

VALÉRIA SANDRA DE OLIVEIRA COSTA

**ETIOLOGIA E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA MORTE
DESCENDENTE E PODRIDÃO PEDUNCULAR EM
MANGUEIRA NO NORDESTE DO BRASIL**

**RECIFE
2009**

VALÉRIA SANDRA DE OLIVEIRA COSTA

**ETIOLOGIA E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA MORTE
DESCENDENTE E PODRIDÃO PEDUNCULAR EM
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.

**RECIFE - PE
FEVEREIRO – 2009**

**ETIOLOGIA E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA MORTE
DESCENDENTE E PODRIDÃO PEDUNCULAR EM
MANGUEIRA NO NORDESTE DO BRASIL**

VALÉRIA SANDRA DE OLIVEIRA COSTA

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Prof. Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara (UFRPE) - Orientador

Prof. Dr. Sami Jorge Michereff (UFRPE) - Co-orientador

Dr. Ricardo Brainer Martins (UFRPE) - Co-orientador

**RECIFE - PE
FEVEREIRO – 2009**

**ETIOLOGIA E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA MORTE
DESCENDENTE E PODRIDÃO PEDUNCULAR EM
MANGUEIRA NO NORDESTE DO BRASIL**

VALÉRIA SANDRA DE OLIVEIRA COSTA

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 20/02/2009

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara (UFRPE)

EXAMINADORES:

Dr. Ricardo Brainer Martins (UFRPE)

Prof^a. Dr^a. Sônia Maria Alves de Oliveira (UFRPE)

Dr^a. Viviane Jurema Lopes Borges Rodrigues (MAPA/DFA-PE)

Dr. Ailton Reis (CNPH/EMBRAPA)

**RECIFE - PE
FEVEREIRO – 2009**

Aos meus pais, Vicente e Salete, e meus irmãos, Valter, Vaniere e Vânia, pelo amor, carinho, confiança e incentivo durante todos os momentos de minha vida. Aos meus cunhados (as) e queridos sobrinhos, Theo, Raquel, Gabriel, Saliza, Rafael, Maria Júlia e Artur

Com carinho

DEDICO

A Fabiano Teixeira, presente de Deus em minha vida, pelo amor, apoio, compreensão e incentivo.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me guia e me conforta em todos os momentos da vida.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, pelo apoio institucional e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de estudo.

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

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

Ao Dr. Brainer Martins pelo auxílio nas análises deste trabalho e sugestões.

Aos professores do curso de Doutorado, em especial a Rosa Mariano e Rildo Sartori, pela amizade e conhecimentos transmitidos.

À Embrapa Semi-Árido, em especial ao Dr. Carlos Gava e a equipe do Laboratório de controle Biológico, por todo o apoio durante a coleta das amostras.

Ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, em especial a Dra. Viviane Rodrigues e Dr. Antonio Carlos, por disponibilizar o uso do microscópio dessa instituição.

Aos amigos de turma do Doutorado, Albaneyde, Zilderlânia, Paula, Adriano, Giltemberg, Marcelo e Wagner, pelo apoio, amizade e saudável convivência.

Aos amigos do Laboratório de Micologia, Alba Valéria, Jean, Isadora, Cynthia, Francisco, Cícero, Marcelo e Rafael, pela amizade e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Às amigas Neilza, Janaína, Sandra, Lilian, Andréa, Norma, Magna, Renata, Josicleda, Hérica e Adriana, por todo o carinho e apoio nos momentos difíceis.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	vi
SUMÁRIO	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
CAPÍTULO I – Introdução Geral	12
Referências Bibliográficas.....	24
CAPÍTULO II – Espécies de Botryosphaeriaceae em Mangueira na Região Semi-Árida do Nordeste do Brasil	35
Resumo.....	36
Material e Métodos.....	40
Resultados.....	44
Discussão.....	46
Agradecimentos.....	51
Literatura citada.....	51
CAPÍTULO III – Epidemiologia Comparativa de Espécies de Botryosphaeriaceae em Manga	63
Resumo.....	64
Abstract.....	65
Introdução.....	66
Material e Métodos.....	67
Resultados e Discussão.....	70
Conclusões.....	76
Agradecimentos.....	76
Referências.....	76
CONCLUSÕES GERAIS	81

RESUMO

A morte descendente e a podridão peduncular em árvores e frutos de mangueira vêm se constituindo em um sério problema para as regiões agrícolas do Brasil, sendo o seu controle e etiologia ainda um desafio. No primeiro estudo, a diversidade de isolados de Botryosphaeriaceae de plantas e frutos de mangueira foi avaliada na região Semi-Árida do Nordeste do Brasil. Características morfológicas e seqüência de DNA (5.8 S rDNA, ITS-1 e ITS-2) foram usados para identificar uma espécie já conhecida e relatar a presença de duas novas espécies de Botryosphaeriaceae nesta região. As três espécies de Botryosphaeriaceae foram encontradas sempre em seu estágio anamórfico: *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum* e *Lasiodiplodia theobromae*. Essa é a primeira ocorrência de *B. dothidea* e *N. parvum* associados à morte descendente e podridão peduncular em mangueira no Brasil. *Botryosphaeria dothidea* e *N. parvum* foram as espécies prevalentes no Vale do São Francisco, enquanto *L. theobromae* prevaleceu no Vale do Assú. Quando inoculadas em frutos de mangueira ‘Tommy Atkins’, *L. theobromae* e *N. parvum* mostraram maior agressividade quando comparadas com *B. dothidea*. No segundo estudo, foi avaliada a influência da umidade (0 e 72 h de câmara úmida) e temperatura (25, 30 e 35°C) na severidade da podridão peduncular em frutos de mangueira e a suscetibilidade de frutos de diferentes (manga, mamão, abacate e banana) às espécies de Botryosphaeriaceae associadas a esta doença. Os frutos de mangueira foram inoculados com 15 isolados, sendo cinco isolados de cada espécie de Botryosphaeriaceae. A umidade e a temperatura influenciaram significativamente a severidade da podridão peduncular em frutos de mangueira. Os frutos de mangueira inoculados com *L. theobromae* desenvolveram sintomas de podridão independente da presença de câmara úmida e os frutos de mangueira inoculados com *B. dothidea* e *N. parvum* apenas quando os

mesmos foram expostos a um período de 72 h de câmara úmida. As maiores lesões causadas tanto por *L. theobromae* como por *N. parvum* foram observadas nos frutos mantidos nas temperaturas de 25 e 30 °C. Não foi constatado o desenvolvimento de sintomas nos frutos inoculados com *B. dothidea* quando eles foram mantidos nas três temperaturas avaliadas durante o período de avaliação. Os isolados de *L. theobromae* e *N. parvum* foram patogênicos quando inoculados em frutos sadios de mangueira, mamoeiro, abacateiro e bananeira. Os isolados de *B. dothidea* só não foram patogênicos em frutos de bananeira.

Palavras-chave: Filogenia, umidade, temperatura, *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum*, *Lasiodiplodia theobromae* e *Mangifera indica*.

ABSTRACT

Dieback and stem-end rot in trees and fruits of mango have constituted a serious problem for the agricultural regions of Brazil, and its etiology and control is still a challenge. In the first study, the diversity of isolates of Botryosphaeriaceae from plants and fruits of mango was evaluated in semi-arid region of Northeast Brazil. Morphological characteristics and DNA sequence (5.8 S rDNA, ITS-1 e ITS-2) were used to identify a species already known and to report the presence of two new species of Botryosphaeriaceae in this region. The three species of Botryosphaeriaceae were found always in their anamorphic stage: *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum* and *Lasiodiplodia theobromae*. This is the first occurrence of *B. dothidea* and *N. parvum* associated with dieback and stem-end rot on mango in Brazil. *Botryosphaeria dothidea* and *N. parvum* species were prevalent in the Vale São Francisco, while *L. theobromae* prevailed in the Vale Assú. When inoculated in mango fruits 'Tommy Atkins', *L. theobromae* and *N. parvum* showed to be more aggressive if compared to *B. dothidea*. In the second study, it was evaluated the influence of humidity (0 and 72 h in moist chamber) and temperature (25, 30 and 35° C) in the severity of stem-end rot in fruits of mango and the susceptibility of fruits of species different (mango, papaya, avocado and banana) to the species of Botryosphaeriaceae associated with this disease. Mango fruits were inoculated with 15 isolates, five isolates of each of the three species of Botryosphaeriaceae. The humidity and temperature significantly influenced the severity of stem-end rot in fruits of mango. The fruits of mango inoculated with *L. theobromae* developed symptoms of stem-end rot regardless of the presence of a moist chamber and fruits of mango inoculated with *B. dothidea* and *N. parvum* showed symptoms only when they were exposed to a period of 72 h in a moist chamber. The greatest lesions caused by both *L. theobromae* and by *N. parvum* were observed in fruits kept at temperatures of 25 and 30 °C. It was not observed the

development of symptoms in the fruits inoculated with *B. dothidea* when they were maintained at the three temperatures evaluated during the evaluation period. The isolates of *L. theobromae* and *N. parvum* were pathogenic when inoculated in healthy fruit of mango, papaya, avocado and banana. The isolates of *B. dothidea* were not pathogenic on fruits of banana.

Keywords: Phylogeny, humidity, temperature, *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum*, *Lasiodiplodia theobromae* e *Mangifera indica*.

Capítulo I



Introdução Geral

Introdução Geral

A mangueira (*Mangifera indica* L.) é originária do Sul da Ásia, mais especificamente da Índia e do Arquipélago Malaio (CUNHA; PINTO.; FERREIRA, 2002), de onde foi levada para os outros continentes, sendo cultivada em todos os países de clima tropical e subtropical (KHANZADA; LODHI; SHAHZAD, 2004). Apesar de sua origem, o Brasil apresenta amplas condições de cultivo em todo seu território (SOUZA et al., 2002). Com uma produção de 1.272.184 t numa área de 79.246 ha, a região Nordeste encontra-se principal produtora e exportadora de manga, contribuindo com 970.786 t, tendo a Bahia com 65,38%, seguida por Pernambuco com 18,90%, Ceará com 4,22%, Rio Grande do Norte com 3,86% e Sergipe com 2,85% do total produzido (IBGE, 2007). As condições favoráveis de clima, solo, localização, disponibilidade de água para irrigação, preço da terra e custo de mão-de-obra conferem a essa região vantagens comparativas em relação às demais e explicam a liderança absoluta da mesma na produção e exportação dessa fruta (ALMEIDA et al., 2000).

Em 2008, a manga apresenta-se dentre as exportações brasileiras, como a terceira fruta fresca de maior remuneração, com um faturamento de US\$ 89.453.169 correspondendo a 95,4 mil toneladas da fruta, sendo os Estados da Bahia e Pernambuco os principais responsáveis pelas exportações desta fruta no país (IBRAF, 2008).

A mangicultura na região Semi-Árida destaca-se no cenário nacional, não apenas pela expansão da área cultivada e do volume de produção, mas, principalmente, pela qualidade da manga produzida e altos rendimentos alcançados. Seguindo as tendências de consumo do mercado mundial de suprimento de frutas frescas, a região inclina-se, atualmente, para produção de manga de acordo com as normas de controle de segurança nos sistemas de produção preconizados pelas legislações nacional e internacional. Nesse sentido, há uma tendência para o crescimento da produção de manga certificada, com a

adoção da Produção Integrada de Frutas – PIF (SILVA; CORREIA, 2004). A principal vantagem da PIF é a possibilidade de aumentar a abertura ao mercado internacional de frutas frescas, em virtude de o sistema permitir uma maior credibilidade da qualidade e rastreabilidade do produto. Além de propiciar o aumento de parcerias entre os produtores, para que os mesmos obtenham um produto final com a qualidade desejada pelos consumidores (LOPES et al., 2002).

Dentre os pólos de fruticultura irrigada que cultivam mangas na região Nordeste destacam-se o Vale do São Francisco e o Vale do Assú. O Vale do São Francisco que está assentado em terras pertencentes aos Estados da Bahia e Pernambuco, onde são cultivadas as principais variedades de manga, é um dos maiores pólos de produção e exportação do Hemisfério Sul, visto que essa cultura responde por mais de 25 mil empregos diretos e 75 mil indiretos naquela zona de produção (SOUZA et al., 2002). O Vale do Assú no Rio Grande do Norte, devido sua localização geográfica privilegiada, por estar mais próximo da linha do equador, e as 3,5 mil horas de sol por ano, tornou-se um pólo importante para a fruticultura irrigada brasileira, no qual o cultivo da manga tipo exportação encontra-se em fase de grande expansão (PACHECO; PERES, 2008).

As variedades de manga mais indicadas são as que aliam a alta produtividade a qualidades como a coloração atraente do fruto, bom sabor, pouca ou nenhuma fibra, resistência ao manuseio e ao transporte para mercados distantes, além da regularidade de produção e resistência a doenças (COSTA; SANTOS, 2004). As variedades de maior produção são Tommy Atkins, Haden, Keit, Kent, Van Dyke e Palmer (PINTO; COSTA; SANTOS, 2002; COSTA; SANTOS, 2004). Atualmente, a Tommy Atkins é a variedade mais produzida e a que possui a maior participação no volume comercializado no mundo, devido principalmente a sua coloração intensa, produções elevadas e resistência ao

transporte a longas distâncias. Essa variedade representa 90% das exportações de manga no Brasil (COSTA; SANTOS, 2004).

A cultura da mangueira é afetada por doenças, de importância econômica, decorrentes do ataque de bactérias e fungos como a mancha angular (*Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* (Patel, Moniz & Kulkarni) Robbs, Ribeiro & Kimura), antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.), seca da mangueira (*Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted), oídio (*Oidium mangiferae* Bert), malformação floral e vegetativa (*Fusarium subglutinans* Wollenweb & Reinking), verrugose (*Elsinoe mangiferae* Bit & Jenkins), mancha de alternaria (*Alternaria* spp.) e morte descendente (Botryosphaeriaceae spp.) (SANTOS FILHO et al., 2002; TAVARES; COSTA, 2002; RIBEIRO, 2005). E na pós-colheita pela antracnose, podridão por aspergillus (*Aspergillus niger* Van Tieghem), podridão por alternaria e podridão peduncular (Botryosphaeriaceae spp.) (Nieto-Ángel et al., 2006).

A morte descendente e a podridão peduncular vêm se constituindo em um sério problema para as regiões agrícolas do Brasil, ocasionando diversos danos nos pomares de manga, uma vez que reduz a vida útil, diminui a produção, desqualifica os frutos para fins de comercialização e aumenta os custos de cultivo, sendo seu controle ainda um desafio (CUNHA; SANTOS FILHO; NASCIMENTO, 2000; TAVARES; COSTA, 2002; FREIRE et al., 2004).

Essa doença é causada por um complexo de patógenos fúngicos, *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *Neofusicoccum mangiferae* (Syd. & P. Syd.) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not., *Neofusicoccum* sp., *Diplodia* spp., *Dothiorella* spp., *C. gloeosporioides*, *Pestalotia* sp., *Cladosporium* sp., *Alternaria* spp., *Phomopsis* sp., dos quais Botryosphaeriaceae spp. são

dominantes (RAMOS et al., 1991; JOHNSON, 1994; RIBEIRO, 2005; SLIPPERS et al., 2005). As espécies de Botryosphaeriaceae são conhecidas por serem cosmopolitas, com larga gama de hospedeiros e ampla distribuição geográfica (TAVARES, 2002; GURE; SLIPPERS; STENLID, 2005; SLIPPERS et al., 2005; BURGESS et al., 2006; CROUS et al., 2006).

Diferentes autores têm relatado espécies de Botryosphaeriaceae associadas a doenças em mangueira na Austrália (JOHNSON et al., 1994; SLIPPERS et al., 2005), no Brasil (TAVARES; MENEZES; CHOUDHURY, 1991; NOGUEIRA; FERRARI; LOUZEIRO, 2001), na Flórida (RAMOS et al., 1991; PLOETZ et al., 1996), em Oman (AL ADAWI et al., 2003) e na província de Sindh no Paquistão (KHANZADA; LODHI; SHAHZAD, 2004). Essas espécies consideradas como patógenos de árvores e frutos de mangueira são mais conhecidas por seus anamorfos (SLIPPERS et al., 2005). Esses autores reavaliando espécies de Botryosphaeriaceae de *M. indica* na Austrália identificaram *N. parvum*, *N. mangiferae*, *B. dothidea* e *Neofusicoccum* sp.. *Lasiodiplodia theobromae* ocorre em vários países produtores de manga como Índia, Paquistão, Austrália, Egito, África do Sul, Porto Rico, El Salvador, Barbados e México, causando grandes perdas (CUNHA; SANTOS FILHO; NASCIMENTO, 2000), sendo a espécie mais comum nas regiões tropicais (BURGESS et al., 2006). Altos índices de severidade estão associados a sua ocorrência em regiões Semi-Áridas do mundo (SANTOS FILHO et al., 2002). No Brasil, *L. theobromae* foi relatado em 1991 como responsável pela morte significativa de plantas de vários pomares na região Semi-Árida do Nordeste, e em 2001 causando perdas severas em frutos de mangueira no Estado de São Paulo (TAVARES; MENEZES; CHOUDHURY, 1991; NOGUEIRA; FERRARI; LOUZEIRO, 2001). Sua ocorrência também tem sido constatada além dos Estados de Pernambuco, Bahia e São Paulo, no Rio Grande do Norte, Ceará, Piauí, Minas Gerais, Goiás e Distrito Federal (CUNHA; SANTOS

FILHO; NASCIMENTO, 2000; TAVARES, 2002; FREIRE, et al., 2004). Outras culturas de importância sócio-econômica também são afetadas como abacateiro (*Persea americana* Mill.), aceroleira (*Malpighia glabra* L.), bananeira (*Musa* spp.), citros (*Citrus* spp.), coqueiro (*Cocos nucifera* L.), goiabeira (*Psidium guajava* L.), gravioleira (*Annona muricata* L.), mamoeiro (*Carica papaya* L.), maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims.), meloeiro (*Cucumis melo* L.), tamareira (*Phoenix dactylifera* L.) videira (*Vitis* sp.), dentre outras (TAVARES, 2002; FREIRE et al., 2004; ÚRBEZ-TORREZ et al., 2006).

