

**MARIOTE DOS SANTOS BRITO NETTO**

**ESPÉCIES DE *Lasiodiplodia* ASSOCIADAS À  
PODRIDÃO PEDUNCULAR EM MAMÃO  
NO NORDESTE DO BRASIL**

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

**COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:**

**Prof. Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara (UFRPE) – Orientador**

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

**Prof. Dr. Iraíldes Perreira Assução (UFAL) – Co-orientador**

**RECIFE-PE  
SETEMBRO – 2012**

**ESPÉCIES DE *Lasiodiplodia* ASSOCIADAS À PODRIDÃO PEDUNCULAR EM  
MAMÃO NO NORDESTE DO BRASIL**

**MARIOTE DOS SANTOS BRITO NETTO**

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 31/07/2012

**ORIENTADOR:**

---

Prof. PhD. Marcos Paz Saraiva Câmara (UFRPE)

**EXAMINADORES:**

---

Dr<sup>a</sup>. Waléria Guerreiro Lima

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sônia Maria Alves de Oliveira

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina Maria Souza Motta

**RECFE-PE  
SETEMBRO – 2012**

*“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-se em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua diante de meus olhos.”*

(Isaac Newton)

À minha mãe Rozanilda Melo Brito Cardoso e ao meu pai Cícero da Silva Cardoso, pelos ensinamentos, educação, apoio e paciência, pela compreensão dos momentos mais complicados e pelo incentivo em prosseguir.

À meu irmão Leonardo Melo Brito Cardoso, minha tia Maria José Cardoso e minha avó Cícera, que mesmo distantes, fizeram-se presentes.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente Deus por seu amor eterno e incondicional, e por possibilitar todas as minhas conquistas, aos meus pais Cícero da Silva Cardoso e Rozanilda Mele Brito Cardoso por todo amor;*

*Ao professor Dr. Marcos Câmara pela orientação;*

*Ao Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pelo apoio institucional e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos;*

*A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da UFRPE em especial ao professor Dr. Sami Michereff pelos ensinamentos transmitidos, aos professores do CECA Gaus Silvestre de Andrade Lima, Iraildes Perreira Assução e Maria de Fátima Muniz;*

*Sinceros agradecimentos à Waléria Guerreiro, Marília Marque, Nelson Bernardi*

*A todos os amigos de turma pelos momentos compartilhados, em especial para Mayumi Inokuti, Rômulo Diniz, Willie Anderson, Kamila Câmara, João Victor, Ana Paula Oliveira, Susan Tsuji, Alice e Natália Monique;*

*Aos amigos Sheila, Marília, Mayra, Sarah, Joyce, Aline, Roberto, Arthur, Cleia, Kátia, Edlene, Liliane, Nayana, Helloá, Claudeana, Moara, Jackeline, Wilson Junior pela atenção em momentos especiais;*

*Aos funcionários Darcy Martins e Romildo Angeiras pela colaboração;*

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

## SUMÁRIO

	<b>página</b>
AGRADECIMENTOS .....	iii
SUMÁRIO.....	iv
RESUMO GERAL .....	v
GENERAL ABSTRACT .....	vi
CAPÍTULO I – Introdução geral .....	1
1. A cultura do mamoeiro .....	1
2. Podridão Peduncular .....	2
3. Família Botryosphaeriaceae .....	3
4. Filogenia .....	8
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	11
CAPÍTULO II – Espécies de <i>Lasiodiplodia</i> associadas à podridão peduncular em mamão no Nordeste do Brasil .....	17
RESUMO.....	17
ABSTRACT .....	18
INTRODUÇÃO .....	18
MATERIAL E MÉTODOS .....	20
RESULTADOS .....	25
DISCUSSÃO .....	28
AGRADECIMENTOS .....	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	31
CONCLUSÕES GERAIS .....	51

## RESUMO GERAL

A identidade das espécies de *Lasiodiplodia* causando podridão peduncular em mamão é revelada. No presente estudo espécies de *Lasiodiplodia* isoladas de mamão no Nordeste do Brasil são descritas, bem como, a sua distribuição em sete diferentes populações. Os isolados de *Lasiodiplodia* foram caracterizados por inferência filogenética baseada na sequência completa da região ITS e na sequência parcial do gene fator de alongamento, pelas características culturais e morfológicas, bem como pela patogenicidade e virulência. Três espécies previamente descritas foram identificadas (*L. theobromae*, *L. pseudotheobromae*, *L. hormozganensis*) juntamente com uma espécie desconhecida. *Lasiodiplodia theobromae* foi a espécie mais prevalente em todas as populações. Todas as espécies de *Lasiodiplodia* foram patogênicas.

**Palavras chave:** abordagem polifásica, distribuição, EF-1 $\alpha$ , filogenia, ITS

## GENERAL ABSTRACT

The identity of *Lasiodiplodia* species in causing stem-end rot papaya is reveal. In the current study the *Lasiodiplodia* species isolated from papaya in Northeastern Brazil are described, as well as their distribution in seven different populations. *Lasiodiplodia* isolates are characterized through cultural, morphological, patogenicity and virulence data, and from phylogenetic analyses based on the complete sequence of the ITS region and partial sequence of the translation elongation factor-1 $\alpha$  gene. Based on sequence data, three previously described species were identified (*Lasiodiplodia theobromae*, *L. pseudotheobromae*, *L. hormozganensis*) together with one unknown species. *L. theobromae* was the most prevalent species in all populations. All *Lasiodiplodia* species were pathogenic.

**Keywords:** distribution, EF-1 $\alpha$ , ITS, phylogeny, polyphasic approach

# Capítulo I

---

---

## Introdução Geral



# ESPÉCIES DE *Lasiodiplodia* ASSOCIADAS À PODRIDÃO PEDUNCULAR EM MAMÃO NO NORDESTE DO BRASIL

## Cultura do Mamoeiro

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) pertencente à família Caricaceae é uma planta herbácea de grandes dimensões com um caule ereto podendo tornar-se multi-caule quando danificado. Possui uma coroa de folhas grandes e palmadas emergindo do ápice do tronco. Esta planta produz frequentemente vários ramos se forem deixadas crescer durante mais de quatro ou cinco anos, como no caso de mamoeiros de quintal. O caule é oco, a casca é lisa e tem cicatrizes foliares proeminentes. Pecíolos de folhas maduras se prolongam horizontalmente a partir da haste principal e apresentam cerca de 45-70 cm de comprimento, dependendo da cultivar. Em condições ideais, as árvores podem chegar a 8-10 metros de altura (NISHIJIMA et al, 1998).

As cultivares de mamoeiro mais utilizadas no Brasil são classificadas em dois grupos conforme o tipo de fruto: “Solo” e “Formosa”. As cultivares do grupo “Solo”, também conhecida como Havaí da Amazônia e mamão-papaya, são comercializadas nos mercados interno e externo, enquanto que as do grupo “Formosa” são comercializadas apenas no mercado interno (DIAS et al., 2007).

