum</i>	CMM 3928	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX513639	JX513619	
<i>F. ramosum</i>	CMW 22674	<i>E. camaldulensis</i>	Austrália	D. Pavlic	EU144055	EU144070	

Continuação.

<i>Neofusicoccum andinum</i>	CMW 13455	<i>Eucalyptus sp.</i>	Venezuela	S. Mohali	AY693976	AY693977
<i>N. andinum</i>	CMW 13446	<i>Eucalyptus sp.</i>	Venezuela	S. Mohali	DQ306263	DQ306264
<i>N. arbuti</i>	CBS 116131	<i>Arbutus menziesii</i>	Estados Unidos	M. Elliott	GU251152	GU251284
<i>N. arbuti</i>	CBS 117090	<i>A. menziesii</i>	Estados Unidos	M. Elliott	GU251154	GU251286
<i>N. australe</i>	CMW 6837	<i>Acacia sp.</i>	Austrália	M.J. Wingfield	AY339262	AY339270
<i>N. australe</i>	CMW 6853	<i>Sequoiadendron</i>	Austrália	M.J. Wingfield	AY339263	AY339271
<i>N. batangarum</i>	CMW 28363	<i>Terminalia catappa</i>	África	D. Begoude & J. Roux	FJ900607	FJ900653
<i>N. batangarum</i>	CMW 28320	<i>T. catappa</i>	África	D. Begoude & J. Roux	FJ900608	FJ800654
<i>N. cordaticola</i>	CMW 13992	<i>Syzigium cordatum</i>	Sul da África	D. Pavlic	EU821898	EU821868
<i>N. cordaticola</i>	CMW 14056	<i>S. cordatum</i>	Sul da África	D. Pavlic	EU821903	EU821873
<i>N. eucalypticola</i>	CBS 115766	<i>E. rossii</i>	Australia	M.J. Wingfield	AY 615143	AY615135
<i>N. eucalypticola</i>	CMW 6539	<i>E. rossii</i>	Australia	M.J. Wingfield	AY 615141	AY615133
<i>N. eucalyptorum</i>	CMW 10126	<i>E. grandis</i>	Sul da África	H. Smith	AF283687	AY236892
<i>N. eucalyptorum</i>	CBS 115791	<i>E. grandis</i>	Sul da África	H. Smith	AF 283686	AY236891
<i>N. kwambonambiense</i>	CMW 14023	<i>S. cordatum</i>	Sul da África	D. Pavlic	EU821900	EU821870
<i>N. kwambonambiense</i>	CMW 14140	<i>S. cordatum</i>	Sul da África	D. Pavlic	EU821949	EU821889
<i>N. luteum</i>	CMW 9076	<i>Malus × domestica</i>	Nova Zelândia	S.R. Pennycook	AY 236946	AY236893
<i>N. luteum</i>	CBS 110299	<i>Vitis vinifera</i>	Portugal	A.J.L. Phillips	AY 259091	AY573217
<i>N. macroclavatum</i>	WAC 12445	<i>E. globulus</i>	Austrália	T.I. Burguess	DQ093197	DQ093218
<i>N. macroclavatum</i>	WAC 12446	<i>E. globulus</i>	Austrália	T.I. Burguess	DQ093198	DQ093219
<i>N. mangiferum</i>	CMW 7024	<i>M. indica</i>	Austrália	G.I. Johnson	AY615185	DQ093221
<i>N. mangiferum</i>	CMW 7797	<i>M. indica</i>	Austrália	G.I. Johnson	AY 615186	DQ093220
<i>N. mediterraneum</i>	PD 311	<i>Olea europea</i>	Itália	C. Lazzizera	GU251175	GU251307
<i>N. mediterraneum</i>	PD312	<i>Eucalyptus sp.</i>	Grécia	P.W. Crous; M.J. Wingfield & A.J.L. Phillips	GU251176	GU251308
<i>N. nonquaesitum</i>	PD 484	<i>Umbellularia californica</i>	Estados Unidos	F. P. Trouillas	GU251163	GU251295

Continuação.