Em Botryosphaeriaceae, o gênero *Botryosphaeria* Ces & De Not. foi inicialmente descrito por Cesati e De Notaris em 1863 e revisado por Saccardo em 1877 (PHILLIPS et al., 2005) e, mais recentemente, por Crous et al. (2006). 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 (PHILLIPS, 2004). Vários gêneros mitospóricos têm sido relatados como anamorfos de Botryosphaeriaceae spp.: *Botryodiplodia* (Sacc.) Sacc., *Diplodia* Fr. in Mont., *Dothiorella* Sacc., *Fusicoccum* Corda in Sturm., *Lasiodiplodia* Ellis & Everh., *Macrophoma* (Sacc) Berl. & Voglino., *Phyllosticta* Pers. e *Sphaeropsis* Sacc. (JACOBS; REHNER, 1998; SLIPPERS et al., 2004a).

Espécies em *Diplodia*, *Dothiorella* e *Lasiodiplodia* são claramente separadas daquelas em *Fusicoccum* por conídios de parede espessa e de menor razão comprimento e largura (LUQUE; MARTOS; PHILLIPS, 2005; PHILLIPS et al., 2005). Quando maduros, os conídios da maioria das espécies de *Diplodia*, *Dothiorella* e *Lasiodiplodia* são escuros e septados (ZHOU; STANOSZ, 2001). Apesar dos tamanhos dos conídios entre esses gêneros muitas vezes se sobrepõem, no geral, os de *Lasiodiplodia* são mais largos e ovóides e possuem estrias longitudinais (BURGESS et al., 2006). Conídios de *Dothiorella* tornam-

se marrom e septados no seu estágio inicial de desenvolvimento, antes mesmo de serem liberados da célula conidiogênica, enquanto conídios em *Diplodia* são hialinos e tornam-se escuros e septados somente com a idade e após a liberação da célula conidiogênica (PHILLIPS et al., 2005).

Os gêneros anamórficos de Botryosphaeriaceae não foram claramente delimitados e alguns têm sido reduzidos à sinonímia (PHILLIPS et al., 2005). Uma das razões é que várias espécies foram descritas baseadas na associação com hospedeiro ou distribuição geográfica (GURE; SLIPPERS; STENLID, 2005). Segundo Zhou; Smith; Stanosz (2001), problemas podem ser encontrados ao definir limites, especialmente entre espécies muito próximas dentro de uma comunidade fúngica, devido à falta de variação morfológica distinta, a interdependência dos caracteres morfológicos e as influências ambientais na morfologia. Exemplos das dificuldades em diferenciar espécies fúngicas muito próximas são aparentes dentro de Botryosphaeriaceae (JACOBS; REHNER, 1998).

A atual identificação das espécies de Botryosphaeriaceae é difícil, uma vez que os teleomorfos são raramente encontrados na natureza, ou são difíceis de serem cultivados em culturas puras (JACOBS; REHNER, 1998; ZHOU; STANOSZ, 2001; VAN NIEKERK et al., 2004; SLIPPERS et al., 2004a, 2007). Além disso, a diversidade morfológica dos mesmos é limitada para permitir uma clara diferenciação específica, enquanto os anamorfos possuem uma larga diversidade morfológica (Jacobs & Rehner, 1998; Luque et al., 2005; Phillips et al., 2005). A taxonomia de Botryosphaeriaceae spp. é, portanto, freqüentemente baseada nas características dos seus anamorfos, os quais são comumente encontrados em culturas puras (JACOBS; REHNER, 1998; SLIPPERS et al., 2004c, 2007; BARBER et al., 2005; PHILLIPS et al., 2005) e em partes de plantas doentes (MOHALI; SLIPPERS; WINGFIELD, 2006). Caracteres morfológicos de anamorfos dessa família, considerados úteis para sua delimitação taxonômica, incluem morfologia conidiais como

forma, tamanho, cor, septação, espessura e textura da parede, ornamentação, a presença de microconídio e modo de conidiogênese (JACOBS; REHNER, 1998; ZHOU; STANOSZ, 2001; SLIPPERS et al., 2004c). No entanto, esses caracteres exigem cuidadosa interpretação, uma vez que alguns deles se sobrepõem entre as espécies (MOHALI; SLIPPERS; WINGFIELD, 2006).

Nos últimos anos, várias técnicas baseadas em DNA têm sido usadas para diferenciar espécies de Botryosphaeriaceae (SLIPPERS et al., 2004c). Essas técnicas incluem marcadores moleculares como RAPD (amplificação randômica de DNA polimórfico), RFLP (polimorfismo de comprimentos de fragmentos de restrição), ISSR (inter simple sequence repeat) e microssatélites (SMITH; STANOSZ, 2001; ZHOU; SMITH; STANOSZ, 2001; CARDOSO; WILKINSON, 2008) e dados de seqüências de regiões do DNA (JACOBS; REHNER, 1998; ZHOU; STANOSZ, 2001). No entanto, esses dados nem sempre são suficientes para diferenciar espécies muito próximas (SLIPPERS et al., 2004c). Dessa forma, estudos filogenéticos usando dados moleculares e morfológicos, têm contribuído significativamente na taxonomia de Botryosphaeriaceae (SLIPPERS et al., 2004a). Assim, análises filogenéticas usando seqüências de nucleotídeos da região ITS (espaçador interno transcrito) têm sido largamente utilizadas para elucidar a taxonomia dessa família, e juntamente com caracteres morfológicos dos anamorfos tem se tornando uma ferramenta poderosa na separação de espécies e em reavaliar a colocação dos seus anamorfos (JACOBS; REHNER, 1998; ZHOU; STANOSZ, 2001; VAN NIEKERK et al., 2004; SLIPPERS et al., 2004a, 2004b, 2005, 2007; BARBER et al., 2005; LUQUE; MARTOS; PHILLIPS, 2005; PHILLIPS et al., 2005; MOHALI; SLIPPERS; WINGFIELD, 2006; PAVLIC et al., 2007; ÚRBEZ-TORRES et al., 2008). Sob este aspecto, as seqüências de nucleotídeos do gene 5.8S do DNA ribossomal e os espaçadores interno transcrito (ITS1 e ITS2) têm sido os mais utilizados (PHILLIPS et al., 2005).

Outros caracteres que poderiam ajudar na taxonomia dessa família incluem especificidade hospedeira, patogenicidade e compatibilidade vegetativa (JACOBS; REHNER, 1998). Estudos recentes do gênero *Botryosphaeria* têm demonstrado que este é restrito a *B. dothidea* e *B. corticis* (Demaree & Wilcox) Arx & E. Müll. Conseqüentemente, o nome *Botryosphaeria* deixou de ser aceito para a maioria das espécies com anamorfos em *Fusicoccum* e *Diplodia*. No entanto, o gênero *Neofusicoccum* Crous, Slippers & A.J.L. Phillips foi descrito para acomodar Botryosphaeriaceae com anamorfos em *Fusicoccum*. Nenhum nome do teleomorfo foi proposto para Botryosphaeriaceae spp. com anamorfos em *Lasiodiplodia*, *Diplodia*, *Macrophomina* Petr., *Pseudofusicoccum* Mohali, Slippers & M.J. Wingf. gen. nov., *Neoscytalidium* Crous & Slippers gen. nov. e *Dothiorella*. Assim, “*B.*” *rhodina* é nomeado por seu anamorfo, *L. theobromae* (CROUS et al., 2006). Nesse estudo, “*Botryosphaeria*” ou “*B.*” é usada para espécies que são morfologicamente idênticas a *Botryosphaeria* mas são distintas filogeneticamente e necessitam serem alocadas em diferentes gêneros.

Espécies de Botryosphaeriaceae estão entre os mais sérios patógenos que afetam árvores e frutos de mangueira (SLIPPERS et al., 2005). Causam sintomas típicos nas plantas infectadas, incluindo a seca progressiva dos ramos, com as folhas secas, retorcidas e de coloração palha com halo escuro nas bordas e pecíolo escurecido, em direção ao caule (die-back), chegando a atingir o tronco da planta, causando sua morte. 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. Nestes pontos são observadas lesões escuras, que progridem para o interior do lenho, infectando o floema, causando o anelamento do órgão afetado. Na inflorescência, observa-se inicialmente uma desidratação e perda de turgescência, provocando morte de flores que logo ficam secas podendo ficar aderidas à panícula ou caírem no solo e os frutos jovens formados tornam-se

enegrecidos e mumificados permanecendo na panícula. Nos frutos, ocorrem necroses no pedúnculo que podem provocar sua queda ou progredirem até a base deste. A necrose ou podridão seca também pode ser observada na lateral do fruto, na forma de mancha escura deprimida ou não e alongada. É comum a morte de mudas enxertadas em viveiro, com a infecção iniciando-se no ponto de enxertia (NOGUEIRA; FERRARI; LOUZEIRO, 2001; SANTOS FILHO et al., 2002; TAVARES; COSTA, 2002; FREIRE, et al., 2004; RIBEIRO, 2005). Esses patógenos colonizam a inflorescência, e por último o tecido do pedúnculo do fruto algumas semanas após o florescimento. A infecção do pedúnculo permanece quiescente até o fruto amadurecer (JOHNSON, 1994).

A disseminação de *Botryosphaeriaceae* spp. é feita pelo vento, insetos e ferramentas de poda. O fungo penetra na planta por aberturas naturais e, principalmente, por ferimentos (SANTOS FILHO et al., 2002; RIBEIRO, 2005). O desenvolvimento da doença é influenciado por condições de temperatura, umidade relativa, estresse hídrico e/ou nutricional a nível de hospedeiro (JOHNSON, 1994; SANTOS FILHO et al., 2002; TAVARES; COSTA, 2002).

O controle da morte descendente e podridão peduncular ainda é um desafio, sendo imprescindível a adoção de manejo integrado através de utilização de mudas sadias, inspeções periódicas no pomar, manejo cultural adequado (eliminar ramos secos, plantas mortas), proteção dos ferimentos com pasta fungicida, desinfestação de ferramentas de poda, evitar períodos prolongados de estresse hídrico e nutricional e adubar adequadamente o pomar (CUNHA; SANTOS FILHO; NASCIMENTO, 2000; SANTOS FILHO et al., 2002; RIBEIRO, 2005).

No entanto, no desenvolvimento de estratégias de controle de doenças de plantas é importante conhecer a epidemiologia do patógeno (PAULA et al., 2000). Uma vez que o conhecimento das condições favoráveis aos patógenos na interação patógeno-hospedeiro é

imprescindível (PESSOA et al., 2007). Dessa forma, a idade em que a planta hospedeira se torna mais suscetível, a faixa de temperatura e o período de molhamento para o estabelecimento de altos níveis de doença devem ser definidos para cada patossistema (BORGES NETO et al., 2000).

A influência de fatores ambientais no desenvolvimento de doenças fúngicas tem sido objeto de estudo por diversos autores em outras culturas (ARAUZ; SUTTON, 1989; MICHAILIDES; MORGAN, 1992; SILVEIRA et al., 2001; MILA et al., 2005; VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2005). O conhecimento dos efeitos da temperatura e da umidade no desenvolvimento de doenças em vários hospedeiros torna possível prevenir uma epidemia através do uso de estratégias mais eficientes de controle (MICHAILIDES; MORGAN, 1992) pela manipulação da irrigação, sistema de previsão e através do momento mais adequado de aplicação de fungicidas (MICHAILIDES; MORGAN, 1992; MILA et al., 2005). A temperatura e a umidade na superfície da planta são os fatores ambientais que afetam mais intensamente o início e o progresso de doenças infecciosas em plantas (SILVEIRA et al., 2001). A temperatura afeta a germinação e o crescimento dos fungos (OLIVEIRA et al., 2006). Enquanto a umidade é indispensável para a germinação da maioria dos esporos fúngicos e para a penetração do tubo germinativo no hospedeiro, além de aumentar a suscetibilidade a certos patógenos, afetando a incidência e a severidade da doença (AGRIOS, 2005).

Considerando que a morte descendente e a podridão peduncular em árvores e frutos de mangueira causam perdas econômicas consideráveis nas principais áreas produtoras do Brasil e que seu controle e etiologia ainda são um desafio, o objetivo deste estudo foi identificar as espécies de Botryosphaeriaceae associadas a estas doenças em mangueira, através de características morfológicas e comparações de seqüências de DNA. Assim como, avaliar a influência da umidade e temperatura na severidade da podridão peduncular

em frutos de mangueira e a suscetibilidade de diferentes frutos às espécies de Botryosphaeriaceae associadas a esta doença.

Referências Bibliográficas

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5th ed. San Diego: Academic Press, 2005. 922p.
- 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.
- ALMEIDA, C. O.; SOUZA, J. S.; MENDES, L. N.; PEREIRA, R. J. Aspectos socioeconômicos. In: MATOS, A. P. (Org.). **Manga**. Produção: aspectos técnicos. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. p.11-14. (Frutas do Brasil, 4).
- ARAUZ, L. F.; SUTTON, T. B. Temperature and wetness duration requirements for apple infection by *Botryosphaeria obtuse*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 79, n. 4, p. 440-444, 1989.
- BARBER, P. A.; BURGESS, T. J.; HARDY, G. E. ST. J.; SLIPPERS, B.; KEANE, P. J.; WINGFIELD, M. J. *Botryosphaeria* species from *Eucalyptus* in Australia are pleoanamorphic, producing *Dichomera* synanamorphs in culture. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, n. 12, p. 1347-1363, 2005.
- BORGES NETO, C. R.; MELLO, S. C. M.; RIBEIRO, Z. M. A.; ÁVILA, Z. R.; MALTY, J.; FONTES, E. M. G. Influência da idade da planta, período de umidificação e

concentração de inóculo no desenvolvimento de sintomas provocados por *Cercospora caricis* em tiririca. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 2, p. 138-142, 2000.

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

CARDOSO, J. E.; WILKINSON, M. J. Development and characterisation of microsatellite markers for the fungus *Lasiodiplodia theobromae*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 34, n. 1, p. 55-57, 2008.

COSTA, J. G.; SANTOS, C. A. F. Cultivares. In: MOUCO, M. A. C. (Ed.). **Cultivo da mangueira**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2004. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br/sistema_producao/spmanga/cultivares.htm>. Acesso em: 20 nov. 2008.

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. 1, p. 235-253, 2006.

CUNHA, G. A. P.; PINTO, A. C. Q.; FERREIRA, F. R. Origem, dispersão, taxonomia e botânica. In: GENÚ, P. J. C.; PINTO, C. A. Q. (Ed. Tecs.). **A cultura da mangueira**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. p. 31-36.

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).

FREIRE, F. C. O.; VIANA, F. M. P.; CARDOSO, J. E.; SANTOS, A. P. **Novos hospedeiros do fungo *Lasiodiplodia theobromae* no Estado do Ceará**. Fortaleza: Embrapa-CNPAT, 2004. 6 p. (Embrapa-CNPAT. Comunicado Técnico, 91).

GURE, A.; SLIPPERS, B.; STENLID, J. Seed-borne *Botryosphaeria* spp. from native *Prunus* and *Podocarpus* trees in Ethiopia, with a description of the anamorph *Diplodia rosulata* sp. nov. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, n. 9, p. 1005-1014, 2005.

IBGE. Sistema IBGE de recuperação automática. Rio de Janeiro; 2007. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda>>. Acesso em: 10 jan. 2009.

IBRAF. Instituto Brasileiro de Frutas. São Paulo; 2008. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br/estatisticas/Exportação/Comparativo_das_Exportações_Brasileiras_de_Frutas_frescas_Jan_Out_2008.pdf>. Acesso em: 16 jan. 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.

JOHNSON, G. I.; MEAD, A. J.; COOK, A. W.; WELLS, I. A. Stem-end rot diseases of tropical fruit – mode of infection in mango, and prospects for control. In: JOHNSON, G. I.; HIGHLEY, E. (Eds.). **Development of Postharvest Handling Technology for Tropical Tree Fruits**. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 1994. p. 72-76. (Aciar Proceedings, 58).

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.

LOPES, P. R. C.; MOREIRA, A. N.; HAJI, F. N. P.; SILVA, A. S.; LEITE, E. M.; LOPES, L. M. M. Produção integrada. In: GENUÍ, P. J. C.; PINTO, C. A. Q. (Ed. Tecs.). **A cultura da mangueira**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. p. 353-379.

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

MICHAILIDES, T. J.; MORGAN, D. P. Effects of temperature and wetness duration on infection of pistachio by *Botryosphaeria dothidea* and management of disease by reducing duration of irrigation. **Phytopathology**, St. Paul, v. 82, n. 12, p. 1399-1406, 1992.