O mamão é uma das frutas mais consumidas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo que apresentam pluviosidade elevada, solos férteis e bem drenados (RITZINGER; SOUZA, 2000). Provavelmente seja originário do sul do México e países vizinhos. Suas sementes foram distribuídas para o Caribe e o sul da Ásia durante a exploração espanhola no século XVI, de onde se espalhou para a Índia, Pacífico e África.

As regiões produtoras de mamão no mundo estão localizadas em uma faixa do globo terrestre compreendida entre os trópicos de Câncer e Capricórnio, a 21° de latitude Norte e 21° de latitude Sul. Os maiores produtores, considerando a área de plantio, são pela ordem: Nigéria, Índia, Brasil, Bangladesh, México, Republica Democrática do Congo, Etiópia, Peru, Tailândia e Filipinas. A área total da cultura está em torno de 386.000 ha e o volume de produção é de milhões de toneladas de frutos (AGRA FNP, 2011).

A demanda de mamão no mercado internacional para exportação situa-se em torno de 247.00 toneladas. Índia, Brasil e Nigéria são os maiores produtores, mas não são os maiores exportadores. O México é um exemplo de país que possui uma área de cultivo menor que a do Brasil, mas que exporta grande volume desta fruta (cerca de 136.000 toneladas). Malásia e

Estados Unidos (24.000 e 8.000 respectivamente) são também outros exemplos. Com relação aos países importadores, os Estados Unidos notadamente é o país que mais importa, com um crescimento substancial passando de 70 mil toneladas em 2000 para cerca de 156 mil toneladas em 2009, ou seja, um crescimento superior a 50%. Cingapura e Canadá são também países que destacam-se no mercado internacional em relação à importação de mamão (AGRA FNP, 2011, MARTINS; COSTA, 2003).

O mamoeiro é explorado, em todos os estados do Brasil. Na região Nordeste concentra-se a maior área de plantio, cerca de 23 mil ha. A região Sudeste é a segunda maior produtora com nove mil ha. Seguem pelas regiões Norte, com três mil ha; e Centro-Oeste, com 370 ha. Em 2008 a produção brasileira foi de 1.890,286 toneladas com destaque para o Nordeste com produção de 1.179,101 toneladas (AGRA FNP, 2011, MARTINS; COSTA, 2003). É uma cultura de expressiva importância para o Brasil, que necessita de renovação dos pomares de a cada três anos, no máximo, e que produz o ano inteiro. A cultura do mamoeiro tem grande relevância, devido, a sua importância social, pois gera empregos e absorve mão de obra durante todo o ano (RITZINGER; SOUZA, 2000).

### **Podridão-Peduncular do Mamoeiro**

As doenças do mamoeiro destacam-se economicamente, pois sua presença acarreta severas perdas econômicas na produção, comercialização e exportação de frutas *in natura*, podendo chegar em alguns casos a 100% (MARTINS; COSTA, 2003). É infectado por patógenos foliares, bem como por causadores de podridões que surgem em todos os estádios de crescimento da planta. Entre as doenças foliares destacam-se aquelas causadas pelos vírus como o mosaico do mamoeiro – *Papaya ringspot virus* type P (PRSV-P), a meleira do mamoeiro - *Papaya meleira virus* (PMeV) e o amarelo letal do mamoeiro – *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) e aquelas causadas por fungos como a varíola (*Asperisporium caricae* (Speg) Maulb), a mancha-de-aschochita (*Phoma caricae-papayae* (Tarr) Punith), o oídio (*Oidium caricae* Noack), mancha-de-corynespora (*Corynespora cassicola* (Berk & Curt) Wei), Podridão-por-*Rhizopus stolonifer* (Ehrenb. Ex Fr.) Lind, Podridão-por-*Fusarium*, Podridão-por-*Alternaria alternata* (Fries) Keissler e, com menos ocorrência, as ocasionadas por bactérias. Outra doença de grande importância na cultura do mamoeiro é a podridão-do-pé e dos frutos causada pelo fungo *Phytophthora palmivora* (Botler) Butler. Dentre as doenças que ocorrem em pós-colheita do mamão destacam-se a antracnose (*Colletotrichum* spp.) e a mancha-chocolate (*Glomerella cingulata* (Ston) Spaud & Schr). Essas doenças são as mais

importantes e as que causam maiores danos seguidos pela podridão-peduncular, causada por diversos fungos fitopatogênicos, principalmente *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl. (SANTANA et al, 2007; OLIVEIRA et al, 2006).

A podridão-peduncular causada nas frutas de mamão na pós-colheita é hoje uma das doenças mais preocupantes no Brasil e que tem provocado sérios danos as frutas principalmente durante o transporte para exportação. O principal agente causal descrito na literatura para a podridão peduncular é constituído por um complexo de fungos, sendo o principal *L. theobromae*, que tem crescimento rápido, causa a mumificação das frutas e muitas vezes o processo de infecção pode iniciar-se no campo isoladamente ou em combinação com outros fungos. Os sintomas causados pela podridão peduncular podem ser observados no pedúnculo, principalmente, e na superfície das frutas. O patógeno causa inicialmente lesões que apresentam uma ampla margem de tecido encharcado, na base do pedúnculo, seguido de uma produção abundante de micélio esbranquiçado, de escurecimento posterior com uma superfície rugosa, resultado da formação de picnídios em estromas e assim promovendo a podridão que vai tomando toda a fruta. Em épocas de grande intensidade pluviométrica, a incidência de podridão peduncular em lavouras que não adotam nenhuma medida de controle pode atingir 100% (REZENDE; MARTINS, 2005; SANTANA et al., 2007).

### **Família Botryosphaeriaceae**

Na família 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, elipsoide a ovoide, tornando-se, em algumas espécies, marrom e com um a dois septos com o amadurecimento (PHILLIPS, 2004). Vários gêneros de fungos mitospóricos têm sido relatados como anamorfos de Botryosphaeriaceae: *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 de *Diplodia*, *Dothiorella* e *Lasiodiplodia* são claramente separadas daquelas de *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 da semelhança dos tamanhos dos conídios entre esses gêneros, no geral, os de *Lasiodiplodia* são asseptados e hialinos quando jovens e tornam-se escuros, septados, mais largos e ovoides e possuem parede estriada na maturidade (BURGESS et al., 2006). Conídios de *Dothiorella* tornam-se marrons 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 o amadurecimento e após a liberação da célula conidiogênica (PHILLIPS et al., 2005).

A atual identificação das espécies de Botryosphaeriaceae é difícil, uma vez que os teleomorfos são raramente encontrados na natureza (JACOBS; REHNER, 1998; ZHOU; STANOSZ, 2001; VAN NIEKERK et al., 2004; SLIPPERS et al., 2004a; SLIPPERS et al., 2007). Além disso, a sua diversidade morfológica é limitada para permitir uma clara diferenciação específica, enquanto os anamorfos possuem uma larga diversidade morfológica (JACOBS; REHNER, 1998; LUQUE; MARTOS; PHILLIPS, 2005; PHILLIPS et al., 2005). A taxonomia de Botryosphaeriaceae é, portanto, frequentemente baseada nas características dos seus anamorfos, que são comumente encontrados em culturas puras (JACOBS; REHNER, 1998; SLIPPERS et al., 2004c; SLIPPERS et al., 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 conidial como forma, tamanho, cor, septação, espessura e textura da parede, ornamentação, 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).