<i>N. nonquaesitum</i>	PD 30	<i>Vaccinium corymbosum</i>	Chile	E.X. Briceño; J.G. Espinoza; B.A. Latorre & J.G. Espinoza	GU251185	GU251317	
<i>N. occulatum</i>	MUCC 286	<i>E. pellita</i>	Austrália	T.I. Burgess	EU736947	EU339511	
<i>N. occulatum</i>	MUCC 296	<i>E. pellita</i>	Austrália	T.I. Burgess	EU301034	EU339512	
<i>N. parvum</i>	PD 106	<i>Prunus dulcis</i>	Estados Unidos	T.J. Michailides	GU251139	GU251271	
<i>N. parvum</i>	CBS 110301	<i>V. vinifera</i>	Portugal	A. J. L. Phillips	AY259098	AY573221	
<i>N. parvum</i>	CMM 1291	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX513633	JX513613	KC794029
<i>N. parvum</i>	CMM 1465	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX513634	JX513614	KC794027
<i>N. parvum</i>	CMM 3944	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX513636	JX513616	KC794028
<i>N. ribis</i>	PD 288	<i>E. pellita</i>	Austrália	T. Burgues & G. Pegg	GU251127	GU251259	
<i>N. ribis</i>	CMW 7772	<i>Ribes sp.</i>	Estados Unidos	B. Slippers & G. Hudler	AY236925	AY236877	
<i>N. umdonicola</i>	CMW 14058	<i>S. cordatum</i>	Sul da África	D. Pavlic	EU821934	EU821874	
<i>N. umdonicola</i>	CMW 14060	<i>S. cordatum</i>	Sul da África	D. Pavlic	EU821935	EU821875	
<i>N. viticlavatum</i>	STE-U 5044	<i>V. vinifera</i>	Sul da África	F. Halleen	AY343381	AY 343342	
<i>N. viticlavatum</i>	STE-U 5041	<i>V. vinifera</i>	Sul da África	F. Halleen	AY343380	AY343341	
<i>N. vitifusiforme</i>	STE-U 5050	<i>V. vinifera</i>	Sul da África	J.M. Van Niekerk	AY343382	AY343344	
<i>N. vitifusiforme</i>	STE-U 5252	<i>V. vinifera</i>	Sul da África	J.M. Van Niekerk	AY343383	AY343343	
<i>Neofusicoccum sp</i>	CMM 1269	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX513629	JX513609	KC794032
<i>Neofusicoccum sp</i>	CMM 1285	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX513628	JX513608	KC794030
<i>Neofusicoccum sp</i>	CMM 1338	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX513630	JX513610	KC794031
<i>Neo. dimidiatum</i>	PD 103	<i>Ficus carica</i>	Estados Unidos	T.J. Michailides & P. Inderbitzin.	GU251106	GU251238	
<i>Neo. Dimidiatum</i>	WAC 13284	<i>M. indica</i>	Austrália	J. Ray	GU172382	GU172414	
<i>Neo. dimidiatum</i>	CMM 3979	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX513637	JX513618	
<i>Neo. dimidiatum</i>	CMM 3980	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX513638	JX513617	
<i>Neo. novaehollandiae</i>	WAC 13275	<i>M. indica</i>	Austrália	J. Ray	GU172400	GU172432	

Continuação.

<i>Neo. novaehollandiae</i>	WAC 13303	<i>M. indica</i>	Austrália	J. Ray	GU172398	GU172430
<i>Pseudofusicoccum adansoniae</i>	CBS 122054	<i>Eucalyptus</i> sp.	Austrália	D. Pavilic	EF585532	EF585570
<i>P. adansoniae</i>	WAC 13299	<i>M. indica</i>	Austrália	J. Ray	GU172404	GU172436
<i>P. ardesiacum</i>	CBS 122062	<i>Ad. gibbosa</i>	Austrália	D. Pavilic	EU144060	EU144075
<i>P. ardesiacum</i>	WAC 13294	<i>M. indica</i>	Austrália	J Ray	GU172405	GU172437
<i>P. kimberleyense</i>	CBS 122061	<i>F. opposita</i>	Austrália	D. Pavilic	EU144059	EU144074
<i>P. kimberleyense</i>	WAC 13293	<i>M. indica</i>	Austrália	J. Ray	GU172406	GU172438
<i>P. stromaticum</i>	CMW 13435	<i>E. hybrid</i>	Venezuela	S. Mohali	DQ436935	DQ436936
<i>P. stromaticum</i>	CMW 13434	<i>E. hybrid</i>	Venezuela	S. Mohali	AY693974	AY693975
<i>P. stromaticum</i>	CMM 3953	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464102	JX464109
<i>P. stromaticum</i>	CMM 3961	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464103	JX464110
<i>P. stromaticum</i>	CMM 3964	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464104	JX464111
<i>P. stromaticum</i>	CMM 3965	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464105	JX464112
<i>P. stromaticum</i>	CMM 3967	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464106	JX464113
<i>P. stromaticum</i>	CMM 3971	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464107	JX464114
<i>P. stromaticum</i>	CMM 3978	<i>M. indica</i>	Brasil	M.W. Marques	JX464108	JX464115