MILA, A. L.; DRIEVER, G. F.; MORGAN, D. P.; MICHAILIDES, T. J. Effects of latent infection, temperature, precipitation, and irrigation on panicle and shoot blight of pistachio in California. **Phytopathology**, St. Paul, v. 95, n. 8, p. 926-932, 2005.

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

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.

OLIVEIRA, S. M. A.; TERAPO, D.; DANTAS, S. A. F.; TAVARES, S. C. C. H. Patologia pós-colheita. 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. 19-44.

PACHECO, L.; PERES C. Frutas nordestinas. **Revista Frutas e Derivados**, São Paulo, n. 11, p. 38-40, 2008.

PAULA, H.; MICHEREFF, S. J.; COSTA, V. S. O.; LARANJEIRA, D.; OLIVEIRA, S. M. A. Variabilidade de aislamientos de *Curvularia eragrostidis* que causan atizonamiento de las hojas de mame (*Dioscorea cayennensis*) en Pernambuco, Brasil. **Boletín Micológico**, Valparaiso, v. 11, n. 1, p. 85-92, 2000.

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

PESSOA, W. R. L. S.; OLIVEIRA, S. M. A.; DANTAS, S. A. F.; TAVARES, S. C. C. H.; SANTOS, A. M. G. Efeito da temperatura e período de molhamento sobre o desenvolvimento de lesões de *Colletotrichum musae* em banana. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 33, n. 2, p. 147-151, 2007.

PHILLIPS, A. J. L. **Botryosphaeria**. Portugal: Universidade Nova Lisboa, 2004. Disponível em: <http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site/genus_concept.htm>. Acesso em: 25 nov. 2008.

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.

PINTO, A. C. Q.; COSTA, J. G.; SANTOS, C. A. F. Principais variedades. In: GENUÍ, P. J. C.; PINTO, C. A. Q. (Ed. Tecs.). **A cultura da mangueira**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. p. 93-116.

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.

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

SANTOS FILHO, H. P.; TAVARES, S. C. C. H.; MATOS, A. P.; COSTA, V. S. O.; MOREIRA, W. A.; SANTOS, C. C. F. Doenças, monitoramento e controle. In: GENUÍ, P. J. C.; PINTO, C. A. Q. (Ed. Tecs.). **A cultura da mangueira**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. p. 299-352.

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://www.cpatia.embrapa.br/sistema_producao/spmanga/socioeconomia.htm>. Acesso em: 20 nov. 2008.

SILVEIRA, N. S. S.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R.; TAVARES, L. A.; MAIA, L. C. Influência da temperatura, período de molhamento e concentração do inóculo de fungos na incidência de podridões pós-colheita em frutos de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 33-38, 2001.

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, 2004a.

SLIPPERS, B.; FOURIE, G.; CROUS, P. W.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. D.; CARNEGIE, A. J.; WINGFIELD, M. J. Speciation and distribution of *Botryosphaeria* spp. on native and introduced *Eucalyptus* trees in Australia and South Africa. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 50, n. 2, p. 343-358, 2004b.

SLIPPERS, B.; FOURIE, G.; CROUS, P. W.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Multiple gene sequences delimit *Botryosphaeria australis* sp. nov. from *B. lutea*. **Mycologia**, New York, v. 96, n. 5, p. 1030-1041, 2004c.

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.

SMITH, D. R.; STANOSZ, G. R. Molecular and morphological differentiation of *Botryosphaeria dothidea* (anamorph *Fusicoccum aesculi*) from some other fungi with *Fusicoccum* anamorphs. **Mycologia**, New York, v. 93, n. 3, p. 505-515, 2001.

SOUZA, J. S.; ALMEIDA, C. O.; ARAÚJO, J. L. P.; CARDOSO, C. E. L. Aspectos socioeconômicos. In: GENUÍ, P. J. C.; PINTO, C. A. Q. (Ed. Tecs.). **A cultura da mangueira**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. p. 19-30.

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

TAVARES, S. C. C. H.; COSTA, V. S. O. **Metodologia de amostragem e nível de ação para as principais doenças da mangueira no Vale do São Francisco**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2002. 14 p. (Circular Técnica, 73).

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.

ÚRBEZ-TORRES, J. R.; LEAVITT, G. M.; GUERRERO, J. C.; GUEVARA, J.; GUBLER, W. D. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. **Plant Disease**, 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.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; DUARTE, V.; AMORIM, L.; PORTO, M. D. M. Detecção e epidemiologia da podridão branca da maçã. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 217-223, 2005.

VAN NIEKERK, J. M.; CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z.; 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.; SMITH, D. R.; STANOSZ, G. R. Differentiation of *Botryosphaeria* species and related anamorphic fungi using inter simple or short sequence repeat (ISSR) fingerprinting. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, n. 8, p. 919-926, 2001.

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.

Capítulo II

Espécies de Botryosphaeriaceae em Mangueira na Região Semi-Árida do Nordeste do Brasil

1 **Espécies de Botryosphaeriaceae em Mangueira na Região Semi-Árida do Nordeste do**
2 **Brasil**

3 **Valéria S. O. Costa**, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de
4 Pernambuco (UFRPE), Brasil 52171-900; **Sami J. Michereff**, Departamento de
5 Agronomia, UFRPE, Brasil 52171-900; **Ricardo B. Martins**, Departamento de
6 Agronomia, UFRPE, Brasil 52171-900; **Carlos A. T. Gava**, Embrapa Semi-Árido, Brasil
7 56302-970; **Eduardo S. G. Mizubuti**, Departamento de Fitopatologia, Universidade
8 Federal de Viçosa, Brasil 36570-000; and **Marcos P. S. Câmara**, Departamento de
9 Agronomia, UFRPE, Brasil 52171-900

10 Autor para correspondência: Marcos P. S. Câmara

11 E-mail: mcamara@depa.ufrpe.br

12
13 **RESUMO**

14 Costa, V. S. O., Michereff, S. J., Martins, R. B., Gava, C. A. T., Mizubuti, E. S. G., and
15 Câmara, M. P. S. 2009. Espécies de Botryosphaeriaceae em mangueira na região Semi-
16 Árida do Nordeste do Brasil. Plant Dis.

17 A diversidade de isolados de Botryosphaeriaceae de plantas e frutos de mangueira foi
18 avaliada na região Semi-Árida do Nordeste do Brasil. Características morfológicas e
19 seqüência de DNA (ITS-1, ITS-2 e 5.8S rDNA) foram usados para identificar uma espécie
20 já conhecida e relatar a presença de duas novas espécies de Botryosphaeriaceae nesta
21 região. As três espécies de Botryosphaeriaceae foram encontradas sempre em seu estágio
22 anamórfico: *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum* e *Lasiodiplodia*
23 *theobromae*. Essa é a primeira ocorrência de *B. dothidea* e *N. parvum* associados à morte
24 descendente e podridão peduncular em mangueira no Brasil. *Botryosphaeria dothidea* e *N.*
25 *parvum* foram às espécies prevalentes no Vale do São Francisco, enquanto *L. theobromae*

26 prevaleceu no Vale do Assú. Quando inoculadas em frutos de mangueira ‘Tommy Atkins’,
27 *L. theobromae* e *N. parvum* mostraram maior agressividade quando comparadas com *B.*
28 *dothidea*.

29 Palavras-chave: Morte descendente, podridão peduncular, filogenia, *Botryosphaeria*
30 *dothidea*, *Neofusicoccum parvum* e *Lasiodiplodia theobromae*.

31

32 A mangueira (*Mangifera indica* L.) é uma fruteira de elevada importância
33 econômica nas áreas tropical e subtropical do mundo (14). No Brasil, a manga é uma das
34 frutas mais produzidas, tendo grande importância econômica por abranger tanto o mercado
35 interno quanto o externo. Entre as regiões brasileiras produtoras, o Vale do São Francisco é
36 o principal produtor e exportador dessa fruta (Fig. 1), colocando-a em importantes
37 mercados consumidores como o dos Estados Unidos, o de países da União Européia e
38 Japão. Em 2008, a manga se destacou dentre as exportações brasileiras como a terceira
39 fruta fresca de maior remuneração, com um faturamento de US\$ 89.453.169,
40 correspondente a venda de 95,4 mil t (9). A morte descendente e a podridão peduncular se
41 constituem em um sério problema para as regiões agrícolas do Brasil, ocasionando
42 diversos danos nos pomares de manga. Os sintomas de morte descendente, cancrios em
43 ramos e caules, e podridão peduncular em frutos estão principalmente associados a
44 espécies de Botryosphaeriaceae, as quais são conhecidas por serem cosmopolitas, com
45 ampla distribuição geográfica e larga gama de hospedeiros (3,26,30).

46 Diferentes autores têm relatado espécies de Botryosphaeriaceae associadas a
47 doenças em mangueira na Austrália (13,26), no Brasil (18,31), na Flórida (21,23), em
48 Oman (1) e na província de Sindh no Paquistão (14). Essas espécies consideradas como
49 patógenos de árvores e frutos de mangueira são mais conhecidas por seus anamorfos (26).
50 Esses autores reavaliando espécies de Botryosphaeriaceae patogênicas a mangueira na

51 Austrália identificaram *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers &
52 A.J.L. Phillips, *Neofusicoccum mangiferae* (Syd. & P. Syd.) Crous, Slippers & A.J.L.
53 Phillips, *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not. e *Neofusicoccum* sp.

54 *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. ocorre em vários países
55 produtores de manga como Índia, Paquistão, Austrália, Egito, África do Sul, Porto Rico, El
56 Salvador, Barbados e México, causando grandes perdas (4), sendo a espécie mais comum
57 nas regiões tropicais (2). Altos índices de severidade estão associados a sua ocorrência em
58 regiões Semi-Áridas do mundo (24). No Brasil, *L. theobromae* foi relatado em 1991 como
59 responsável pela morte significativa de plantas de vários pomares na região Semi-Árida do
60 Nordeste, e em 2001 causando perdas severas em frutos de mangueira no Estado de São
61 Paulo (18,31). Sua ocorrência também tem sido constatada além dos Estados de
62 Pernambuco e Bahia, no Rio Grande do Norte, Ceará, Piauí, Minas Gerais, Goiás e Distrito
63 Federal (4,6).

64 Em Botryosphaeriaceae, o gênero *Botryosphaeria* Ces & De Not. foi inicialmente
65 descrito por Cesati e De Notaris em 1863 e revisado por Saccardo em 1877 (20) e mais
66 recentemente por Crous et al. (3). Vários gêneros mitospóricos têm sido relatados como
67 anamorfos de Botryosphaeriaceae spp.: *Botryodiplodia* (Sacc.) Sacc., *Diplodia* Fr. in
68 Mont., *Dothiorella* Sacc., *Fusicoccum* Corda in Sturm., *Lasiodiplodia* Ellis & Everh.,
69 *Macrophoma* (Sacc) Berl. & Voglino., *Phyllosticta* Pers. e *Sphaeropsis* Sacc. (11,25). No
70 entanto, esses gêneros não foram claramente delimitados, e alguns têm sido reduzidos à
71 sinonímia (20). Uma das razões é que várias espécies foram descritas baseadas na
72 associação com hospedeiro ou distribuição geográfica (7).

73 A atual identificação das espécies de Botryosphaeriaceae é difícil, uma vez que os
74 teleomorfos são raramente encontrados na natureza, ou são difíceis de serem cultivados em
75 culturas puras (11,25,27,33,35). Além disso, a diversidade morfológica dos mesmos é

76 limitada para permitir uma clara diferenciação específica, enquanto os anamorfos possuem
77 uma larga diversidade morfológica (11,20). A taxonomia de Botryosphaeriaceae spp. é,
78 portanto, freqüentemente baseada nas características dos seus anamorfos, os quais são
79 normalmente encontrados em culturas puras (11,20,27) e em órgãos de plantas doentes
80 (16). Caracteres morfológicos de anamorfos dessa família, considerados úteis para sua
81 delimitação taxonômica, incluem características conidiais como forma, tamanho, cor,
82 septação, espessura e textura da parede, ornamentação, a presença de microconídio e modo
83 de conidiogênese (11,35). No entanto, esses caracteres exigem cuidadosa interpretação,
84 uma vez que alguns deles se sobrepõem entre as espécies (16). Estudos filogenéticos
85 usando seqüências de nucleotídeos da região ITS em conjunto com caracteres
86 morfológicos dos anamorfos têm se tornando uma ferramenta poderosa na separação de
87 espécies (2,11,16,19,25,26,32,33,35).

88 Estudos recentes do gênero *Botryosphaeria* têm demonstrado que este é restrito a *B.*
89 *dothidea* e *B. corticis* (Demaree & Wilcox) Arx & E. Müll. Conseqüentemente, o nome
90 *Botryosphaeria* deixou de ser aceito para a maioria das espécies com anamorfos em
91 *Fusicoccum* e *Diplodia*. No entanto, o gênero *Neofusicoccum* Crous, Slippers & A.J.L.
92 Phillips foi descrito para acomodar Botryosphaeriaceae com anamorfos em *Fusicoccum*.
93 Nenhum nome do teleomorfo foi proposto para Botryosphaeriaceae spp. com anamorfos
94 em *Lasiodiplodia*, *Diplodia*, *Macrophomina* Petr., *Pseudofusicoccum* Mohali, Slippers &
95 M.J. Wingf. gen. nov., *Neoscytalidium* Crous & Slippers gen. nov. e *Dothiorella* (3).

96 Considerando que a morte descendente e a podridão peduncular em árvores e
97 frutos de mangueira causam perdas econômicas consideráveis nas principais áreas
98 produtoras do Brasil e que sua etiologia ainda é um desafio, o objetivo deste estudo foi
99 identificar as espécies de Botryosphaeriaceae associadas a estas doenças em mangueira na

100 região Semi-Árida do Nordeste do Brasil, através de características morfológicas e
101 comparações de seqüências de DNA.

102 **MATERIAL E MÉTODOS**

103 **Obtenção de isolados**

104 Isolados, denominados tipo selvagem, foram obtidos por meio de isolamento
105 indireto a partir de amostras de ramos, folhas e panículas com sintomas de morte
106 descendente, e frutos com sintomas de podridão peduncular. As amostras (20 por pomar)
107 foram coletadas entre os anos de 2006 e 2007 em 18 pomares (das variedades Tommy
108 Atkins, Kent, Keit, Van Dyke, Haden, Espada e Palmer) localizados nas duas maiores
109 regiões de produção de manga do NE brasileiro: Vale do São Francisco e Vale do Assú
110 (Fig. 1). Para realização dos experimentos, um isolado monospórico ou ponta de hifa foi
111 obtido para cada isolado tipo selvagem.

112 **Caracterização morfológica**

113 Características morfométricas (dimensões, forma, cor, presença de septo e estrias
114 longitudinais presentes nos conídios foram utilizadas para identificação das espécies
115 (2,19,26). Para isto, cada isolado monospórico foi cultivado em placas de Petri contendo
116 acículas de pinheiro depositadas sobre uma camada de ágar-água. As placas foram
117 expostas a luz negra NUV, fotoperíodo de 12 h, sob temperatura de 20 a 25°C.
118 Semanalmente as placas foram vistoriadas para verificação da formação de picnídios nas
119 acículas. O comprimento e a largura de conídios, extraídos de picnídios, foram mensurados
120 sob microscópio (Olympus BX41, software de captura de imagem Images Plus 2.0) e as
121 médias e amplitudes das mensurações empregadas para identificação de espécies (2,19,26).
122 Cinquenta conídios foram mensurados por isolado.

123 Os isolados tipo selvagem estão depositados na coleção de culturas de fungos
124 fitopatogênicos "Prof. Maria Menezes" (CMM), da Universidade Federal Rural de
125 Pernambuco.

126 As análises estatísticas foram efetuadas com auxílio do programa STATISTICA for
127 Windows (StatSoft Inc., Tulsa – OK, USA, 2000). Foi utilizado o teste Z para diferença
128 entre proporções ($P=0,05$).

129 **Isolamento de DNA, amplificação e análises filogenéticas**

130 Após a identificação morfológica, estudos filogenéticos foram conduzidos para
131 confirmação das espécies identificadas. Para isto, 14 isolados, representativos das regiões
132 de origem das amostras e espécies identificadas, foram selecionados aleatoriamente
133 (Tabela 1).

134 A extração do DNA genômico total foi realizada de acordo com o método CTAB
135 (17). Em seguida os oligonucleotídeos ITS 4 e ITS 5 (34) foram empregados para
136 amplificação da região ITS (incluindo a região 5.8S) do rDNA. As reações de PCR foram
137 conduzidas em termociclador (PTC 100; M. J. Research Company, Watertown, MA), com
138 as seguintes condições: pré-aquecimento inicial por 2 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de
139 desnaturação a 94°C por 60 s, anelamento a 60°C por 90 s, e extensão a 72°C por 120 s. Os
140 produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão
141 0,5X Tris-ácidobórico-EDTA (TBE) e fotografados após coloração com brometo de etídeo
142 por 10 min. Para purificação dos produtos de PCR foi empregado o High Pure PCR
143 Product Purification Kit (Roche). Posteriormente, os produtos purificados foram
144 seqüenciados (seqüenciador MegaBACE) no Laboratório de Genômica do Instituto de
145 Biotecnologia Aplicada à Agricultura - BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa.