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 e Stanosz (2001), problemas podem ser encontrados ao definir limites, especialmente entre espécies muito próximas dentro do mesmo gênero, devido à falta de variação morfológica distinta, a interdependência dos caracteres morfológicos e as influências ambientais na morfologia. Exemplos das dificuldades em diferenciar espécies muito próximas são aparentes dentro de Botryosphaeriaceae (JACOBS; REHNER, 1998).

*Lasiodiplodia theobromae* (syn. *Botryodiplodia theobromae* Pat.) apresenta picnídios simples ou compostos, frequentemente agregados, estromáticos, estiolados, subovoides para elipsoides – oblongos, com parede espessa e base truncada frequentemente pilosos e podem apresentar extrusão de conídios com aspecto de uma massa preta (MENEZES; OLIVEIRA, 1993). Os conídios maduros de *L. theobromae* tornam-se uniseptados e de coloração castanho – amarelados, longitudinalmente estriados. As paráfises quando presentes são hialinas, cilíndricas, algumas vezes septadas. Em frutas infectadas, os picnídios são imersos, tornando-se erupentes.

*L. theobromae* é um fitopatógeno cosmopolita, polífago e oportunista, com pouca especialização patogênica, normalmente associado a processos patogênicos em plantas com deficiência nutricional, estressadas e com ferimentos naturais ou provocados por insetos, pássaros ou pelo próprio homem, através de práticas culturais (TAVARES; BARRETO; AMORIM, 1994). É típico de regiões tropicais e subtropicais. Até os anos 80 era considerado de importância secundária. Contudo, nos últimos anos, vem tornando-se importante para várias culturas, causando prejuízos em numerosas espécies vegetais cultivadas de grande expressão econômica devido à expansão das culturas e o tipo de manejo adotado (PEREIRA; SILVA; RIBEIRO, 2006).

Este fungo é responsável por doenças importantes como a morte descendente do cacaueteiro (*Theobromae cacao* L.), mangueira (*Mangifera indica* L.), coqueiro (*Cocos nucifera* L.), cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), gravioleira (*Annona muricata* L.), mamoneira (*Ricinus communis* L.), guaranazeiro (*Paullinia cupana* Ducke) e ateira (*Annona squamosa* L.) dentre outras (FREIRE; CARDOSO, 2003; PEREIRA; SILVA; RIBEIRO, 2006; RODRIGUES; PARADELA FILHO; RIBEIRO, 2004). Outras doenças apresentadas são murcha, podridão basal de frutos, cancro de tronco e de ramos (TAVARES, 2002).

A sua capacidade de *L. theobromae* infectar frutos coloca-o dentre os mais eficientes patógenos causadores de doenças pós-colheita (FREIRE et al., 2004), o que proporciona a disseminação deste fungo e o aparecimento de doenças como a podridão-seca-da-haste em anonáceas. Sementes obtidas de frutos de gravioleira infectadas podem apresentar percentuais de transmissão variando de 50 a 100% (CARDOSO; FREIRE, 2002).

A disseminação do fungo é feita pelo vento, água, semente, insetos, animais silvestres e pelo homem, via instrumentos agrícolas (CARDOSO; FREIRE, 2002). Trata-se de um fungo que pode penetrar a planta por meio de ferimentos causados por insetos, pelo homem, por outros patógenos ou por aberturas naturais (TAVARES, 2002).

Em plantas adultas, os sintomas começam pelos ponteiros como uma podridão seca. A doença atinge os ramos e as gemas vegetativas causando hipertrofias e exsudação de goma seguida de intensa desfolha e de morte progressiva no sentido da extremidade para a base. Nos ramos mais grossos e troncos, a infecção inicia-se a partir da superfície externa do lenho, principalmente nas bifurcações e rachaduras naturais da casca. Com o progresso da doença, observa-se lesões escuras que penetram o lenho, causando o bloqueio do fluxo de seiva e posterior morte a partir de área lesionada até o topo da planta (TAVARES, 2002; CARDOSO et al., 2002).

No campo, a penetração de *L. theobromae* nos frutos dá-se pelo pedúnculo ou por ferimentos. Formam lesões escuras no pedúnculo, com bordos bem definidos. Posteriormente, os tecidos lesionados podem rachar, expondo a polpa da fruta. Em condições de temperatura e umidade elevadas, observa-se na parte central das lesões uma grande quantidade de minúsculas pontuações escuras, que são as estruturas de reprodução do fungo denominadas de picnídios. Esses mesmos sintomas podem ser observados em pós-colheita, em frutas armazenadas (JUNQUEIRA et al., 1996; CARDOSO; FREIRE, 2002).

As perdas decorrentes da podridão seca em pomares são, em primeira instância, a redução da produtividade das plantas e, em uma fase posterior, a redução da longevidade produtiva do pomar, pela redução do número de plantas e ainda, causar perdas expressivas de frutas na pós-colheita (JUNQUEIRA et al., 1996).

O controle da doença é difícil em razão da variada gama de hospedeiros do fungo. O controle químico não tem demonstrado eficiência, sendo então indicada a adoção de uma série de medidas adicionais de controle (PEREIRA; SILVA; RIBEIRO, 2006, TAVARES, 1995). No controle da doença em frutos recomenda-se o tratamento hidrotérmico à temperatura de 55° C durante cinco minutos aliado ao uso de fungicidas (RIBEIRO, 2004; RODRIGUES; PARADELA FILHO; TAVARES, 2002). No entanto, no desenvolvimento de estratégias de controle de doenças de plantas é importante conhecer a epidemiologia do patógeno (PAULA et al., 2000).

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 torna-se 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 (ARAUZ; SUTTON, 1989; MICHAILIDES;

MORGAN, 1992; MILA et al., 2005; SILVEIRA et al., 2001; 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 o molhamento foliar 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 que 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).

A variação nas características morfológica e fisiológica entre isolados de *L. theobromae* provenientes de diferentes hospedeiros e regiões geográficas tem sido observada por vários autores como por exemplo variação na coloração das colônias (MENEZES; MUNIZ; QUEIROZ, 1997; MORAES et al., 1995; RAM, 1993). Tradicionalmente, os fungos são classificados de acordo com suas características morfológicas. No entanto esse procedimento pode não ser completamente seguro porque algumas diferenças observadas nessas características podem ser devidas à instabilidade do isolado ou às condições de cultivo. Além disso, características morfológicas são também influenciadas pelo ambiente (COUTEAUDIER, 1994, apud LEAL-BERTOLI, 1998; SHARMA; SINGH; PRACHI, 1999; SHARMA; GUPTA; SHARMA, 2005), e nem sempre essas características estão relacionadas com a patogenicidade dos mesmos (JEGER et al., 1995). Similarmente, análises filogenéticas não podem ser baseadas unicamente nessas características, devido à simplicidade destes, se comparadas a animais e plantas. Para minimizar o problema, estudos visando a integração de métodos devem ser considerados numa abordagem polifásica. Portanto, resultados baseados em morfologia devem ser completados com outros métodos, como características fisiológicas, pois esse é outro critério que evidencia a variabilidade de uma população ou ainda, pode-se utilizar métodos baseados em características genéticas, sendo este um método mais acurado (LEAL-BERTIOLI, 1998).