Tabela 2 Comparação das dimensões conidiais de espécies de Botryosphaeriaceae encontradas neste estudo e estudos anteriores

Espécies	Dimensões Conidiais (μm)	Razão C/L*	Referências
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	19.54–22.8 \times 3.98–4.92	4.8	Neste estudo
	18–20 \times 4–5	4.1	Slippers et al. 2004
<i>B. mamane</i>	29.39–31.43 \times 7.35–8.73	4.0	Neste estudo
	28–43 \times 5–7	5.8	Mohali et al, 2007
<i>Fusicoccum fabicercianum</i>	18.07–21.19 \times 4.67–6.87	3.7	Neste estudo
	19.6–24.4 \times 5.2–6.4	3.8	Chen et al. 2011
<i>Neofusicoccum parvum</i>	14.64–16.38 \times 5.85–6.39	2.7	Neste estudo
	15–19 \times 4–6	3.1	Slippers et al. 2004
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	9.07–12.31 \times 3–5.3	2.8	Neste estudo
<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	22.2–24.3 \times 6.33–7.0	4.0	Neste estudo
	20–23 \times 5–6	4.0	Mohali et al, 2006

*Razão comprimento/ largura.

Tabela 3 Temperatura ideal para o crescimento micelial e taxa de crescimento micelial a 30 °C de espécies de Botryosphaeriaceae associadas com morte descendente e podridão peduncular da mangueira no Nordeste do Brasil

Espécies	n	Temperatura ótima (°C) ± DP	Taxa de crescimento micelial (mm/dia) ± DP
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	6	27.9 ± 0.36 b	21.9 ± 1.09 d
<i>Botryosphaeria mamane</i>	1	28.5 ± 0.89 b	22.3 ± 2.68 cd
<i>Fusicoccum fabicercianum</i>	6	27.1 ± 0.36 b	19.7 ± 1.09 d
<i>Neofusicoccum parvum</i>	10	25.4 ± 0.28 c	25.3 ± 0.83 c
<i>Neofusicoccum sp.</i>	2	27.7 ± 0.63 b	29.5 ± 1.89 b
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	2	30.8 ± 0.63 a	41.2 ± 1.89 a
<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	8	30.4 ± 0.31 a	24.9 ± 0.99 c

Média ± Desvio padrão (DP). Valores na mesma coluna seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Fisher ($P \leq 0.05$).

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

- *Botryosphaeria dothidea*, *B. mamane*, *Lasiodiplodia crassispora*, *L. egyptiaca*, *L. hormozganensis*, *L. iraniensis*, *L. pseudotheobromae*, *L. viticola*, *L. theobromae*, *Fusicoccum fabicercianum*, *Neofusicoccum parvum*, *Neofusicoccum sp*, *Neoscytalidium dimidiatum* e *Pseudofusicoccum stromaticum* estão associadas à morte descendente e podridão peduncular da mangueira no Nordeste do Brasil;
- As espécies *B. mamane*, *L. crassispora*, *L. egyptiaca*, *L. hormozganensis*, *L. iraniensis*, *L. pseudotheobromae*, *L. viticola*, *F. fabicercianum*, *Neofusicoccum sp*. e *Neo. dimidiatum* são relatadas pela primeira vez associadas a doenças da mangueira no Nordeste do Brasil;
- *Botryosphaeria mamane*, *L. crassispora* e *L. viticola* são espécies relatadas pela primeira vez na cultura da mangueira no mundo.
- Todas as espécies relatadas são patogênicas em manga.
- *Lasiodiplodia viticola* e *L. hormozganensis* são as espécies de *Lasiodiplodia* mais virulentas em frutos de manga encontradas no Nordeste do Brasil;
- *Neoscytalidium dimidiatum* e *N. parvum* são as espécies mais virulentas em manga quando comparadas com as espécies de *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* e *Pseudofusicoccum* encontradas no Nordeste do Brasil;
- *Lasiodiplodia theobromae*, *B. dothidea* e *P. stromaticum* são as espécies prevalentes associadas à morte descendente e podridão peduncular em mangueira no Vale do São Francisco, enquanto *L. theobromae* prevalece no Vale do Assú;