146 Para realização das análises filogenéticas, o conjunto de dados foi inicialmente
147 alinhado utilizando Clustal X (8), ajustado a olho, e o alinhamento exportado como

148 arquivo Nexus. Como as novas seqüências geradas foram cerca de 100 pares de bases (pb)
149 mais longas, aproximadamente 54 pb no início e 39 pb no final do alinhamento foram
150 excluídos das novas seqüências para a análise. Seqüências de Botryosphaeriaceae spp. de
151 mangueira e de outros hospedeiros de estudos anteriores disponíveis no GenBank, foram
152 incluídas nas análises (Tabela 1). As análises filogenéticas de Máxima Parcimônia (MP) e
153 Máxima Verossimilhança (ML) foram feitas para este conjunto de dados utilizando PAUP
154 (versão. 4.0b10; Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA; 28) e GARLI (versão 0951;
155 www.bio.utexas.edu/faculty/antisense/garli/Garli.html; 36) para Macintosh,
156 respectivamente. Em ambas as análises *Bionectria* sp. foi utilizado como grupo externo.
157 Este grupo externo foi escolhido por ter sido utilizado em estudos anteriores envolvendo
158 espécies de Botryosphaeriaceae em mangueira (26). Buscas heurísticas para MP foram
159 realizadas com a adição de 100 repetições aleatórias, e o rearranjo dos ramos obtido
160 através do método TBR (tree-bisection–reconnection), salvando um máximo de 10000
161 árvores. Todos os caracteres foram não enraizados e com pesos iguais, e os “gaps” foram
162 tratados como ausência de dados. Os ramos com comprimento zero foram eliminados e
163 todas as árvores igualmente parcimoniosas foram salvas. Para as análises de ML o melhor
164 modelo de evolução para cada locus foi obtido utilizando Modeltest 3.06 (22). O suporte
165 dos clados foi calculado usando o bootstrap não-paramétrico (5), com 1000 réplicas para
166 MP e 100 réplicas para ML. Para ML o comprimento da árvore, índice de consistência
167 (CI), e índice de retenção (RI), também foram obtidos. Para a árvore de ML o melhor
168 modelo de evolução foi também obtido. As árvores resultantes foram impressas no PAUP
169 versão 4.0b10. As seqüências de ITS das Botryosphaeriaceae spp. encontradas no Brasil
170 estão depositadas no GenBank (Tabela 1).

171 **Teste de patogenicidade e agressividade**

172 A patogenicidade dos 246 isolados foi verificada através da inoculação destes em
173 frutos de mangueira ‘Tommy Atkins’. Para isto, os frutos foram lavados com água e sabão,
174 os quais foram superficialmente desinfestados pela imersão em NaClO 1,5% por 5 min,
175 seguida da lavagem com água destilada e secos em condição de laboratório.
176 Posteriormente, os mesmos foram feridos em quatro pontos equidistantes. Os ferimentos
177 consistiram de perfurações de 3-mm de profundidade realizadas com almofadas de
178 alfinetes desinfestadas. Sobre cada ferimento foi depositado um disco de BDA de 5-mm de
179 diâmetro, contendo estruturas fúngicas dos isolados, extraído da borda de colônias com
180 sete dias e cultivadas em temperatura ambiente. Os frutos foram mantidos a uma umidade
181 relativa próxima de 100% por um período de 168 h. Após 72 h da inoculação, a
182 patogenicidade dos isolados foi determinada pela presença de sintomas. O experimento foi
183 montado em esquema inteiramente casualizado, com 2 repetições por isolado. Cada
184 repetição foi constituída de um fruto inoculado em 4 pontos. Como controle, foram
185 utilizados frutos contendo discos de BDA depositados sobre ferimentos.

186 Em seguida, a agressividade dos 14 isolados utilizados nas análises filogenéticas foi
187 avaliada por meio da inoculação de frutos de mangueira ‘Tommy Atkins’. A desinfestação,
188 inoculação e condição de incubação foi semelhante a descrita no teste de patogenicidade,
189 excetuando-se o período em que os frutos foram mantidos a 100% de umidade, que foi de
190 48 h após a inoculação. A agressividade foi determinada pelo diâmetro das lesões (mm) 72
191 h após a inoculação. O experimento foi montado em esquema inteiramente casualizado,
192 com 4 repetições por isolado. Cada repetição foi constituída de um fruto inoculado em 4
193 pontos equidistantes O tratamento controle consistiu de frutos inoculados com discos de
194 BDA. As médias do diâmetro de lesão por isolado foram separadas pelo teste não-
195 paramétrico Mann-Whitney ($P=0,05$), com auxílio do programa SAS 8.0 (SAS Institute
196 Inc., Cary – NC, USA. 2002).

197 **RESULTADOS**

198 **Isolados e caracterização morfológica**

199 Um total de 246 isolados monospóricos foram obtidos e empregados na avaliação
200 morfométrica. O período para desenvolvimento de picnídios/conídios nas acículas de
201 pinheiro variou de 1 a 4 semanas. De acordo com as características morfológicas e
202 média/amplitude de comprimento e largura dos conídios (Tabela 2), os isolados foram
203 reunidos em três grupos (2,19,26), os quais foram identificados como: i – *B. dothidea* (75
204 isolados), caracterizado por conídios hialinos, de parede fina, asseptados e fusiforme,
205 medindo (16-)18-26(-27) x (-3)4-6 μm [média de 50 conídios = 22,1 x 5,1 μm , C/L 4,3]
206 (Fig. 2A); ii – *N. parvum* (79 isolados), que difere de *B. dothidea* apenas nas dimensões
207 (13-)14-19(-22) x 4-6(-7) μm [média de 50 conídios = 15,9 x 5,2 μm , C/L 3,3] (Fig. 2B); e
208 iii – *L. theobromae* (92 isolados), caracterizado por conídios pigmentados, de parede
209 grossa (em conídios maduros), com coloração marrom escura e estrias longitudinais,
210 medindo (18-)19-27(-28) x 11-15(-16) μm [média de 50 conídios = 23,9 x 13,5 μm , C/L
211 1,7] (Fig. 2C). Durante as etapas de isolamento, obtenção de monospóricos e produção de
212 conídios para identificação, não foi encontrado o teleomorfo de nenhuma das espécies.

213 As três espécies foram encontradas em ambas as regiões. Entretanto, no Vale do
214 São Francisco, *B. dothidea* e *N. parvum* predominaram sobre *L. theobromae* (P=0,05) (Fig.
215 1; Tabela 3). Já para o Vale Assu, predominou a associação de *L. theobromae* (P=0,05)
216 (Fig. 1; Tabela 3). Quanto a variedade de origem das amostras, *B. dothidea* foi isolado de
217 amostras oriundas de todas as variedades; *N. parvum* foi isolado de amostras das
218 variedades Tommy Atkins, Kent, Keit, Van Dyke e Haden; e *L. theobromae* foi isolado
219 apenas de amostras obtidas da variedade Tommy Atkins (Tabela 3). Com relação ao órgão
220 da planta amostrado, *B. dothidea* foi isolado a partir de todos os órgãos, enquanto *N.*

221 *parvum* não esteve associado apenas a panícula e *L. theobromae* só foi isolado a partir de
222 ramos e frutos (Tabela 3).

223 Embora as espécies da família Botryosphaeriaceae tenham predominado, outras
224 espécies fúngicas estavam associadas as lesões típicas da morte descendente e podridão de
225 pedúnculo: *Pestalotia* sp., *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp., *Phomopsis* sp., *Nigrospora*
226 sp., *Curvularia* sp., *Colletotrichum* sp., *Chaetomium* sp., *Chaetophoma* sp., *Stemphylium*
227 sp. e *Bipolaris* sp.

228 **Análise filogenética dos isolados de *Botryosphaeria* spp.**

229 Sequências de nucleotídeos da região ITS do DNA ribossomal obtidas foram
230 alinhadas com seqüências ITS de *L. theobromae*, *B. dothidea* e *N. parvum* disponíveis no
231 Genbank (Tabela 1). A matriz apresentou um total de 30 táxons e 598 caracteres, dos
232 quais 182 foram variáveis e 63 foram informativos para parcimônia. Para MP, buscas
233 heurísticas encontraram 10000 árvores igualmente parcimoniosas (comprimento da árvore
234 = 228, CI = 0,904, e RI = 0,957; Fig. 3). Para a análise ML o melhor modelo de evolução
235 usando tanto o teste Akaike quanto verossimilhança hierárquica foi TIMef + G, e uma
236 única árvore com score-1699,588547 foi obtida. Os resultados não conflitam sobre
237 qualquer dos métodos analíticos.

238 A árvore filogenética da região ITS mostra quatro clados com um suporte de
239 bootstrap superior a 91 e 64% para as análises de MP e ML respectivamente. Os clados
240 foram nomeados da seguinte forma: *N. mangiferum* (clado I), *L. theobromae* (clado II), *B.*
241 *dothidea* (clado III) e *N. parvum* (clado IV). A árvore resultante da análise de ML é
242 mostrada com os valores de bootstrap obtidos também na análise de MP (Fig. 3). Todos os
243 isolados desse estudo residem nos clados II, III e IV.

244 Os isolados de *L. theobromae* formaram um clado fortemente suportado com
245 valores de bootstrap de 100%. Os isolados de *L. theobromae* tiveram seqüências

246 praticamente idênticas e agruparam-se com os isolados de *L. theobromae* de Uganda e
247 México de *Vitex donniana* e *Pinus* sp. (clado II). Os isolados do Brasil desta espécie
248 diferiram em apenas 4 pb. Quando comparadas com as seqüências depositadas no
249 GenBank, a identidade da região ITS para esta espécie variou entre 98-100%. Os isolados
250 de *B. dothidea* agruparam-se com os de mangueira da Austrália incluídos nesta análise
251 (clado III). Os isolados do Brasil desta espécie diferiram em 6 pb. Quando comparadas
252 com as seqüências depositadas no GenBank, a identidade da região ITS para esta espécie
253 variou entre 97-100%. Os isolados de *N. parvum* agruparam-se com os de mangueira da
254 Austrália incluídos nesta análise (clado IV). Os isolados do Brasil desta espécie diferiram
255 em apenas 2 pb. Quando comparadas com as seqüências depositadas no GenBank, a
256 identidade da região ITS nesta espécie variou entre 98-100%. As análises de MP e ML
257 produziram topologias quase idênticas (árvores não mostradas). As únicas diferenças entre
258 os métodos de análises dos dados foram mudanças de posições de alguns isolados dentro
259 de cada clado.

260 **Teste de patogenicidade e agressividade**

261 Houve diferença dentro das espécies quanto a patogenicidade. Aproximadamente
262 13% dos isolados de *B. dothidea* e 7,6% dos isolados de *N. parvum* não foram patogênicos.
263 Todos os isolados de *L. theobromae* foram patogênicos.

264 Quanto à agressividade dos isolados, houve diferença entre as espécies ($P=0,05$)
265 (Fig. 4). Os isolados de *L. theobromae* foram mais agressivos, seguidos dos isolados de *B.*
266 *dothidea* e *N. parvum*. Apenas os isolados de *L. theobromae* diferiram entre si quanto a
267 agressividade ($P=0,05$). O isolado CMM1327 de *B. dothidea* não foi patogênico no período
268 de avaliação, exibindo sintomas de podridão 96 h após a inoculação (Fig. 4).

269 **DISCUSSÃO**

270 Esse estudo avaliou a presença e a diversidade de Botryosphaeriaceae spp.
271 associada à morte descendente e a podridão peduncular de plantas e frutos de mangueira na
272 principal região produtora do Brasil. Baseado em caracteres morfológicos e nas análises da
273 sequência parcial da região ITS rDNA, três espécies foram identificadas. As associações de
274 *N. parvum* e *B. dothidea* com mangueira na região Semi-Árida do Nordeste do Brasil não
275 haviam sido relatadas, assim como em outras regiões do Brasil. Até o presente estudo,
276 somente *L. theobromae* tem sido relatada como patógeno de mangueira no Brasil
277 (4,6,18,31).

278 Essas espécies de Botryosphaeriaceae encontradas já haviam sido relatadas em
279 outras áreas de mangueira no mundo causando diferentes sintomas nas plantas infectadas
280 (1,13,14,21,26,30). Além de morte descendente, cancrios em ramos, manchas em folhas e
281 podridão peduncular em frutos, sintomas como queima da inflorescência, exsudação de
282 goma em ramos e caules, cancrios em caule, descoloração vascular, frutos jovens
283 enegrecidos e mumificados presos a inflorescência também estão associados a essas
284 espécies (6,18,21,24,26,31). Na Austrália, *N. parvum*, *N. mangiferae*, *B. dothidea* e
285 *Neofusicoccum* sp. foram isolados de sintomas de árvores e frutos de mangueira (26). Na
286 Flórida, *N. parvum* e *L. theobromae* foram isolados de sintomas de morte descendente
287 (21), e no Brasil, *L. theobromae* tem sido isolado de sintomas de morte descendente e
288 podridão peduncular (6,31).

289 A suscetibilidade diferencial de variedades de mangueira às diferentes espécies
290 deste gênero, já reportado na literatura, é um dos fatores que podem explicar a distribuição
291 das espécies de Botryosphaeriaceae encontradas nas diversas variedades amostradas.
292 Ploetz et al. (21) relataram uma incidência relativamente baixa de 10 e 12% de morte
293 descendente após inoculações artificiais de *N. parvum* e *L. theobromae* em manga Keit.
294 Apesar deste estudo constatar uma baixa incidência (9%) de *N. parvum* em manga Keit,

295 nenhuma incidência de *L. theobromae* foi constatada nessa variedade (Tabela 3). Lima et
296 al. (15) avaliando o comportamento de frutos de seis variedades inoculadas com três
297 isolados de *L. theobromae*, verificaram que Manguito e Espada foram resistentes, e que
298 Haden e Rosa foram resistentes ou moderadamente resistentes. As variedades Keit e Van
299 Dyke mostraram uma variação no comportamento em relação aos isolados. A variedade
300 Keit mostrou-se moderadamente resistente ou suscetível, enquanto que Van Dyke
301 comportou-se como suscetível, altamente suscetível e resistente. De acordo com Tavares
302 (29), entre as variedades Tommy Atkins, Keit, Haden e Van Dyke plantadas no Vale do
303 São Francisco, a primeira apresenta-se com maior ocorrência de *L. theobromae*, o que,
304 segundo o autor, pode ser devido ao fato de que esta variedade seja a mais plantada no
305 Vale. Essa informação está consistente com o presente estudo, onde essa espécie foi
306 encontrada apenas na variedade Tommy Atkins. Estudos posteriores utilizando inoculação
307 cruzada com as variedades mais plantadas comercialmente poderiam ajudar a entender
308 melhor o efeito do hospedeiro na distribuição das diferentes espécies de
309 Botryosphaeriaceae nas regiões produtoras do Brasil.

310 A distribuição diferencial das espécies nas duas regiões de plantio pode estar
311 também associada à suscetibilidade dos hospedeiros, uma vez que no Vale do Assú foi
312 amostrada somente a variedade Tommy Atkins, sendo esta a única variedade onde *L.*
313 *theobromae* foi encontrada independente da região amostrada.

314 *Neofusicoccum mangifera* apesar de identificado na Austrália como patógeno de
315 mangueira, não foi identificado nesse estudo. Estudos sobre a diversidade de espécies de
316 Botryosphaeriaceae em mangueira na África do Sul também não revelaram a presença
317 desta espécie (10).

318 Nesse estudo, nenhum teleomorfo das três Botryosphaeriaceae spp. foi encontrado
319 nas amostras coletadas. A identificação das espécies foi feita com base na morfologia

320 conidial de anamorfos. Estas características foram robustas para identificação dos isolados
321 de *L. theobromae*. Devido à sobreposição de medidas e de formatos de conídios a
322 identificação e separação das espécies *N. parvum* e *B. dothidea* baseado em características
323 morfométricas foi difícil e muitas vezes insatisfatória. Este problema foi mencionado por
324 Slippers et al. (27). Segundo esses autores, os conídios, apesar de serem os mais utilizados
325 na identificação e serem os mais comuns na natureza e em culturas, apresentam problemas
326 de sobreposição de medidas e formatos entre as espécies, o que dificulta a identificação.
327 Outra característica morfológica importante para identificação dos isolados de *L.*
328 *theobromae* foi a presença de paráfases asseptadas. Esta característica foi útil na separação
329 de *L. theobromae* de outras *Lasiodiplodia* spp. encontradas nos trópicos (2).

330 As comparações de seqüências de DNA permitiram confirmar a identificação
331 morfológica de *L. theobromae*, *B. dothidea* e *N. parvum*. O resultado da análise
332 filogenética de ITS claramente separou os isolados de *L. theobromae*, *B. dothidea* e *N.*
333 *parvum*. Os isolados de *B. dothidea* e *N. parvum* do Brasil agruparam-se com os isolados
334 *B. dothidea* e *N. parvum* de mangueira da Austrália que foram incluídos nesta análise. Os
335 isolados de *N. parvum* formaram um sub-clado distinto dos isolados da Oceania. Isto pode
336 indicar que estes isolados encontrados no Brasil formam uma população geneticamente
337 distinta dos isolados encontrados na Austrália e na Nova Zelândia. Por outro lado, os
338 isolados de *L. theobromae* agruparam-se com isolados de *L. theobromae* de outras
339 localidades geográficas e diferentes hospedeiros, mostrando pouca variação nas seqüências
340 de DNA. Esse resultado concorda com estudos filogenéticos anteriores de *L. theobromae*
341 (26) e pode explicar a distribuição cosmopolita dessa espécie no mundo. Já os isolados de
342 *N. mangifera* incluídos nesta análise formaram um clado separado, uma vez que essa
343 espécie não foi encontrada no Brasil.