## Filogenia

Marcadores moleculares são usados como ferramentas para caracterização de diversidade genética de fitopatógenos, onde características morfológicas são ausentes ou incapazes de diferenciação de isolados (SHARMA; GUPTA; SHARMA, 2005; SHARMA; SINGH; PRACHI, 1999). Estudos recentes sobre a taxonomia de Botryosphaeriaceae têm empregado métodos moleculares para revelar relações filogenéticas entre as espécies (JACOBS; REHNE, 1998) e para ajudar a resolver complexo de espécies (SMITH et al. 2001, PHILLIPS et al. 2002, DENMAN, et al. 2003, ALVES et al. 2004, SLIPPERS et al. 2004a, SAKALIDIS et al. 2011, BEGOUDE et al. 2010).

Apesar de 27 espécies de *Lasiodiplodia* serem conhecidas atualmente (*L. abnormis* Traverso & Spessa, *L. citri* Av. –Saccá, *L. citricola* Abdollahzadeh, Javadi & A. J. L. Phillips, *L. crassispora* T. I. Burgess & Barber, *L. fiorii* Bacc., *L. frezaliana* Faurel & Schotter, *L. gilanensis* Abdollahzadeh, Javadi & A. J. L. Phillips, *L. gonubiensis* Pavlic, Slippers & M. J. Wingf., *L. hormozganensis* Abdollahzadeh, Zare & A. J. L. Phillips, *L. iraniensis* Abdollahzadeh, Zare & A. J. L. Phillips, *L. mahajangana* Begoude, Jol. Roux & Slippers, *L. margaritacea* Pavlic, T. I. Burgess & M. J. Wingf., *L. nigra* K. R. Appel & Laubert, ), *L. missouriana* Úrbez-Torres, Peduto & Gubler, *L. paraphysaria* (Sacc.) Keissl., *L. parva* A. J. L. Phillips, A. Alves & Crous, *L. plurivora* Damm & Crous, *L. pseudotheobromae* A. J. L. Phillips, A. Alves & Crous, *L. ricini* Sacc., *L. rubropurpurea* T. I. Burgess, Barber & Pegg, *L. theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., *L. thomasiana* Sacc., *L. triflorea* B. B. Higgins, *L. tubericola* Ellis & Everh., *L. undulata* (Berk. & M. A. Curtis) Abbas, B. Sutton, Ghaffar & Abbas, *L. venezuelensis* T. I. Burgess, Barber & Mohali, *L. viticola* Úrbez-Torres, Peduto & Gubler), apenas 16 estão disponíveis (*L. crassispora*, *L. gonubiensis*, *L. margaritacea*, *L. missouriana*, *L. parva*, *L. plurivora*, *L. pseudotheobromae*, *L. rubropurpurea*, *L. theobromae*, *L. venezuelensis*, *L. citricola*, *L. gilanensis*, *L. hormozganensis*, *L. iraniensis*, *L. viticola* e *L. mahajangana*) para análises filogenéticas e todas elas são espécies recém descritas, desde 2004 e possuem sequências de DNA depositadas em banco de dados, como por exemplo o GenBank, por esta razão, torna-se possível incluir apenas essas espécies recentemente descritas nas análises filogenéticas. O recente aumento no número de espécies é reconhecido em grande parte devido à utilização de dados filogenéticos, mas é também devido à amostragem, em regiões relativamente pouco exploradas, incluindo Venezuela (BURGESS et al. 2006), Austrália (PAVLIC et al. 2008) e Irã (ABDOLLAHZADEH et al. 2010). As espécies descritas mais recentemente foram separadas, não só na morfologia, mas também



com base em dados da sequência ITS (Internal Transcribed Spacer) e EF-1 $\alpha$  (Elongation Factor).

A filogenia molecular tem desempenhado um papel importante para distinguir as espécies de *Lasiodiplodia*. Pavlic et al. (2004) utilizaram dados de sequência de ITS para distinguir *L. gonubiensis* de *L. theobromae*. Burgess et al. (2006) descreveram mais três espécies novas de *Lasiodiplodia* claramente separada de *L. theobromae* baseados em sequências de ITS. Inclusão de sequências EF-1 $\alpha$  na análise filogenética deu suporte para estas espécies (BURGESS et al. 2006).

Em um estudo de Botryosphaeriaceae em espécies de *Prunus* na África do Sul, Damm; Crous; Fourie (2007) descreveram *L. plurivora* como uma nova espécie. Esta espécie está intimamente relacionada com *L. theobromae* e as duas espécies não poderiam ser distinguidas unicamente na base de dados da sequência ITS mas foram claramente separadas quando os dados EF-1 $\alpha$  foram incluídos. Alves et al. (2008) usaram ITS e EF-1 $\alpha$ , juntamente com dados morfológicos para caracterizar uma coleção de isolados inicialmente identificados como *L. theobromae*. Dessa forma, os pesquisadores mostraram que *L. theobromae* é um complexo de espécies crípticas e descreveram como novas espécies *L. pseudotheobromae* e *L. parva*. As espécies atualmente reconhecidas não podem ser distinguida apenas em suas sequências da região ITS e a separação filogenética é efetivamente com base em uma região do gene único, ou seja, EF-1 $\alpha$ . Pavlic et al. (2004) descreveram uma nova espécie *L. gonubiensis*, com base na morfologia e dimensões de conídios e sequência de dados. Essa foi a primeira espécie deste gênero a ser encontrada em árvores nativas na África do Sul.

Abdollahzadeh et al (2010) estudaram seis espécies de *Lasiodiplodia* associadas com uma variedade de sintomas em uma gama de hospedeiros lenhosos no Irã e descreveram quatro espécies novas (*L. citricola*, *L. gilanensis*, *L. hormozganensis* e *L. iraniensis*). Todas as quatro espécies podem ser distinguidas morfológica e filogeneticamente umas das outras e das espécies previamente descritas. Todas as espécies utilizadas foram isoladas de galhos mortos, mas não sabe-se se eles eram patógenos primários ou saprófitos que se desenvolveram no tecido doente. Mesmo sabendo-se que *L. citricola* foi isolado apenas de *Citrus* sp., não foi possível determinar qualquer grau de especificidade. Na verdade, as outras três novas espécies foram isoladas a partir de vários hospedeiros diferentes, sugerindo uma natureza polífaga. Apesar de *L. theobromae* ter sido relatado em mais de 500 hospedeiros, a gama de hospedeiros das espécies descritas nos últimos anos têm sido supostamente restrita (BURGESS et al., 2006; DAMM; CROUS; FOURIE, 2007; PAVLIC et al., 2004). No entanto, não está claro se a gama de hospedeiros restrita das espécies mais recentemente

descritas é um reflexo de amostragem em vez de uma representação real da gama de hospedeiros. Assim, é possível que haja uma variação na amplitude de gama de hospedeiros entre espécies como visto de outros gêneros de Botryosphaeriaceae. Por exemplo, *Diplodia seriata* De Not. tem uma gama muito ampla de hospedeiro, enquanto *D. pinea* (Desm.) J. J. Kickx é restrita aos pinheiros e *D. corticola* A. J. L. Phillips, A. Alves & J. Luque está restrita às espécies do gênero *Quercus*. No Brasil não há estudos sobre a diversidade genética de *L. theobromae* que possivelmente pode incluir várias espécies recentemente descritas e/ou desconhecidas, identificadas como sinônimos de *L. theobromae*, estas não podem ser separadas somente por caracteres morfológicos, como tem-se visto em estudos envolvendo este patógeno em diversas partes do mundo, principalmente na África, Irã e Venezuela (ABDOLLAHZADEH et al., 2010; ALVES et al., 2008; BURGESS et al. 2006; DAMM; CROUS; FOURIE, 2007; PAVLIC et al., 2004).

Diante de estudos recentes na taxonomia do gênero *Lasiodiplodia* com a descrição de novas espécies fitopatogênicas, o presente trabalho teve como objetivo determinar as espécies de *Lasiodiplodia* associadas à podridão peduncular do mamão no Brasil.

## REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHZADEH, J.; JAVADI, A.; MOHAMMADI, E. G.; ZARE, R.; PHILLIPS, A. J. L. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. **Persoonia**, Utrecht, v. 25, p.1-10, 2010.
- AGRA FNP. **Agrianual 2011** – anuário da agricultura brasileira. São Paulo: Agra FNP, 2011, 564p.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5<sup>th</sup> ed. San Diego: Academic Press, 2005. 922p.
- ALVES, A.; CORREIA, A.; LUQUE, J.; PHILLIPS, A. J. L. *Botryosphaeria corticola*, sp. nov. on *Quercus* species, with notes and description of *Botryosphaeria stevensii* and its anamorph, *Diplodia mutila*. **Mycologia**, New York, v. 96, p. 598–613, 2004.
- ALVES, A.; CROUS, P. W.; CORREIA, A.; PHILLIPS, A. J. L. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 28, p. 1-13, 2008.
- 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.
- BEGOUDE, B. A. D.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; ROUX, J. Botryosphaeriaceae associated with *Terminalia catappa* in Cameroon, South Africa and Madagascar. **Mycologia Progress**, Berlin, v. 9, p. 101-123, 2010.
- BORGES NETO, C. R.; MELLO, S. C. M.; RIBEIRO, Z. M. A.; ÁVILA, Z. R.; MALTBY, 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.; de BEER, W.; WINGFIELD, M. J. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. **Mycologia**, New York, v.98, p.423-435, 2006.
- CARDOSO, J. E.; FREIRE, F. C. O. Identificação e manejo das principais doenças. In: MELO, Q. M. S. (ed.) **Caju fitossanidade**. Brasília. Embrapa Informação Tecnológica, 2002, p.41-51.
- 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.
- DAMM, U.; CROUS, P. W.; FOURIE, P.H. Botryosphaeriaceae as potential pathogens of *Prunus* in South Africa, with descriptions of *Diplodia Africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. **Mycologia**, New York, v. 99: 664–680, 2007.

DENMAN, S.; CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Circumscription of *Botryosphaeria* species associated with *Proteaceae* based on morphology and DNA sequence data. **Mycologia**, New York, v. 95, p. 294–307, 2003.

DIAS, M. S. C.; CANUTO, R. S.; PACHECO, D. D.; MARTINS, R. N.; SILVA, J. J. C. In: PAULA JÚNIOR, T. J.; VENZON, M. (Coords.) **101 Culturas: Manual de tecnologias agrícolas**. Belo Horizonte: EPAMIG, p.469-478, 2007.

FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E. Doenças do coqueiro. In: FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P. (ed.) **Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial**. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, p.191-226, 2003.

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

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.

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, p.601–610, 1998.

JEGER, M. J.; EDEN-GREEN, S.; THRESH, J. M.; JOHANSON, A.; WALLER, J. M.; BROWN, A. E. Banana disease. In: GOEWN, S. (ed.) **Bananas and plantains**. UK. Chapman & Hall, 1995, p.317-364.

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

LEAL-BERTIOLI, S. C. M. O enfoque molecular na sistemática de fungos. In: LUZ, W. C. (ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v. 6, p.197-230, 1998.

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.

MARTINS, D. S.; COSTA, A. F. S. (Eds.) **A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção**. Vitória: Incaper, p. 497, 2003.

MEINHARDT, L. W.; WULFF, N. A.; BELLATO, C. M.; TSAI, S. M. Telomere and microsatellite primers reveal diversity among *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p.152-162, 2002.

MENEZES, M.; OLIVEIRA, S. M. A. **Fungos fitopatogênicos**. Recife: URFPE. Imprensa Universitária, 1993, p. 277.