344 Testes realizados em frutos de mangueira ‘Tommy Atkins’ confirmaram a
345 patogenicidade dos isolados de *L. theobromae*, *B. dothidea* e *N. parvum*. *Lasiodiplodia*
346 *theobromae* foi a única espécie em que todos os isolados foram patogênicos. As espécies *L.*
347 *theobromae* e *N. parvum* mostraram maior agressividade quando comparadas com *B.*
348 *dothidea*.

349 *Neofusicoccum parvum* é um dos patógenos mais comuns de manga causando
350 podridão peduncular, morte descendente e queima da inflorescência (12,13,26). Essa
351 espécie bem como *L. theobromae* são conhecidos como patógenos agressivos quando as
352 plantas estão sob estresse hídrico e/ou nutricional (14,18,29), situação que acontece nas
353 áreas amostradas. *Lasiodiplodia theobromae* tornou-se patógeno primário e generalizado
354 nos pomares de manga, na mesma proporção em que foi adotada a tecnologia de indução
355 floral da mangueira na região Semi-Árida. Esta técnica de manejo debilita as plantas
356 predispondo-as à infecção, principalmente quando se verifica períodos longos de estresse
357 hídrico (24). Esta situação, aparentemente, também favoreceu ao desenvolvimento de *N.*
358 *parvum* nas áreas amostradas. Outros fatores ambientais como vento, chuva e umidade,
359 juntamente com as práticas culturais, podem influenciar na distribuição de
360 Botryosphaeriaceae spp. (32). No entanto, o efeito desses fatores na distribuição de
361 Botryosphaeriaceae spp. em mangueira no Brasil ainda não foram avaliados.

362 Apesar de *B. dothidea* ser comumente encontrada e ter uma ampla variedade de
363 hospedeiros (11), esta espécie tem pouca importância como agente patogênico de manga
364 na Austrália e em outras partes do mundo (26). Esta espécie também foi frequentemente
365 isolada nas variedades e regiões amostradas. No estudo de agressividade, os isolados desta
366 espécie, apesar de capazes de induzir sintomas de podridão nos frutos inoculados,
367 mostraram-se pouco agressivos. O que pode ser explicado pelo fato de *B. dothidea* ter sido
368 isolada em maior número de ramos, não estando à mesma adaptada a frutos.

369 Esse estudo fornece uma base para futuros trabalhos de melhoramento genético
370 visando incorporação de resistência a doenças e melhoria das técnicas de manejo integrado
371 através de um melhor conhecimento das espécies de Botryosphaeriaceae, seus níveis de
372 agressividade e a sua distribuição geográfica em duas das principais regiões produtoras de
373 manga no Nordeste do Brasil.

374 **AGRADECIMENTOS**

375 Os autores expressam seus agradecimentos ao Conselho Nacional de
376 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro (Proc.
377 140896/2005-8).

378 **LITERATURA CITADA**

- 379 1. Al Adawi, A. O., Deadman, M. L., Al Rawahi, A. K., Khan, A. J., and Al Maqbali, Y.
380 M. 2003. *Diplodia theobromae* associated with sudden decline of mango in the
381 Sultanate of Oman. *Plant Pathol.* 52:419.
- 382 2. Burgess, T. I., Barber, P. A., Mohali, S., Pegg, G., Beer, W., and Wingfield, M. J. 2006.
383 Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence
384 comparisons and morphology. *Mycologia* 98:423-435.
- 385 3. Crous, P. W., Slippers, B., Wingfield, M. J., Rheeder, J., Marasas, W. F. O., Phillips, A.
386 J. L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P., and Groenewald, J. Z. 2006. Phylogenetic
387 lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Stud. Mycol.* 55:235-253.
- 388 4. Cunha, M. M., Santos Filho, H. P., and Nascimento, A. S. 2000. Manga: fitossanidade.
389 Frutas do Brasil 6. Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, Brasília.
- 390 5. Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap.
391 *Evolution* 39:779-783.

- 392 6. Freire, F. C. O., Viana, F. M. P., Cardoso, J. E., and Santos, A. P. 2004. Novos
393 hospedeiros do fungo *Lasiodiplodia theobromae* no Estado do Ceará. Comunicado
394 Técnico 91. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza.
- 395 7. Gure, A., Slippers, B., and Stenlid, J. 2005. Seed-borne *Botryosphaeria* spp. from native
396 *Prunus* and *Podocarpus* trees in Ethiopia, with a description of the anamorph *Diplodia*
397 *rosulata* sp. nov. Mycol. Res. 109:1005-1014.
- 398 8. Higgins, D. G., and Sharp, P. M. 1988. Clustal: a package for performing multiple
399 sequence alignment on a microcomputer. Gene 73:237–244.
- 400 9. IBRAF. Instituto Brasileiro de Frutas. São Paulo; 2008. Disponível em:<
401 http://www.ibraf.org.br/estatisticas/Exportação/Comparativo_das_Exportações_Brasileiras_de_Frutas_frescas_Jan_Out_2008.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2009.
- 403 10. Jacobs, R. 2002. Characterisation of *Botryosphaeria* species from mango in South
404 Africa. MSc thesis, University of Pretoria, South Africa.
- 405 11. Jacobs, K. A., and Rehner, S. A. 1998. Comparison of cultural and morphological
406 characters and ITS sequences in anamorphs of *Botryosphaeria* and related taxa.
407 Mycologia 90:601-610.
- 408 12. Johnson, G. I. 1994. Mango diseases caused by fungi. Pages 39-41 in: Compendium of
409 Tropical Fruit Diseases. R. C. Ploetz, G. A. Zentmyer, W. T. Nishijima, K. G.
410 Rohrbach and H. D. Ohr, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- 411 13. Johnson, G. I., Mead, A. J., Cook, A. W., and Wells, I. A. 1994. Stem-end rot diseases
412 of tropical fruit – mode of infection in mango, and prospects for control. Pages 72-76
413 in: Development of Postharvest Handling Technology for Tropical Tree Fruits. G. I.
414 Johnson, and E. Highley, eds. Aciar Proceedings, 58. Australian Centre for
415 International Agricultural Research, Canberra.

- 416 14. Khanzada, M. A., Lodhi, A. M., and Shahzad, S. 2004. Pathogenicity of *Lasiodiplodia*
417 *theobromae* and *Fusarium solani* on mango. Pak. J. Bot. 36: 181-189.
- 418 15. Lima, J. A. S., Oliveira, S. M. A., Coelho, R. S. B., and Tavares, S. C. C. H. 1998.
419 Comportamento de frutos de seis cultivares de mangueira inoculadas com
420 *Botryodiplodia theobromae* Pat. Rev. Bras. Frutic. 20:108-111.
- 421 16. Mohali, S., Slippers, B., and Wingfield, M. J. 2006. Two new *Fusicoccum* species from
422 *Acacia* and *Eucalyptus* in Venezuela, based on morphology and DNA sequence data.
423 Mycol. Res. 110:405-413.
- 424 17. Murray, M. G., and Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight
425 DNA. Nucleic Acids Res. 8:4321-4325.
- 426 18. Nogueira, E. M. C., Ferrari, J. T., and Louzeiro, I. M. 2001. Ocorrência de
427 *Lasiodiplodia theobromae* causando perdas severas de frutos em mangueira no
428 Estado de São Paulo. Arq. Inst. Biol. 68:53.
- 429 19. Pavlic, D., Slippers, B., Coutinho, T. A., and Wingfield, M. J. 2007.
430 Botryosphaeriaceae occurring on native *Syzygium cordatum* in South Africa and their
431 potential threat to *Eucalyptus*. Plant Pathol. 56:624-636.
- 432 20. Phillips, A., Alves, A., Correia, A., and Luque, J. 2005. Two new species of
433 *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs.
434 Mycologia 97:513-529.
- 435 21. Ploetz, R. C., Bensch, D., Vázquez, A., Colls, A., Nagel, J., and Schaffer, B. 1996. A
436 reexamination of mango decline in Florida. Plant Dis. 80:664-668.
- 437 22. Posada, D., and Crandall, K. A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA
438 substitution. Bioinformatics 14:817-818.
- 439 23. Ramos, L. J., Lara, S. P., McMillan Jr., R. T., and Narayanan, K. R. 1991. Tip dieback
440 of mango (*Mangifera indica*) caused by *Botryosphaeria ribis*. Plant Dis. 75:315-318.

- 441 24. Santos Filho, H. P., Tavares, S. C. C. H., Matos, A. P., Costa, V. S. O., Moreira, W. A.,
442 and Santos, C. C. F. 2002. Doenças, monitoramento e controle. Pages 299-352 in: A
443 Cultura da Mangueira. P. J. C. Genú, and C. A. Q. Pinto, eds. Embrapa Informação
444 Tecnológica, Brasília.
- 445 25. Slippers, B., Crous, P. W., Denman, S., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D., and
446 Wingfield, M. J. 2004. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters
447 differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*.
448 *Mycologia* 96:83-101.
- 449 26. Slippers, B., Johnson, G. I., Crous, P. W., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D., and
450 Wingfield, M. J. 2005. Phylogenetic and morphological re-evaluation of the
451 *Botryosphaeria* species causing diseases of *Mangifera indica*. *Mycologia* 97:99-110.
- 452 27. Slippers, B., Smit, W. A., Crous, P. W., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D., and
453 Wingfield, M. J. 2007. Taxonomy, phylogeny and identification of Botryosphaeriaceae
454 associated with pome and stone fruit trees in South Africa and other regions of the
455 world. *Plant Pathol.* 56:128-139.
- 456 28. Swofford, D. L. 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other
457 methods), version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- 458 29. Tavares, S. C. C. H. 1993. *Botryodiplodia theobromae* Lat. em mangueira no
459 Submédio São Francisco II – condições predisponentes - controle. *Rev. Bras. Frutic.*
460 15:147-152.
- 461 30. Tavares, S. C. C. H. 2002. Epidemiologia e manejo integrado de *Botryodiplodia*
462 *theobromae* - situação atual no Brasil e no mundo. *Fitopat. Bras.* 27:46-52.
- 463 31. Tavares, S. C. C. H., Menezes, M., and Choudhury, M. M. 1991. Infecção da
464 mangueira por *Botryodiplodia theobromae* Lat. na região Semi-Árida de Pernambuco.
465 *Rev. Bras. Frutic.* 13:163-166.

- 466 32. Úrbez-Torres, J. R., Leavitt, G. M., Voegel, T. M., and Gubler, W. D. 2006.
467 Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine
468 cankers in California. *Plant Dis.* 90:1490-1503.
- 469 33. van Niekerk, J. M., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Fourie, P. H., and Halleen, F.
470 2004. DNA phylogeny, morphology and patogenicity of *Botryosphaeria* species on
471 grapevines. *Mycologia* 96:781-798.
- 472 34. White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct
473 sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pages 315-322. In: *PCR*
474 *Protocols: A Guide to Methods and Applications*. M. A. Innis, D. H. Gelfand,
475 J. J. Sninsky, and T. J. White, eds. Academic Press, San Diego, CA.
- 476 35. Zhou, S., and Stanosz, G. R. 2001. Relationships among *Botryosphaeria* species and
477 associated anamorphic fungi inferred from the analyses of ITS and 5.8S rDNA
478 sequences. *Mycologia* 93:516-527.
- 479 36. Zwickl, D. J. 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of
480 large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D.
481 dissertation, The University of Texas, Austin.

482 **Tabela 1.** Isolados de Botryosphaeriaceae usados no estudo de filogenia

483

Isolado	Identidade	Hospedeiro	Origem	Coletor	GenBank ITS
CMM1472	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	<i>Mangifera indica</i>	Brasil	V.S.O. Costa	EU915208
CMM1476	<i>L. theobromae</i>	<i>M. indica</i>	Brasil	V.S.O. Costa	EU938326
CMM1485	<i>L. theobromae</i>	<i>M. indica</i>	Brasil	V.S.O. Costa	EU938327
CMM1496	<i>L. theobromae</i>	<i>M. indica</i>	Brasil	V.S.O. Costa	EU938328
CMM1510	<i>L. theobromae</i>	<i>M. indica</i>	Brasil	V.S.O. Costa	EU938329
CMM1516	<i>L. theobromae</i>	<i>M. indica</i>	Brasil	V.S.O. Costa	EU938330
CMM1543	<i>L. theobromae</i>	<i>M. indica</i>	Brasil	V.S.O. Costa	EU938331
CMM1548	<i>L. theobromae</i>	<i>M. indica</i>	Brasil	V.S.O. Costa	EU938332
CMW10130	<i>L. theobromae</i>	<i>Vitex donniana</i>	Uganda	J. Roux	AY236951
CMW9074	<i>L. theobromae</i>	<i>Pinus</i> sp.	México	T. Burgess	AY236952
CMM1317	<i>Neofusicoccum parvum</i>	<i>M. indica</i>	Brasil	V.S.O. Costa	EU938333
CMM1276	<i>N. parvum</i>	<i>M. indica</i>	Brasil	V.S.O. Costa	EU938334
CMM1271	<i>N. parvum</i>	<i>M. indica</i>	Brasil	V.S.O. Costa	EU938335
CMW7025	<i>N. parvum</i>	<i>M. indica</i>	Australia	G.I. Johnson	AY615181
CMW7026	<i>N. parvum</i>	<i>M. indica</i>	Australia	G.I. Johnson	AY615182
CMW7799	<i>N. parvum</i>	<i>Persea americana</i>	Australia	K.G. Pegg	AY615184
CMW9078	<i>N. parvum</i>	<i>Actinidia deliciosa</i>	New Zealand	S.R. Pennycook	AY236940
CMW9081	<i>N. parvum</i>	<i>Populus nigra</i>	New Zealand	G.J. Samuels	AY236943
CMM1302	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>M. indica</i>	Brasil	V.S.O. Costa	EU938336
CMM1319	<i>B. dothidea</i>	<i>M. indica</i>	Brasil	V.S.O. Costa	EU938337
CMM1327	<i>B. dothidea</i>	<i>M. indica</i>	Brasil	V.S.O. Costa	EU938338
CMW7780	<i>B. dothidea</i>	<i>Fraxinus excelsior</i>	Switzerland	B. Slippers	AY236947
CMW8000	<i>B. dothidea</i>	<i>Prunus</i> sp.	Switzerland	B. Slippers	AY236949
CMW7020	<i>B. dothidea</i>	<i>M. indica</i>	Australia	G.I. Johnson	AY615191
CMW7027	<i>B. dothidea</i>	<i>M. indica</i>	Australia	G.I. Johnson	AY615192
CMW7803	<i>B. dothidea</i>	<i>M. indica</i>	Australia	G.I. Johnson	AY615193
CMW7024	<i>Neofusicoccum mangiferum</i>	<i>M. indica</i>	Australia	G.I. Johnson	AY615185
CMW7797	<i>N. mangiferum</i>	<i>M. indica</i>	Australia	G.I. Johnson	AY615186
CMW7801	<i>N. mangiferum</i>	<i>M. indica</i>	Australia	G.I. Johnson	AY615187
CMW7063	<i>Bionectria</i> sp.	<i>Taxus baccata</i>	Netherlands	H.A. van der Aa	AY236956

484

485

486 **Tabela 2.** Dimensões de conídios de anamorfos de Botryosphaeriaceae examinadas no
 487 presente estudo e já descrita na literatura

488

Identidade	Tamanho conidial (μm) ^a	C/L ^b	Fonte dos dados
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	17-33 x 10-15 [22,6 x 12,2]	1,9	Burgess et al. (2)
	(18-)19-27(-28) x 11-15 (-16) [23,9 x 13,5]	1,7	Nesse estudo
<i>Neofusicoccum parvum</i>	(14,7-)17-21(-25, 5) x 4,5-6 (-7) [19 x 5,2]	3,7	Slippers et al. (26)
	(13-)14-19(-22) x 4-6(-7) [15,9 x 5,2]	3,3	Nesse estudo
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	(20-)23-27(-30) x 4-5(-6) [24,7 x 4,9]	5	Slippers et al. (25)
	(18,8-)21-24(-30,4) x 4,5-6(-7) [23 x 5,1]	4,5	Slippers et al. (26)
	(16-)18-26(-27) x (-3)4-6 [22,1 x 5,1]	4,3	Nesse estudo
<i>N. mangiferum</i>	(11-)12-15(-17.3) x 5-6,6 [13,6 x 5,4]	2,5	Slippers et al. (26)

489 ^aDimensões mínimas e máximas em parênteses e médias de 50 conídios nos colchetes.

490 ^bC/L=comprimento/largura.