- MENEZES, M.; MUNIZ, M. F. S.; QUEIROZ, F. M. Podridão da haste do mamoeiro “sunrise-solo” causada por *Botryodiplodia theobromae* no estado de Alagoas. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 23, p. 44-45, 1997.
- 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.
- MORAES, W. S.; CASTRO, H. A.; LEITE, E.; NOVAES, R. L.; CAMPOS, S. S.; AMORIM, L.; KIMURA, M. Caracterização morfológica e cultural de *Botryodiplodia theobromae* em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p.366, 1995 (Resumo).
- NISHIJIMA, W. T.; DICKMAN, M. B.; KO, W. H.; OOKA, J. J. Papaya diseases caused by fungi. In: PLOETZ, R. C.; ZENTMYER, G. A.; NISHIJIMA, W. T.; ROHRBACH, K. G.; OHR, H. D. **Compendium of tropical fruit diseases**. 1.ed. St. Paul, American Phytopathological Society, p.58-64, 1998.
- 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, p. 855, 2006.
- PAULA, H.; MICHEREFF, S. J.; COSTA, V. S. O.; LARANJEIRA, D.; OLIVEIRA, S. M. A. Variabilidade de aislamientos de *Curvularia eragrostidis* que causan atizomamiento 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.; COUTINHOC, T. A.; GRYZENHOUT, M.; WINGFIELD, M. J. *Lasioidiplodia gonubiensis* sp. nov., a new *Botryosphaeria* anamorph from native *Syzygium cordatum* in South Africa. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 50, p. 313-322, 2004.
- PAVLIC D.; WINGFIELD, M. J.; BARBER, P.; SLIPPERS, B.; HARDY, G. E. S. J.; BURGESS, T. I. Seven new species of the Botryosphaeriaceae from baobab and other native trees in Western Australia. **Mycologia**, New York, v. 100, p. 851–866, 2008.
- PEREIRA, A. L.; SILVA, G. S.; RIBEIRO, V. Q. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasioidiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p.572-578, 2006.
- 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**, Jaguariúna, 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](http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site/genus_concept.htm)>. Acesso em: 24 de maio de 2011.
- PHILLIPS, A. J. L.; FONSECA, F.; POVOA, V.; CASTILHO, R.; NOLASCO, G. A reassessment of the anamorphic fungus *Fusicoccum luteum* and description of its teleomorph *Botryosphaeria lutea* sp. nov. **Sydowia**, Austria, v.54, p. 59–77, 2002.
- PHILLIPS, A.; ALVES, A.; CORREIA, A.; LUQUE, J. Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. **Mycologia**, New York, v. 97, n. 2, p. 513-529, 2005.
- RAM, C. Características culturais, esporulação e violência do “strain” *Botryodiplodia theobromae* agente causal da queima-das-folhas do coqueiro (*Cocos nucifera*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 143-146. 1993.
- REDDY, M. P.; SARLA, M.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding, **Euphytica**, Amsterdam, v. 128, p. 9-17, 2002.
- REZENDE, J. A. M.; MARTINS, M. C. Doenças do mamoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Eds.) **Manual de Fitopatologia, vol.2: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, p. 435-443, 2005.
- RITZINGER, C. H. S. P.; SOUZA, J. S. **Mamão Fitossanidade**. EMBRAPA: Brasília, p. 91, 2000.
- RODRIGUES, R.; PARADELA FILHO, O.; RIBEIRO, I. J. A. Caracterização morfológica e patológica de *Lasiodiplodia theobromae*, agente causal da podridão do tronco e raízes de videira. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 30, p. 43-50, 2004.
- SAKALIDIS, M. L.; HARDY, G. E. StJ.; BURGESS, T. I. Endophytes as potential pathogens of the baobab species *Adansonia gregorii*: a focus on the Botryosphaeriaceae. **Fungal Ecology**, London, v. 4, p. 1–14, 2011.
- SANTANA, E. N.; MARTINS, M. V. V.; LIMA, I. M.; COSTA, H.; VENTURA, J. A.; VIEIRA, P. Manejo das Doenças do Mamoeiro. In: Núcleo de Estudos em Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras. **Manejo Integrado de doenças de fruteiras**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, p. 107-127, 2007.
- SHARMA, T. R.; SINGH, B. M. PRACHI. Applications of polymerase chain reaction in phytopathogenic microbes. **Indian Journal Microbiology**, Calcutta, v.39, p.79-91, 1999.
- SHARMA, M.; GUPTA, S. K.; SHARMA, T. R. Characterization of variability in *Rhizoctonia solani* by using morphological and molecular markers. **Journal Phytopathology**, Berlin, v.153, p.449-456, 2005.
- 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.; 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.; 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, R. S.; CROUS, P. W.; WINGFIELD, M. J.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. D. *Botryosphaeria eucalyptorum* sp. nov., a new species in the *B. dothidea*-complex on *Eucalyptus* in South Africa. **Mycologia**, New York, v. 93, p. 277-284, 2001.

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.

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

TAVARES, S. C. C. H. Principais doenças da mangueira e alternativas de controle. **Informações técnicas sobre a cultura da manga no Semi-Árido Brasileiro**. Brasília: EMBRAPA-CPATSA. 1995.

TAVARES, S. C. C. H.; BARRETO, D. S. B.; AMORIM, L. R. Levantamento do comportamento de *Botryodiplodia theobromae* em videira na região Semi-Árida. **Anais, XII Congresso Brasileiro de Fruticultura**. Salvador, BA, p. 933-934, 1994.

TENZER, I.; IVANISSEVICH, S. D.; MORGANTE, M.; GESSLER, C. Identification of microsatellite markers and their application to population genetics of *Venturia inaequalis*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 89, p. 748-753, 1999.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; DUARTE, V.; AMORIM, L.; PORTO, M. D. M. Detecção e epidemiologia da podridão branca da maçã. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 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 *Lasiodiplodia* associadas à podridão peduncular em mamão no Nordeste do Brasil**

Submissão: **Tropical Plant Pathology**

Brasília, BRA



1 **Espécies de *Lasiodiplodia* associadas à podridão peduncular em mamão no Nordeste do**  
2 **Brasil**

3

4 Mariote S. B. Netto<sup>1</sup>, Iraíldes P. Assunção<sup>2</sup>, Gaus S. A. Lima<sup>2</sup>, Marília W. Marques<sup>1</sup>, Waléria  
5 G. Lima<sup>1</sup>, Sami J. Michereff<sup>1</sup> e Marcos P. S. Câmara<sup>1\*</sup>

6

7 <sup>1</sup>Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900  
8 Recife, Pernambuco, Brazil. e-mail: mcamara@depa.ufrpe.br

9 <sup>2</sup>Universidade Federal de Alagoas, Centro de Ciências Agrárias, 57100-000 Rio Largo,  
10 Alagoas, Brazil. e-mail: i\_assuncao@hotmail.com

11

12 \*Autor correspondente: M .P. S. Câmara - e-mail: mcamara@depa.ufrpe.br

13 Número do telefone: +55 8133206205

14 Número do fax: +55 8133206209

15

16 **RESUMO**

17 A identidade das espécies de *Lasiodiplodia* causando podridão peduncular em mamão é  
18 revelada. No presente estudo espécies de *Lasiodiplodia* isoladas de mamão no Nordeste do  
19 Brasil são descritas, bem como, a sua distribuição em sete diferentes populações. Os isolados  
20 de *Lasiodiplodia* foram caracterizados por inferência filogenética baseada na sequência  
21 completa da região ITS e na sequência parcial do gene fator de alongamento, pelas  
22 características morfológicas, bem como pela patogenicidade e virulência. Três espécies  
23 previamente descritas foram identificadas (*L. theobromae*, *L. pseudotheobromae*, *L.*  
24 *hormozganensis*) juntamente com uma espécie desconhecida. *Lasiodiplodia theobromae* foi a

25 espécie mais prevalente em todas as populações. Todas as espécies de *Lasiodiplodia* foram  
26 patogênicas.

27

28 **Palavras chave:** abordagem polifásica, distribuição, EF-1 $\alpha$ , filogenia, ITS

29

### 30 **ABSTRACT**

31 The identity of *Lasiodiplodia* species in causing stem-end rot papaya is reveal. In the current  
32 study the *Lasiodiplodia* species isolated from papaya in Northeastern Brazil are described, as  
33 well as their distribution in seven different populations. *Lasiodiplodia* isolates are  
34 characterized through cultural, morphological, pathogenicity and virulence data, and from  
35 phylogenetic analyses based on the complete sequence of the ITS region and partial sequence  
36 of the translation elongation factor-1 $\alpha$  gene. Based on sequence data, three previously  
37 described species were identified (*Lasiodiplodia theobromae*, *L. pseudotheobromae*, *L.*  
38 *hormozganensis*) together with one unknown species. *L. theobromae* was the most prevalent  
39 species in all populations. All *Lasiodiplodia* species were pathogenic.

40

41 **Keywords:** distribution, EF-1 $\alpha$ , ITS, phylogeny, polyphasic approach

42

43

### 44 **INTRODUÇÃO**

45 O mamão (*Carica papaya* L.) é uma das frutas mais consumidas nas regiões tropicais  
46 e subtropicais do mundo que apresentam pluviosidade elevada, solos férteis e bem drenados  
47 (Ritzinger; Souza, 2000).

48 Dentre as doenças que ocorrem em pós-colheita do mamão destacam-se a antracnose  
49 (*Colletotrichum* spp.) e a mancha-chocolate (*Glomerella cingulata* (Ston) Spaud & Schr).

50 Essas doenças são as mais importantes e as que causam maiores danos seguidas pela  
51 podridão-peduncular, causada por diversos fungos fitopatogênicos, principalmente por  
52 *Lasiodiplodia theobromae* (Santana et al, 2007; Oliveira et al, 2006). A podridão-peduncular  
53 causada no mamão na pós-colheita é hoje uma das doenças mais preocupantes no Brasil e que  
54 tem provocado sérios danos as frutas principalmente durante o transporte. O agente causal da  
55 podridão peduncular é constituído por um complexo de fungos. A literatura relata *L.*  
56 *theobromae*, como o principal agente causal desta enfermidade. O fungo tem crescimento  
57 rápido, causa muitas vezes a mumificação dos frutos e o processo de infecção pode iniciar-se  
58 no campo isoladamente ou em combinação com outros fungos (Rezende; Martins, 2005;  
59 Santana et al., 2007).

60 A filogenia tem desempenhado um papel importante para distinguir as espécies de  
61 *Lasiodiplodia*. Pavlic et al. (2004) utilizaram dados de sequência da região ITS para distinguir  
62 *L. gonubiensis* de *L. theobromae*. Burgess et al. (2006) descreveram mais três espécies novas  
63 de *Lasiodiplodia* claramente separada de *L. theobromae* baseados na mesma região. Inclusão  
64 de sequências EF-1 $\alpha$  na análise filogenética melhorou o poder de resolução das análises  
65 filogenéticas que revelaram estas espécies (Burgess et al., 2006).

66 Em um estudo de Botryosphaeriaceae em espécies de *Prunus* na África do Sul,  
67 Damm; Crous; Fourie (2007) descreveram *L. plurivora* como uma nova espécie. Esta espécie  
68 está intimamente relacionada com *L. theobromae* e as duas espécies não poderiam ser  
69 distinguidas unicamente na base de dados da sequência ITS mas foram claramente separadas  
70 quando os dados EF-1 $\alpha$  foram incluído. Alves et al. (2008) usaram ITS e EF-1 $\alpha$ , juntamente  
71 com dados morfológicos para caracterizar uma coleção de isolados inicialmente identificados  
72 como *L. theobromae*. Dessa forma, eles mostraram que *L. theobromae* é um complexo de  
73 espécies crípticas e descreveram *L. pseudotheobromae* e *L. parva* como nova espécie. Pavlic  
74 et al. (2004) descreveram uma nova espécie *L. gonubiensis*, com base na morfologia e

75 dimensões de conídios e análises de sequência de DNA. *L. gonubiensis* foi a primeira espécie  
76 deste gênero a ser encontrada em árvores nativas na África do Sul.

77 Abdollahzadeh et al (2010) estudaram seis espécies de *Lasiodiplodia* associados com  
78 uma variedade de sintomas em uma gama de hospedeiros lenhosos no Irã. Descreveram  
79 quatro espécies novas (*L. citricola*, *L. gilanensis*, *L. hormozganensis* e *L. iraniensis*). Todas as  
80 espécies utilizadas foram isoladas de galhos mortos de vários hospedeiros, mas não sabe-se se  
81 eles eram patógenos primários ou saprófitos que se desenvolveram no tecido doente.  
82 Enquanto *L. citricola* foi isolada apenas de *Citrus* sp. e não foi possível determinar qualquer  
83 grau de especificidade de hospedeiros.

84 Diante de estudos recentes na taxonomia do gênero *Lasiodiplodia* com a descrição de  
85 novas espécies fitopatogênicas, o presente trabalho teve como objetivo determinar as espécies  
86 de *Lasiodiplodia* associadas à podridão peduncular do mamão no Brasil.

87

## 88 **MATERIAL E MÉTODOS**

89

### 90 **Amostragem e isolamento fúngico**

91 Durante 2006 e 2007, isolados de *Lasiodiplodia* foram obtidos de 18 campos de  
92 produção de mamão localizados no Nordeste brasileiro. Esses isolados representam seis  
93 populações (A a F) conforme a origem geográfica (Figura 1). Somente os campos da  
94 população C não receberam aplicações de fungicidas. Todos os outros campos receberam pelo  
95 menos uma pulverização com fungicidas inibidores da demetilação (DMIs), metil  
96 benzimidazole carbamatos (MBC) ou pertencentes a outros grupos. Os isolados foram obtidos  
97 da Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos "Profª. Maria Menezes". Para obtenção de  
98 isolados monospóricos, picnídios foram obtidos em meio ágar água 2% - AA com acículas de  
99 pinheiro esterilizadas como substrato após três semanas de incubação a 25°C sob fotoperíodo

100 de 12 h com luz próxima à ultravioleta (Slippers et al. 2004). Um único picnídio foi retirado  
101 de cada isolado sob microscópio estereoscópico (Zeiss Stemi DV4; Carl Zeiss, Berlin,  
102 Germany) e colocado em 250 ml de água esterilizada para produção de uma suspensão de  
103 conídios. Uma alíquota de 20 mL da suspensão foi distribuída em BDAS e incubada a 28°C  
104 no escuro por 24 h. Um único isolado monospórico foi recuperado de cada amostra individual  
105 e transferido para uma nova placa com BDA. Culturas estoque foram mantidas em BDA  
106 inclinado a 5°C no escuro.

107

### 108 **Extração de DNA, amplificação, sequenciamento e análise filogenética**

109 Usando a ponta de uma pipeta esterilizada de 10 µl, uma pequena quantidade de  
110 micélio aéreo foi raspado da superfície de uma cultura com sete dias de idade em meio BDA a  
111 25°C e o DNA genômico foi extraído utilizando AxyPrep™ Multisource Genomic DNA  
112 Miniprep Kit (Axygen Scientific Inc., Union City, CA, USA) seguindo as instruções do  
113 fabricante. A região do RNA ribossomal (ITS) foi amplificada usando os primers ITS1 e ITS4  
114 (White et al. 1990), e parte do gene fator de elongação 1 α (EF1-α) foi amplificada usando os  
115 primers EF1-688F e EF1-1251R (Alves et al. 2008). Cada reação em cadeia da polymerase  
116 (PCR) foram realizadas em um volume final de 50 µl contendo 21 µl de água, 1 µl de DNA, 1.5  
117 µM de cada primers e 25 µl de PCR Master Mix (2X) (0.05 u µl<sup>-1</sup> de *Taq* DNA polimerase,  
118 reaction buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM de cada dNTP; Thermo Scientific, Waltham, MA,  
119 USA). As reações de PCR foi realizada no termociclador (Biocycler MJ 96; Applied  
120 Biosystems, Foster City, CA, USA) usando o seguinte programa para os primers de ITS:  
121 desnaturação inicial de 95°C por 2 min., seguidos por 38 ciclos de desnaturação a 95°C por 1  
122 min., anelamento a 55°C por 1min., extensão a 72°C por 2 min. e uma extensão final a 72°C  
123 por 10 min. As condições de ciclagem para os primers EF1-α foram as seguintes:  
124 desnaturação inicial a 95°C por 5 min., seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s,

125 anelamento a 55°C por 1 min., extensão a 72°C por 90 s e uma extensão final a 72°C por 10  
126 min. Os produtos de PCR amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose  
127 1.5% em tampão 1× Tris-ácido acético EDTA (TAE) e foram fotografados sob luz ultravioleta  
128 corado com brometo de etídio (0.5 µg ml<sup>-1</sup>) por 1 min. Os produtos de PCR foram purificados  
129 usando AxyPrep™ PCR Cleanup Kit (Axygen) seguindo as instruções do fabricante. As  
130 regiões ITS e EF1- $\alpha$  foram sequenciadas em ambas as direções utilizando sequenciador ABI  
131 3730 na Macrogen Inc. (Seoul, Korea).