491

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506

507

508 **Tabela 3.** Número de isolados de Botryosphaeriaceae spp. (A) nas regiões produtoras de
 509 manga; (B) nas áreas produtoras de manga; (C) nas variedades de manga; (D) nas partes da
 510 planta de mangueira

511 A

Regiões produtoras de manga	Número de isolados		
	<i>B. dothidea</i>	<i>N. parvum</i>	<i>L. theobromae</i>
Vale do São Francisco	73 aA*	71 aA	40 aB
Vale do Assú	2 bC	8 bB	52 aA

512 B

Áreas produtoras de manga	Número de isolados		
	<i>B. dothidea</i>	<i>N. parvum</i>	<i>L. theobromae</i>
Vale do São Francisco			
Casa Nova	20 bA	12 bA	2 bB
Juazeiro	12 bA	11 bA	3 bB
Petrolina	41 aA	48 aA	35 aA
Vale do Assú			
Afonso Bezerra	0 bB	1 bB	14 bA
Ipanguaçu	2 aB	7 aB	38 aA

514 C

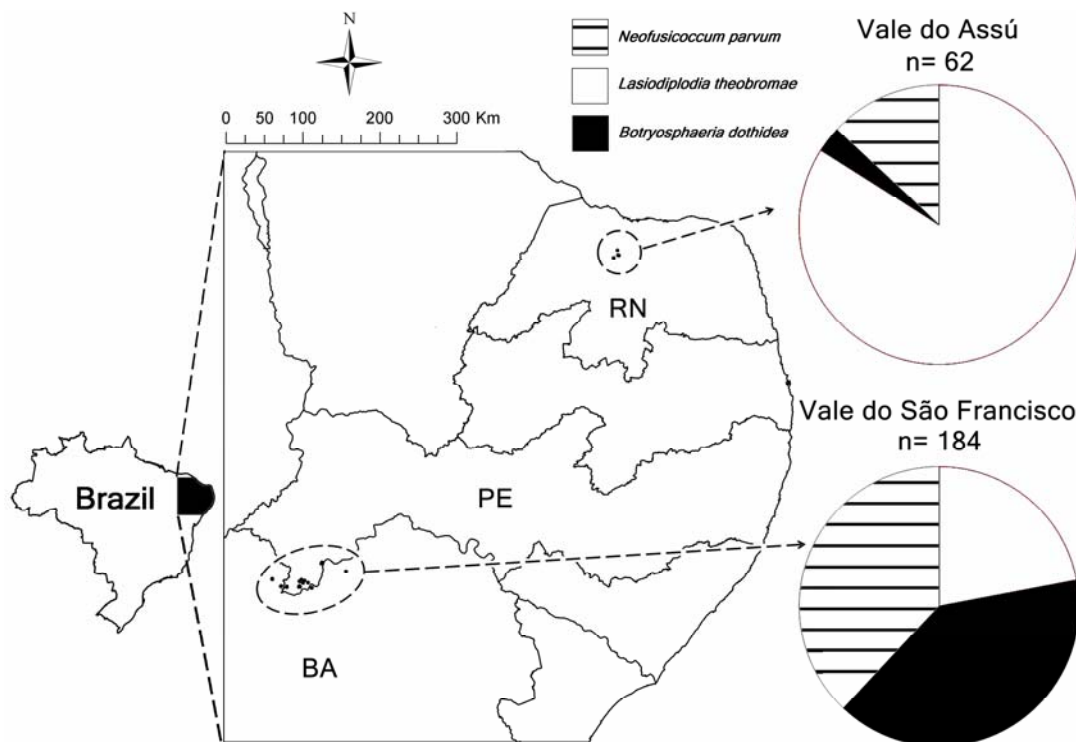
Variedades	Número de isolados		
	<i>B. dothidea</i>	<i>N. parvum</i>	<i>L. theobromae</i>
Tommy Atkins	48 aB	60 aB	92 aA
Kent	13 bA	4 bB	0 bC
Keit	4 cA	2 bcAB	0 bB
Van Dyke	3 cAB	6 bA	0 bB
Haden	4 cA	7 bA	0 bB
Espada	2 cA	0 cB	0 bB
Palmer	1 cA	0 cA	0 bA

516 D

Partes da planta	Número de isolados		
	<i>B. dothidea</i>	<i>N. parvum</i>	<i>L. theobromae</i>
Ramo	53 aB	70 aAB	74 aA
Fruto	13 abA	5 bB	18 bA
Folha	3 cA	4 bA	0 cB
Panícula	6 bcA	0 cB	0 cB

518 *Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem
 519 significativamente entre si pelo teste Z para diferença entre proporções (P= 0,05).

520



521
522

523 **Fig. 1.** Distribuição geográfica de Botryosphaeriaceae spp. em mangueiras na região Semi-
524 Árida do Nordeste do Brasil.

525

526

527

528

529

530

531

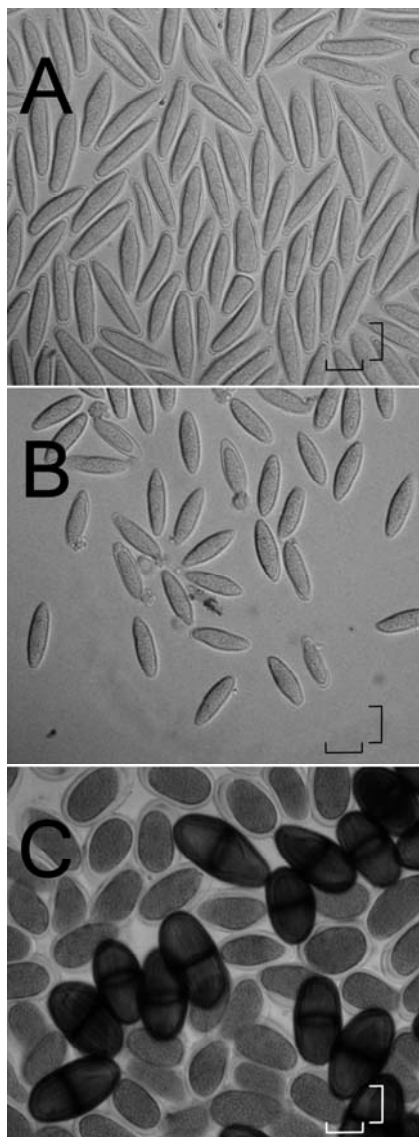
532

533

534

535

536



537
538

539 **Fig. 2.** Conídios de Botryosphaeriaceae spp. obtidos a partir de picnídios formados em
540 acículas de pinheiro em meio ágar-água. Fotografias tiradas com aumento de x100 (óleo de
541 imersão). Barra = 10 μ m. **A**, conídios hialinos, parede fina, asseptados e fusiforme de
542 *Botryosphaeria dothidea* (CMM1327). **B**, conídios hialinos de parede fina, asseptados e
543 fusiforme a elipsoide de *Neofusicoccum parvum* (CMM1317). **C**, conídios maduros de
544 parede grossa, coloração marrom escura e estrias longitudinais, e conídios jovens de parede
545 grossa e hialinos de *Lasiodiplodia theobromae* (CMM1485).

546

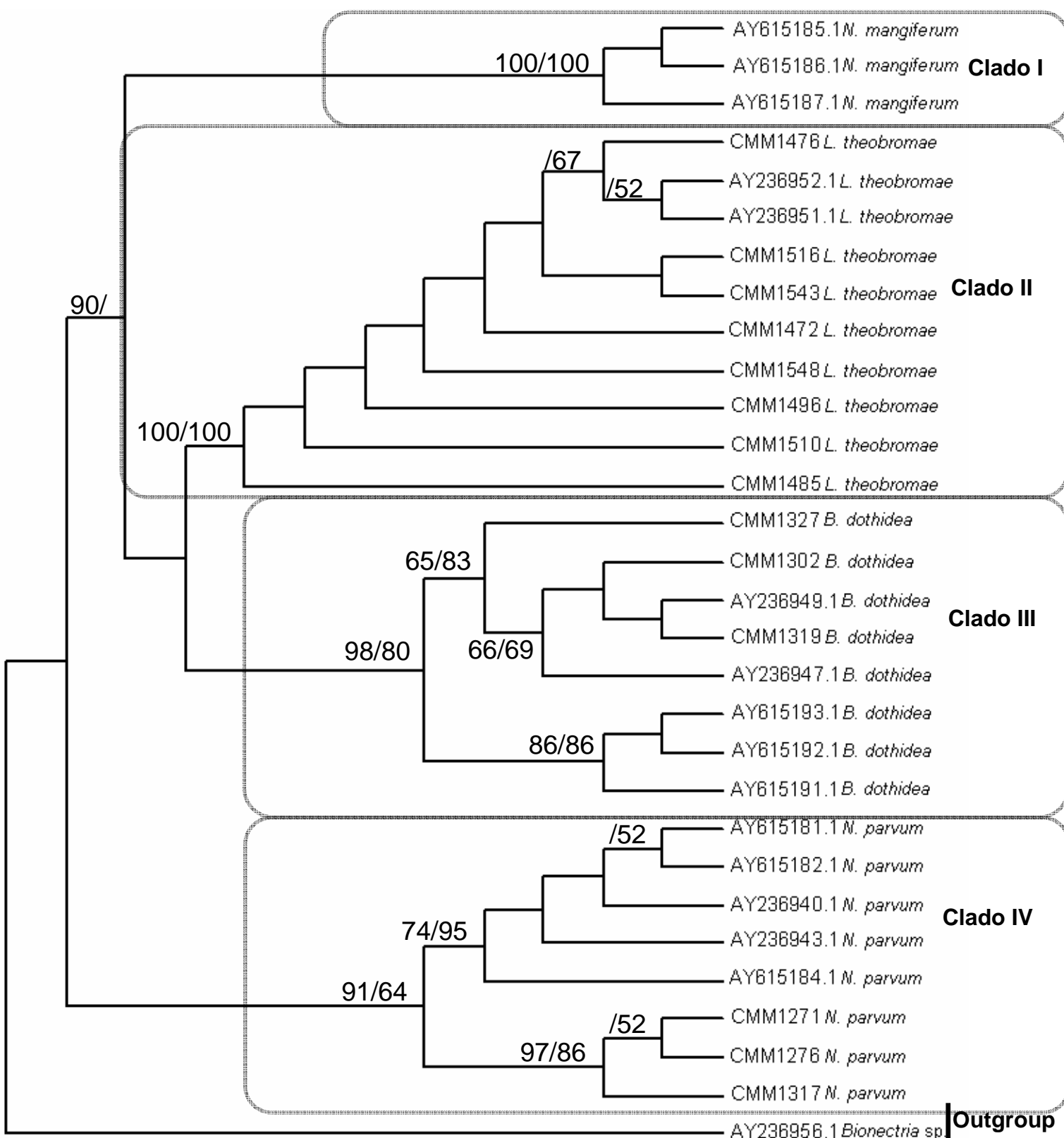
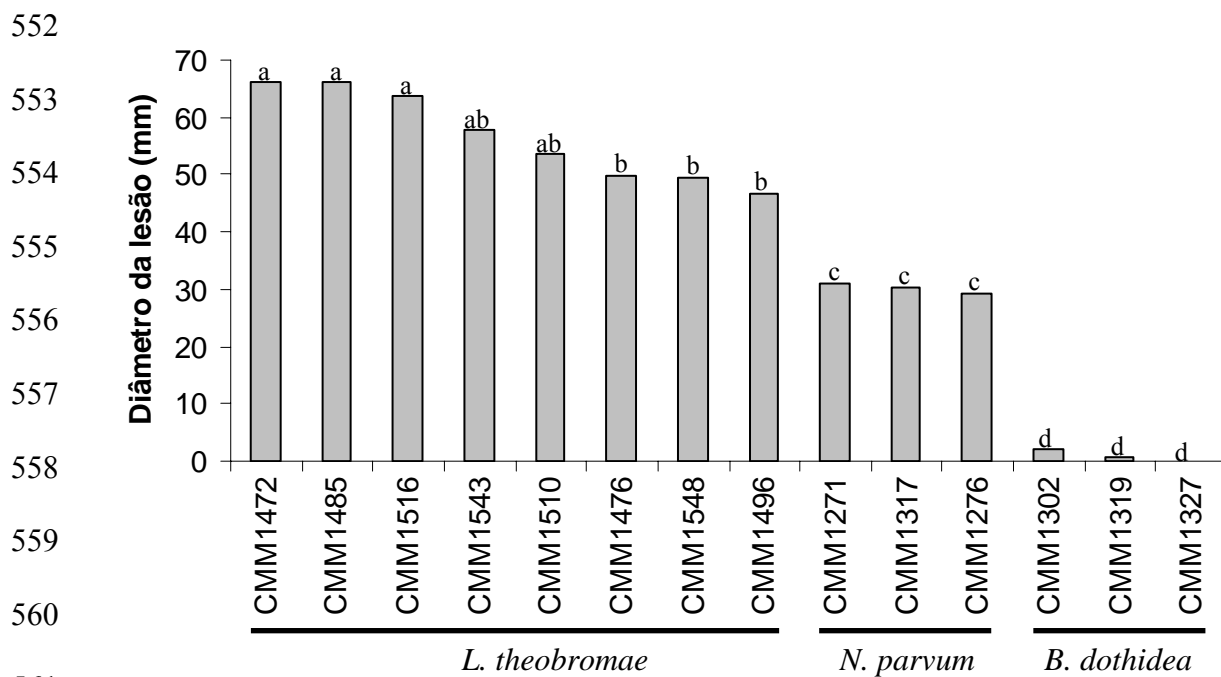


Fig. 3. Única árvore resultante da análise de Máxima Verossimilhança gerada em PAUP 4.0b10 a partir de seqüências de espaçadores transcritos internos (ITS) das espécies de Botryosphaeriaceae. Números sobre os ramos são valores obtidos de bootstrap (> 50%) para as análises de MP e ML, respectivamente.



562 **Fig. 4.** Diâmetro médio de lesão (mm) de frutos de manga inoculados com três
 563 espécies de Botryosphaeriaceae. As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si
 564 (Mann-Whitney; $P=0,05$).

Capítulo III

Epidemiologia comparativa de espécies de Botryosphaeriaceae em Manga

1 **Epidemiologia comparativa de espécies de Botryosphaeriaceae em manga**¹

2
3 Comparative epidemiology of species Botryosphaeriaceae in mango

4
5 Valéria Sandra de Oliveira Costa², Ricardo Brainer Martins³, Sami Jorge

6 Michereff^{4*} e Marcos Paz Saraiva Câmara⁵

7
8 **Resumo** - A morte descendente e a podridão peduncular de plantas e frutos de mangueira
9 associadas às espécies de Botryosphaeriaceae (*Lasiodiplodia theobromae*, *Botryosphaeria*
10 *dothidea* e *Neofusicoccum parvum*) é um problema para as regiões agrícolas do Brasil. O
11 objetivo deste trabalho foi de avaliar a influência da umidade (0 e 72 h de câmara úmida) e
12 temperatura (25, 30 e 35 °C) na severidade da podridão peduncular em frutos de mangueira
13 e a suscetibilidade de frutos de diferentes espécies (manga, mamão, abacate e banana) às
14 espécies de Botryosphaeriaceae associadas a esta doença. Os frutos de mangueira foram
15 inoculados com 15 isolados, sendo cinco de cada espécie de Botryosphaeriaceae. A
16 umidade e a temperatura influenciaram significativamente a severidade da podridão
17 peduncular em frutos de mangueira. Os frutos de mangueira inoculados com *L.*
18 *theobromae* desenvolveram sintomas de podridão independente da presença de câmara
19 úmida e os inoculados com *B. dothidea* e *N. parvum* apenas quando os mesmos foram
20 expostos a um período de 72 h de câmara úmida. As maiores lesões causadas tanto por *L.*
21 *theobromae* como por *N. parvum* foram observadas nos frutos mantidos nas temperaturas

* autor para correspondência

¹ Recebido para publicação em / / ; aprovado em / /

Parte da tese de doutorado do primeiro autor. Universidade Federal Rural de Pernambuco (2009). Pesquisa financiada pelo CNPq

² Eng. Agrônoma, M. Sc. em Fitossanidade, Dep. Agronomia, UFRPE, bolsista do CNPq, costa@yahoo.com.br

³ Eng. Agrônomo, Dr. em Fitopatologia Dep. Fitopatologia, UFV, bolsista do CNPq, rbrainer@yahoo.com

⁴ Eng. Agrônomo, Dr., Prof. do Dep. Agronomia, Área Fitopatologia, UFRPE, CEP 52171-900, Recife, PE, (81) 3320-6205, sami@depa.ufrpe.br

⁵ Eng. Agrônomo, Dr., Prof. do Dep. Agronomia, Área Fitopatologia, UFRPE, mcamara@depa.ufrpe.br

22 de 25 e 30 °C. Não foi constatado o desenvolvimento de sintomas nos frutos inoculados
23 com *B. dothidea* quando eles foram mantidos nas três temperaturas avaliadas durante o
24 período de avaliação. Os isolados de *L. theobromae* e *N. parvum* foram patogênicos
25 quando inoculados em frutos sadios de mangueira, mamoeiro, abacateiro e bananeira. Os
26 isolados de *B. dothidea* só não foram patogênicos em frutos de bananeira.

27 **Palavras-chave** - Umidade. Temperatura. *Lasiodiplodia theobromae*. *Botryosphaeria*
28 *dothidea*. *Neofusicoccum parvum*.

29

30 **Abstract** - Dieback and stem-end rot in trees and fruits of mango associated to the species
31 of Botryosphaeriaceae, *Lasiodiplodia theobromae*, *Botryosphaeria dothidea* and
32 *Neofusicoccum parvum*, is a problem for the agricultural regions of Brazil. The order was
33 to evaluate the influence of humidity (0 and 72 h in moist chamber) and temperature (25,
34 30 and 35 °C) in the severity of stem-end rot in fruits of mango and the susceptibility of
35 different fruits (mango, papaya, avocado and banana) to the species of Botryosphaeriaceae
36 associated with this disease. Mango fruits were inoculated with 15 isolates, five isolates of
37 each of the three species of Botryosphaeriaceae. The humidity and temperature
38 significantly influenced the severity of stem-end rot in fruits of mango. The fruits of
39 mango inoculated with *L. theobromae* developed symptoms of stem-end rot regardless of
40 the presence of a moist chamber and inoculated with *B. dothidea* and *N. parvum* showed
41 symptoms only when they were exposed to a period of 72 h in a moist chamber. The
42 greatest lesions caused by both *L. theobromae* and by *N. parvum* were observed in fruits
43 kept at temperatures of 25 and 30 °C. It was not observed the development of symptoms in
44 the fruits inoculated with *B. dothidea* when they were maintained at the three temperatures
45 evaluated during the evaluation period. The isolates of *L. theobromae* and *N. parvum* were

46 pathogenic when inoculated in healthy fruit of mango, papaya, avocado and banana. The
47 isolates of *B. dothidea* were not pathogenic on fruits of banana.

48 **Key words** - Humidity. Temperature. *Lasiodiplodia theobromae*. *Botryosphaeria*
49 *dothidea*. *Neofusicoccum parvum*.

50

51 **Introdução**

52 A cultura da mangueira (*Mangifera indica* L.) é de grande importância econômica
53 para o Brasil. Dentre as regiões produtoras, o Nordeste destaca-se com uma produção de
54 1.272.184 t numa área de 79.246 ha (IBGE, 2007). Os estados da Bahia e Pernambuco,
55 principais exportadores, foram responsáveis pela comercialização de 95,4 mil toneladas de
56 manga no mercado internacional em 2008 (IBRAF, 2008).

57 A morte descendente e podridão peduncular, doenças de ocorrência em plantas e
58 frutos, respectivamente, são associadas às espécies de Botryosphaeriaceae, *Lasiodiplodia*
59 *theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not. e
60 *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips. Nos
61 últimos anos, ambas tem aumentado de intensidade no campo e em pós-colheita, o que
62 elevou estes patógenos à condição de um dos grandes problemas da cultura (JOHNSON,
63 1994b; TAVARES, 2002; SLIPPERS et al., 2005; NIETO-ANGEL et al., 2006b). Essas
64 espécies são cosmopolitas, com ampla distribuição geográfica e larga gama de hospedeiros
65 (TAVARES, 2002; GURE et al., 2005; SLIPPERS et al., 2005; CROUS et al., 2006).

66 Além da mangueira, espécies de *Botryosphaeria* têm sido reportadas em outras
67 culturas de importância sócio-econômica tais como, abacateiro (*Persea americana* Mill.),
68 bananeira (*Musa* spp.), citros (*Citrus* spp.), coqueiro (*Cocos nucifera* L.), gravioleira
69 (*Annona muricata* L.), mamoeiro (*Carica papaya* L.), videira (*Vitis* sp.), dentre outras

70 (HARTILL, 1991; TAVARES, 2002; FREIRE et al., 2004; PESSOA;OLIVEIRA, 2006;
71 ÚRBEZ-TORREZ et al., 2006).

72 A espécie *L. theobromae* tem sido considerada como um patógeno ocasional de
73 plantas estressadas (FREIRE et al., 2004). Nas Regiões Semi-Áridas, onde as condições
74 ambientais favorecem ao seu desenvolvimento, a morte descendente e a podridão
75 peduncular vêm se constituindo em um sério problema (SANTOS FILHO et al., 2002,
76 TAVARES;COSTA, 2002). Vale ressaltar que ainda não existem dados epidemiológicos
77 para as espécies, *B. dothidea* e *N. parvum* associadas à morte descendente e podridão
78 peduncular em mangueira no Brasil.

79 A influência de fatores ambientais no desenvolvimento de doenças fúngicas tem sido
80 objeto de estudo por diversos autores em outras culturas (ARAUZ;SUTTON, 1989;
81 MICHAILIDES;MORGAN, 1992; SILVEIRA et al., 2001; MILA et al., 2005;
82 VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2005). O conhecimento dos efeitos da temperatura e
83 da umidade no desenvolvimento de doença em vários hospedeiros torna possível prevenir
84 uma epidemia através do uso de estratégias mais eficientes de controle (MICHAILIDES;
85 MORGAN, 1992). Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da
86 umidade e temperatura na severidade da podridão peduncular em frutos de mangueira e a
87 suscetibilidade de diferentes frutos às espécies de Botryosphaeriaceae associadas a esta
88 doença.

89

90 **Material e métodos**

91 **1. Obtenção de isolados de Botryosphaeriaceae spp. e inoculação**

92 Foram utilizados 15 isolados de Botryosphaeriaceae spp., sendo cinco isolados de
93 cada espécie (*L. theobromae*, *B. dothidea* e *N. parvum*), obtidos de plantas e frutos de
94 mangueira var. Tommy Atkins, com sintomas característicos de morte descendente e

95 podridão peduncular, coletados em plantios comerciais do Vale do São Francisco e Vale do
 96 Assú, em 2006 e 2007 (Tabela 1). Os isolados foram previamente caracterizados e estão
 97 depositados na coleção de culturas de fungos fitopatogênicos "Prof. Maria Menezes"
 98 (CMM) da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

99 **Tabela 1** - Isolados de Botryosphaeriaceae spp. obtidos a partir de ramos e frutos de
 100 mangueira (var. Tommy Atkins), localizados em pomares da região Nordeste do Brasil
 101

Isolado	Espécie	Órgão da planta	Origem
CMM-1271	<i>Neofusicoccum parvum</i>	Ramo	Petrolina/PE, Brasil
CMM-1276	<i>N. parvum</i>	Ramo	Casa Nova/BA, Brasil
CMM-1317	<i>N. parvum</i>	Ramo	Petrolina/PE, Brasil
CMM-1380	<i>N. parvum</i>	Fruto	Casa Nova/BA, Brasil
CMM-1381	<i>N. parvum</i>	Fruto	Casa Nova/BA, Brasil
CMM-1302	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Ramo	Petrolina/PE, Brasil
CMM-1319	<i>B. dothidea</i>	Ramo	Petrolina/PE, Brasil
CMM-1327	<i>B. dothidea</i>	Ramo	Petrolina/PE, Brasil
CMM-1351	<i>B. dothidea</i>	Ramo	Petrolina/PE, Brasil
CMM-1389	<i>B. dothidea</i>	Fruto	Casa Nova/BA, Brasil
CMM-1472	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Ramo	Petrolina/PE, Brasil
CMM-1485	<i>L. theobromae</i>	Ramo	Petrolina/PE, Brasil
CMM-1510	<i>L. theobromae</i>	Ramo	Petrolina/PE, Brasil
CMM-1516	<i>L. theobromae</i>	Ramo	Afonso Bezerra/RN, Brasil
CMM-1543	<i>L. theobromae</i>	Ramo	Ipanguaçú/RN, Brasil

102

103 2. Epidemiologia comparativa

104 Os procedimentos de desinfestação e inoculação de frutos adotados foram os mesmos
 105 em todos os experimentos, descritos brevemente. Antes da inoculação, frutos da var.
 106 Tommy Atkins, estágio de maturação três (ASSIS, 2004), foram lavados com água e sabão
 107 e desinfestados pela imersão dos mesmos em solução de NaClO 1,5% por 5 min, seguida
 108 de lavagem com água destilada e secagem em temperatura ambiente. A inoculação foi
 109 realizada por meio da deposição de discos de BDA (Batata-Dextrose-Ágar), contendo
 110 estruturas fúngicas dos patógenos, sobre quatro pontos equidistantes na superfície do fruto,
 111 previamente feridos, com perfurações de 3 mm de profundidade por meio de uma almofada
 112 com alfinetes desinfestados. Esse método de inoculação justifica-se pela dificuldade de
 113 esporulação dos patógenos.

114 A variável analisada foi a severidade da podridão em cada ponto de inoculação,
115 realizada 72 h após a inoculação. Para isso, mensurou-se o diâmetro das lesões externas
116 (mm) em dois sentidos diametralmente opostos.

117 **2.1. Influência da umidade na severidade da podridão peduncular em frutos de** 118 **mangueira**

119 Frutos inoculados foram submetidos a dois tratamentos, com e sem câmara úmida. A
120 condição com câmara úmida foi propiciada pelo acondicionamento dos frutos em bandejas
121 forradas com papel toalha umedecido com água destilada, sendo o conjunto bandeja/fruto
122 envolvido por saco de polietileno previamente umedecido. O delineamento experimental
123 foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2x15, representado por duas condições de
124 umidade e 15 isolados dos patógenos, com quatro repetições, sendo cada repetição
125 constituída de um fruto inoculado em quatro pontos.

126 **2.2. Influência da temperatura na severidade da podridão peduncular em frutos de** 127 **mangueira**

128 Frutos inoculados, mantidos em condição de câmara úmida, foram acondicionados
129 em diferentes temperaturas, 25, 30 e 35 °C, em incubadora do tipo B.O.D. (Biochemistry
130 Oxygen Demand). Após 48 h, as câmaras úmidas foram retiradas e os frutos mantidos nas
131 respectivas temperaturas até a avaliação. O delineamento experimental foi inteiramente
132 casualizado, em arranjo fatorial 3x15, representado por três temperaturas e 15 isolados dos
133 patógenos, com quatro repetições, sendo cada repetição constituída de um fruto inoculado
134 em quatro pontos.

135 **3. Suscetibilidade de diferentes frutos as espécies de Botryosphaeriaceae associadas à** 136 **podridão peduncular**

137 Frutos sadios de mangueira (var. Tommy Atkins), mamoeiro (var. Gold), abacateiro
138 (var. Fortuna) e bananeira (var. Pacovan) foram avaliados quanto a suscetibilidade aos

139 isolados de Botryosphaeriaceae spp.. Os procedimentos de desinfestação e inoculação dos
140 frutos foram os mesmos descritos para manga (item 2). Após a inoculação, os frutos foram
141 submetidos à câmara úmida por 48 h. O delineamento experimental foi inteiramente
142 casualizado, em arranjo fatorial 4x15, representado por quatro hospedeiros e 15 isolados
143 dos patógenos, com quatro repetições, sendo cada repetição constituída de um fruto
144 inoculado em quatro pontos. Exceto para os frutos de bananeira, onde cada repetição foi
145 constituída por dois frutos inoculado em dois pontos.

146 **4. Análises de dados**

147 Os dados obtidos nos experimentos de umidade e temperatura foram submetidos à
148 análise de variância e a separação de médias efetuada pelo teste de Tukey (P=0,05). Os
149 dados do experimento de suscetibilidade de diferentes frutos às espécies de
150 Botryosphaeriaceae foram submetidos ao teste separação de médias por meio do teste não-
151 paramétrico Mann-Whitney (P=0.05). Todas as análises foram realizadas com auxílio do
152 programa SAEG 9.01 (Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas, Universidade Federal
153 de Viçosa, Viçosa – MG, 2005) e do SAS 8.0 (SAS Institute Inc., Cary – NC, USA. 2002).

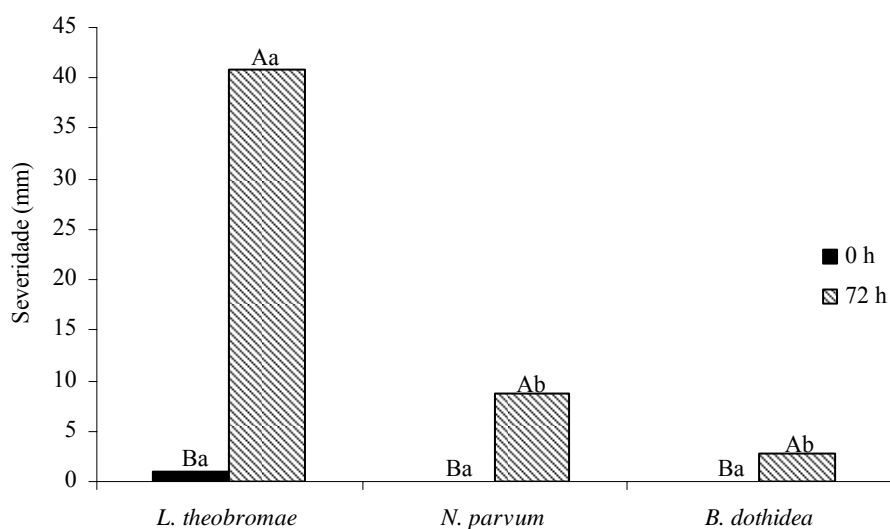
154

155 **Resultados e discussão**

156 A umidade e temperatura influenciaram significativamente a severidade da podridão
157 peduncular causada pelas espécies de Botryosphaeriaceae. Foram constatadas diferenças
158 significativas na severidade da podridão peduncular entre as espécies nas diferentes
159 condições de umidade e temperaturas, bem como verificada interações significativas entre
160 as espécies e as condições de umidade e temperatura analisadas.

161 Os frutos de manga inoculados com *L. theobromae* desenvolveram sintomas de
162 podridão independente da presença de câmara úmida. No entanto, o prolongamento da
163 mesma favoreceu a severidade da doença (Figura 1). Não foi necessária água livre na

164 superfície dos frutos para a penetração no hospedeiro, o que evidencia, que apenas a água
 165 liberada após a realização do ferimento foi suficiente para o estabelecimento do processo
 166 de infecção, como já constatado em outros patossistemas (SILVEIRA et al., 2001). Por
 167 outro lado, a alta umidade favoreceu o processo de infecção por este patógeno. Neste
 168 contexto, é importante ressaltar que as mangas exportadas passam por um processo de pré-
 169 resfriamento, onde a umidade relativa do ar deve ser mantida entre 85 e 95% para evitar
 170 perda de água nos frutos (ALVES et al., 2002). Segundo Chitarra e Chitarra (2005), o
 171 elevado teor de umidade relativa, embora ajude a manter a turgidez e reduzir a perda de
 172 água no fruto, pode ser favorável ao desenvolvimento de doença. Os resultados mostram
 173 que este processo de pré-resfriamento pode favorecer a doença com um aumento da
 174 severidade.



184 **Figura 1** - Influência da umidade na severidade (mm) da podridão peduncular em frutos de
 185 manga causada por Botryosphaeriaceae spp. 72 h após a inoculação. Colunas com a
 186 mesma letra maiúscula não diferem entre si dentro de espécies pelo teste de Tukey
 187 ($P=0,05$); colunas com a mesma letra minúscula não diferem entre si dentro de cada
 188 tratamento entre espécies pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

189 O desenvolvimento de sintomas nos frutos de mangueiras inoculados com *B.*
190 *dothidea* e *N. parvum* só foi observado quando os mesmos foram expostos a um período de
191 72 h de câmara úmida (Figura 1). O período de umidade para o desenvolvimento de doença
192 varia dependendo do patossistema. Em estudos envolvendo espécies de *Neofusicoccum* em
193 pistachio (*Pistacia vera* L.) foi necessário um período de no mínimo nove a 12 h de
194 umidade contínua para o desenvolvimento de sintomas, sendo a severidade da doença
195 favorecida pela condição de 72 h de umidade contínua (MICHAILIDES; MORGAN, 1992;
196 MILA et al., 2005). Já em maçã (*Malus domestica* Borkh.), a maior incidência da podridão
197 branca causada por *B. dothidea* ocorreu quando foi utilizado um período de incubação de
198 48 h, sendo a avaliação realizada 12 dias após a inoculação (VALDEBENITO-
199 SANHUEZA et al., 2005). Conforme Michailides (1991), este patógeno necessita de um
200 período de 12 h ou mais de umidade contínua para penetração e, conseqüentemente, causar
201 infecção através de lenticelas em frutos ou ferimentos. Sob este aspecto Valdebenito-
202 Sanhueza et al. (2005) levantaram a hipótese de que os conídios de *B. dothidea* são
203 dependentes de nutrientes exógenos para germinar sendo provável que o estímulo do
204 período de câmara úmida ocorra pela acumulação de exsudados da fruta nessa condição.
205 Nesse estudo, onde foi utilizado disco de BDA contendo estruturas fúngicas, a acumulação
206 de exsudados pode ter tido um efeito semelhante, estimulando *B. dothidea* e *N. parvum*.

207 As maiores lesões ocasionadas tanto por *L. theobromae* como por *N. parvum* foram
208 observadas nos frutos mantidos nas temperaturas de 25 e 30 °C (Figura 2). Esses resultados
209 corroboram com a informação de Nieto-Angel et al. (2006b). De acordo com esses autores,
210 a temperatura ótima para a infecção da podridão peduncular em manga é 28 °C.

211

212

213

214

215

216

217

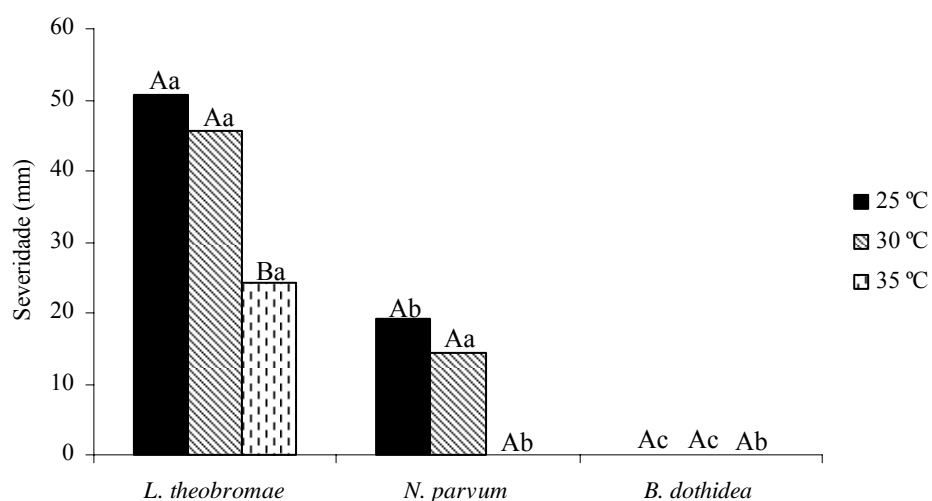
218

219

220

221

222



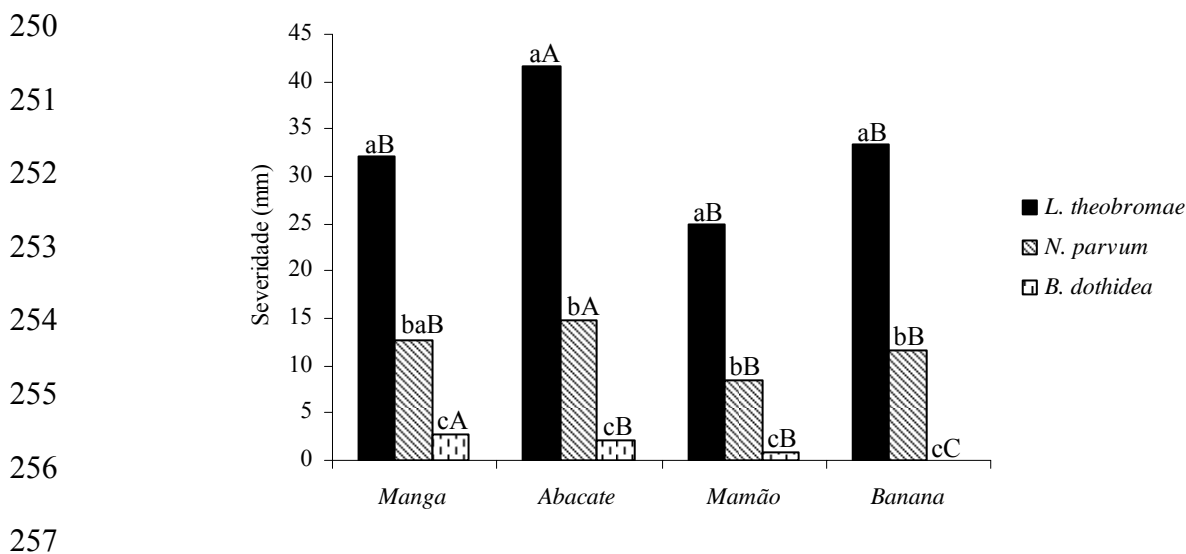
223 **Figura 2** - Influência da temperatura na severidade (mm) da podridão peduncular em
 224 frutos de manga causada por Botryosphaeriaceae spp. 72 h após a inoculação. Colunas
 225 com a mesma letra maiúscula não diferem entre si dentro de espécies pelo teste de Tukey
 226 ($P=0,05$); colunas com a mesma letra minúscula não diferem entre si dentro de cada
 227 tratamento entre espécies pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

228

229 Quando *L. theobromae* e *N. parvum* estão presentes na infecção, *L. theobromae*
 230 predomina sob *N. parvum* a 30 °C, enquanto *N. parvum* predomina a ≤ 25 °C (Johnson,
 231 1994b; Nieto-Angel et al., 2006b). O que pode ser constatado nesse estudo, embora os
 232 patógenos não tenham sido inoculados simultaneamente, uma vez que na temperatura de
 233 25 °C a severidade da podridão peduncular causada por *N. parvum* foi maior. Enquanto na
 234 temperatura de 35 °C não foi observado o desenvolvimento de lesões nos frutos inoculados
 235 por este patógeno. Não houve diferença significativa na severidade da podridão causada
 236 por *L. theobromae* nas temperaturas de 25 e 30 °C, sendo verificada uma diminuição na
 237 severidade da podridão causada por este patógeno na temperatura de 35 °C (Figura 2).

238 Não foi constatado o desenvolvimento de sintomas nos frutos inoculados por *B.*
 239 *dothidea* quando mantidos nas três temperaturas durante o período de avaliação (Figura 2).
 240 Oliveira (2008) verificou que isolados de *Neofusicoccum* spp. só passaram a exibir
 241 sintomas 120 h após a inoculação em manga, evidenciando que pode ter havido tempo
 242 insuficiente para o patógeno causar podridão.

243 Quanto à suscetibilidade de diferentes frutos às espécies de Botryosphaeriaceae
 244 associadas à podridão peduncular, foram constatadas diferenças significativas na
 245 suscetibilidade de diferentes frutos às espécies de Botryosphaeriaceae, bem como
 246 verificada interação significativa entre os frutos e as espécies. Os isolados de *L.*
 247 *theobromae* e *N. parvum* foram patogênicos quando inoculados em frutos sadios de
 248 mangueira, mamoeiro, abacateiro e bananeira. Os isolados de *B. dothidea* só não foram
 249 patogênicos em frutos de bananeira (Figura 3).



258 **Figura 3** - Suscetibilidade de diferentes frutos a espécies de Botryosphaeriaceae quanto à
 259 severidade (mm) da podridão 72 h após a inoculação. Colunas com a mesma letra
 260 maiúscula não diferem entre si dentro de cada fruto pelo teste de Mann-Whitney ($P=0.05$);
 261 colunas com a mesma letra minúscula não diferem entre si dentro de cada tratamento entre
 262 frutos pelo teste Mann-Whitney ($P=0.05$).

263 Os sintomas em manga foram caracterizados por lesões úmidas que evoluíram para
264 lesões de coloração marrom e resultaram em podridão dos frutos. Em mamão, lesões
265 marrom-escuras, sendo circundadas por uma área aquosa e cobertas por um micélio cinza.
266 Em abacate e banana, lesões marrom-escuras.

267 As maiores lesões nos frutos avaliados foram causadas por *L. theobromae*, exceto
268 em manga (Figura 3). Segundo Freire et al. (2004) houve um aumento na severidade do
269 ataque de *L. theobromae* em hospedeiros como mangueira, mamoeiro e abacateiro. A
270 bananeira também tem sido relatada como hospedeira desse patógeno (TAVARES, 2002;
271 PESSOA; OLIVEIRA, 2006). Na literatura *B. dothidea* e *N. parvum* também têm sido
272 relatados como patógenos de abacate (HARTILL, 1991; JOHNSON, 1994a; NIETO-
273 ANGEL et al., 2006a), não havendo relatos dos mesmos em mamão e banana.

274 Os isolados de *L. theobromae* e *N. parvum* não desenvolveram as maiores lesões em
275 manga, seu hospedeiro de origem, apenas *B. dothidea*. Esta observação é concordante com
276 o observado por Pereira et al. (2006), onde o isolado de *L. theobromae* de manga mostrou-
277 se mais agressivo a caju (*Anacardium occidentale* L.). O que pode ser explicado pelo fato
278 de *L. theobromae* ser um fungo não especializado, apresentando uma gama de mais de 500
279 espécies vegetais hospedeiras em regiões tropicais e subtropicais (RODRIGUES et al.,
280 2004; BURGESS et al., 2006).

281 A espécie *B. dothidea* causou as menores lesões em todos os frutos avaliados (Figura
282 3). Estes resultados evidenciam a pouca agressividade deste patógeno em relação às outras
283 duas espécies de Botryosphaeriaceae estudadas.

284 Os resultados desse estudo só confirmam o já relatado na literatura em relação às
285 espécies de Botryosphaeriaceae, *L. theobromae*, *B. dothidea* e *N. parvum*, que as mesmas
286 são cosmopolitas, com ampla distribuição geográfica e larga gama de hospedeiros
287 (TAVARES, 2002; GURE et al., 2005; SLIPPERS et al., 2005; CROUS et al., 2006) e que

288 um mesmo isolado é capaz de infectar diferentes hospedeiros (VARMA;BILGRAMI,
289 1977). Apesar desse estudo ter sido realizado em condições de laboratório, onde todas as
290 condições foram favoráveis aos patógenos em estudo, a dispersão dessas espécies de
291 Botryosphaeriaceae analisadas entre mangueira, mamoeiro, abacateiro e bananeira pode
292 representar uma ameaça e deve, portanto ser investigada. Visto que essas culturas também
293 são cultivadas nos pólos de fruticultura irrigada que cultivam mangas na região Nordeste,
294 Vale do São Francisco e Vale do Assú.

295

296 **Conclusões**

- 297 1. Não há necessidade de umidade para *L. theobromae* iniciar o processo de infecção em
298 frutos de mangueira;
- 299 2. A umidade foi um fator determinante no desenvolvimento de podridão, causado por *N.*
300 *parvum* e *B. dothidea*;
- 301 3. Temperaturas de 25 e 30 °C favorecem o desenvolvimento de podridão em frutos de
302 mangueira, causado por *L. theobromae* e *N. parvum*;
- 303 4. *Lasiodiplodia theobromae* e *N. parvum* foram patogênicos em frutos de mangueira,
304 mamoeiro, abacateiro e bananeira;
- 305 5. *Botryosphaeria dothidea* só não foi patogênico em frutos de bananeira.

306

307 **Agradecimentos**

308 Os autores expressam seus agradecimentos ao Conselho Nacional de
309 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro (Proc.
310 140896/2005-8).

311

312 **Referências**

- 313 ALVES, R. E. et al. Colheita e pós-colheita. In: GENÚ, P. J. C.; PINTO, C. A. Q. **A**
314 **Cultura da mangueira**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. cap. 17, p.381-
315 405.
- 316 ARAUZ, L. F.; SUTTON, T. B. Temperature and wetness duration requirements for apple
317 infection by *Botryosphaeria obtuse*. **Phytopathology**, v. 79, n. 04, p. 440-444, 1989.
- 318 ASSIS, J. S. Colheita e pós-colheita. In: MOUCO, M. A. C. **Cultivo da mangueira**.
319 Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2004. Disponível em: <
320 http://www.cpsa.embrapa.br/sistema_producao/spmanga/colheita.htm>. Acesso em: 20
321 jan. 2009.
- 322 BURGESS, T. I. et al. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on
323 DNA sequence comparisons and morphology. **Mycologia**, v. 98, n. 03, p. 423-435, 2006.
- 324 CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e**
325 **manuseio**. Lavras: Editora de Universidade Federal de Lavras, 2005. 785p.
- 326 CROUS, P. W. et al. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. **Studies in**
327 **Mycology**, v. 55, n. 01, p. 235-253, 2006.
- 328 FREIRE, F. C. O. et al. **Novos hospedeiros do fungo *Lasiodiplodia theobromae* no**
329 **estado do Ceará**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2004. 6 p. (Comunicado
330 Técnico, 91).
- 331 GURE, A.; SLIPPERS, B.; STENLID, J. Seed-borne *Botryosphaeria* spp. from native
332 *Prunus* and *Podocarpus* trees in Ethiopia, with a description of the anamorph *Diplodia*
333 *rosulata* sp. nov. **Mycological Research**, v. 109, n. 09, p. 1005-1014, 2005.
- 334 HARTILL, W. F. T. Post-harvest diseases of avocado fruits in New Zeland. **New Zeland**
335 **Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 19, p. 297-304, 1991.
- 336 IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em:
337 <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda>>. Acesso em 10 jan. 2009.

- 338 IBRAF. INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. Disponível em:<
339 [http://www.ibraf.org.br/estatisticas/Exportação/Comparativo_das_Exportações_Brasileiras](http://www.ibraf.org.br/estatisticas/Exportação/Comparativo_das_Exportações_Brasileiras_de_Frutas_frescas_Jan_Out_2008.pdf)
340 [_de_Frutas_frescas_Jan_Out_2008.pdf](http://www.ibraf.org.br/estatisticas/Exportação/Comparativo_das_Exportações_Brasileiras_de_Frutas_frescas_Jan_Out_2008.pdf)>. Acesso em: 16 jan. 2009.
- 341 JOHNSON, G. I. Dothiorella stem canker and fruit . In: PLOETZ, R. C. et al.
342 **Compendium of tropical fruit diseases**. St. Paul: American Phytopathological Society,
343 1994a. p.76.
- 344 JOHNSON, G. I. Mango diseases caused by fungi. IN: PLOETZ, R. C. et al.
345 **Compendium of tropical fruit diseases**. St. Paul: American Phytopathological Society,
346 1994b. p.39-41.
- 347 MICHAILIDES, T. J. Pathogenicity, distribution, sources of inoculum, and infection
348 courtes of *Botryosphaeria dothidea* on pistachio. **Phytopathology**, v. 81, n. 05, p. 566-573,
349 1991.
- 350 MICHAILIDES, T. J.; MORGAN, D. P. Effects of temperature and wetness duration on
351 infection of pistachio by *Botryosphaeria dothidea* and management of disease by reducing
352 duration of irrigation. **Phytopathology**, v. 82, n. 12, p. 1399-1406, 1992.
- 353 MILA, A. L. et al. Effects of latent infection, temperature, precipitation, and irrigation on
354 panicle and shoot blight of pistachio in California. **Phytopathology**, v. 95, n. 08, p. 926-
355 932, 2005.
- 356 NIETO-ANGEL, D. et al. Enfermedades del aguacate. In: Oliveira, S. M. A. et al.
357 **Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**. Brasília: Embrapa
358 Informação Tecnológica, 2006a. cap. 18, p.473-491.
- 359 NIETO-ANGEL, D. et al. Enfermedades del mango. In: OLIVEIRA, S. M. A. et al.
360 **Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**. Brasília: Embrapa
361 Informação Tecnológica, 2006b. cap. 28, p.731-774.

- 362 OLIVEIRA, T. A. S. **Podridão peduncular em manga ocasionada por *Lasiodiplodia***
363 ***theobromae*, *Fusicoccum ribis* e *F. parvum* em pós-colheita.** 2008. 45 f. Dissertação
364 (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- 365 PEREIRA, A. L.; SILVA, G. S.; RIBEIRO, V. Q. Caracterização fisiológica, cultural e
366 patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**,
367 v. 31, n. 06, p. 572-578, 2006.
- 368 PESSOA, W. R. L. S.; OLIVEIRA, S. M. A. Doenças da banana. In: OLIVEIRA, S. M. A.
369 et al. **Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais.** Brasília: Embrapa
370 Informação Tecnológica, 2006. cap. 21, p.539-553.
- 371 RODRIGUES, R.; PARADELA FILHO, O.; RIBEIRO, I. J. A. Caracterização
372 morfológica e patológica de *Lasiodiplodia theobromae*, agente causal da podridão do
373 tronco e raízes de videira, **Summa Phytopathologica**, v. 30, n. 01, p. 43-50, 2004.
- 374 SANTOS FILHO, H. P. et al. Doenças, monitoramento e controle. In: GENÚ, P. J. C.;
375 PINTO, C. A. Q. **A Cultura da mangueira.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica,
376 2002. cap. 15, p.299-352.
- 377 SILVEIRA, N. S. S. et al. Influência da temperatura, período de molhamento e
378 concentração do inóculo de fungos na incidência de podridões pós-colheita em frutos de
379 tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 01, p. 33-38, 2001.
- 380 SLIPPERS, B. et al. Phylogenetic and morphological re-evaluation of the *Botryosphaeria*
381 species causing diseases of *Mangifera indica*. **Mycologia**, v. 97, n. 01, p. 99-110, 2005.
- 382 TAVARES, S. C. C. H. Epidemiologia e manejo integrado de *Botryodiplodia theobromae*
383 - situação atual no Brasil e no mundo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 46-52, 2002.
- 384 TAVARES, S. C. C. H.; COSTA, V. S. O. **Metodologia de amostragem e nível de ação**
385 **para as principais doenças da mangueira no Vale do São Francisco.** Petrolina:
386 Embrapa Semi-Árido, 2002. 6 p. (Circular Técnica, 73).

- 387 ÚRBEZ-TORRES, J. R. et al. Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp.
388 associated with grapevine cankers in California. **Plant Disease**, v. 90, n. 12, p.1490-1503,
389 2006.
- 390 VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. et al. Detecção e epidemiologia da podridão branca
391 da maçã. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 03, p. 217-223, 2005.
- 392 VARMA, V.; BILGRAMI, K. S. New host records of *Botryodiplodia theobromae*. **Indian**
393 **Phytopathology**, v. 30, n. 04, p. 579, 1977.

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

- *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum* e *Lasiodiplodia theobromae* são os agentes causais da morte descendente e podridão peduncular em mangueira no Nordeste do Brasil;
- Análises filogenéticas das seqüências de DNA permitiram a confirmação da identificação morfológica de *L. theobromae*, *B. dothidea* e *N. parvum*;
- Essa é a primeira ocorrência de *B. dothidea* e *N. parvum* associados à morte descendente e podridão peduncular em mangueira no Brasil;
- *Botryosphaeria dothidea* e *N. parvum* foram as espécies prevalentes no Vale do São Francisco, enquanto *L. theobromae* prevaleceu no Vale do Assú;
- Quando inoculadas em frutos de mangueira da variedade Tommy Atkins, *L. theobromae* e *N. parvum* mostraram maior agressividade quando comparadas com *B. dothidea*;
- Não há necessidade de umidade para *L. theobromae* iniciar o processo de infecção em frutos de mangueira;
- A umidade foi um fator determinante no desenvolvimento de podridão, causado por *N. parvum* e *B. dothidea*;
- Temperaturas de 25 e 30 °C favorecem o desenvolvimento de podridão em frutos de mangueira, causado por *L. theobromae* e *N. parvum*;
- *Lasiodiplodia theobromae* e *N. parvum* foram patogênicos em frutos de mangueira, mamoeiro, abacateiro e bananeira;
- *Botryosphaeria dothidea* só não foi patogênico em frutos de bananeira.