132 As sequências foram alinhadas com o programa ClustalX v.1.83 (Thompson et al.  
133 1997), utilizando os seguintes parâmetros: parâmetros de alinhamento par a par (gap opening  
134 = 10, gap extension = 0.1) parâmetros de alinhamento múltiplo (gap opening = 10, gap  
135 extension = 0.2, transition weight = 0.5, delay divergent sequences = 25 %). Os alinhamentos  
136 foram ajustados manualmente quando necessário. Os eventos de indels (gaps) foram  
137 considerados na análise filogenética conforme descrito por Young and Healy (2003). As  
138 análises filogenéticas foram feitas usando PAUP v.4.0b10 (Swofford 2003) com o método da  
139 Máxima-parcimônia (MP). As análises de Máxima-parcimônia foram realizadas utilizando a  
140 opção de busca heurística com 1000 taxa de adição aleatória e árvore com bissecção e  
141 reconexão (TBR) com o algoritmo “branch-swapping”. A robustez das árvores mais  
142 parcimoniosas foi avaliada a partir de 1 000 replicações de bootstrap (Hillis and Bull 1993). O  
143 índice de consistência (CI), índice de retenção (RI) e índice de homoplasia (HI) foram  
144 calculados. As árvores foram visualizadas no programa TreeView (Page 1996).

145

### 146 **Caracterização Morfológica**

147 Um total de 30 isolados de *Lasiodiplodia* spp. representantes dos diversos clados  
148 observados após a análise filogenética, foram caracterizados pela morfologia da colônia e  
149 características dos conídios. Estes incluíram cinco isolados de *L. hormozganensis*, *L.*

150 *pseudotheobromae*, *Lasiodiplodia* sp. e 10 isolados de *L. theobromae*. A coloração e o  
151 crescimento micelial dos isolados foram observados durante 15 dias a 25°C no escuro em  
152 meio extrato de malte ágar 2% (EMA) (HiMedia Laboratories, Mumbai, India). Para  
153 coloração foi utilizada a metodologia descrita por Rayner (1970). Características morfológicas  
154 dos conídios foram observadas em meio ágar água (AA) 2% com acículas de pinheiro  
155 esterilizadas como substrato sob fotoperíodo de 12 h com luz próxima à ultravioleta, como  
156 descrito anteriormente. O comprimento e a largura de 50 conídios por isolados foram  
157 mensuradas usando microscópio composto (Olympus BX41; Olympus Co., Tokyo, Japão)  
158 com câmara digital (Samsung SDC-415; Samsung Co., Seoul, Korea) e dispositivo de imagem  
159 (Motic Image Plus 2.0; Motic Group Co., Beijing, China). A média e o desvio padrão das  
160 medidas dos conídios, incluindo a proporção comprimento e largura (L/W), foram obtidos  
161 usando o programa STATISTIX v. 9.0 software (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA).  
162 Cor, forma dos conídios e presença ou ausência de septos também foram observadas.

163

#### 164 **Taxa de Crescimento dos Isolados**

165 Os isolados de *Lasiodiplodia* selecionados para caracterização das colônias e conídios  
166 também foram utilizados para determinar o efeito da temperatura no crescimento das colônias  
167 de diferentes espécies. Discos contendo micélio fúngico (3 mm de diâmetro) foram obtidos da  
168 borda de colônias com três dias de idade e transferidos para o meio EMA 2% com três  
169 repetições para cada isolado e incubados separadamente nas temperaturas 5°C, 10°C, 15°C,  
170 20°C, 25°C, 30°C e 35°C no escuro. Após dois dias de incubação, o diâmetro das colônia  
171 (mm) foi mensurado em duas direções perpendiculares. O experimento foi conduzido duas  
172 vezes. Os valores dos diâmetros das colônias versus temperatura foram ajustados para curva  
173 de regressão usando modelo polinomial cúbico ( $y = a + bx + cx^2 + dx^3$ ) e a temperatura ótima  
174 foi estimada usando modelo de regressão e o sumário numérico com o auxílio do programa

175 TableCurve™ 2D v. 5.01 software (SYSTAT Software Inc., Chicago, IL, USA). A  
176 temperatura ótima foi definida como aquela que apresentou maior crescimento radial. Os  
177 diâmetros da colônia a 30°C foram usadas para calcular a taxa de crescimento radial (mm dia<sup>-1</sup>).  
178 Análises de variância de um fator (ANOVA) foram conduzidas com os dados obtidos pela  
179 temperatura ótima e taxa do crescimento micelial usando STATISTIX.

180

### 181 **Teste de patogenicidade em frutos**

182 Os trinta isolados utilizados na caracterização morfológica foram selecionados para a  
183 patogenicidade. As culturas foram cultivadas em BDA por cinco dias a 28°C no escuro.  
184 Mamão cv. Golden em estágio 4 de maturação (Ministério da Integração Nacional 2000), nos  
185 quais não houve aplicação de fungicidas, foram colhidos de plantios comerciais do município  
186 de Mamanguape, estado da Paraíba. Os frutos foram transportados para o laboratório onde  
187 foram lavados em água corrente, e então desinfestados em solução 1% NaOCl por 3 min e  
188 novamente lavados em água destilada. Após secagem, os frutos foram distribuídos em quatro  
189 repetições, sendo a unidade amostral representada por dois mamões, colocados em bandejas  
190 plásticas. Antes o fundo de cada bandeja foi coberto com papel toalha umedecido com água  
191 destilada para aumentar a umidade. Visto que tratamentos sem ferimento não causaram lesão  
192 de *Lasiodiplodia* (dados não publicados), os frutos foram feridos com a ponta de uma agulha  
193 esterilizada na superfície de um dos lados do fruto com profundidade de três mm. Discos  
194 contendo micélio fungico (5 mm de diâmetro) foram obtidos da borda de colônias com sete  
195 dias de idade em meio BDA e imediatamente colocados sobre o ferimento. Para o controle,  
196 discos não colonizados pelo patógeno foram usados. As bandejas plásticas foram cobertas  
197 com sacolas plásticas e incubadas a 30°C no escuro. As sacolas plásticas e os papéis toalhas  
198 foram removidos após 24 horas, e os frutos mantidos na mesma temperatura por mais um  
199 período de 48 horas. Os diâmetros das lesões foram mensurados 72 horas após a inoculação



200 em direções perpendiculares em cada mamão. Os dados do comprimento e da largura foram  
201 combinados para determinar a área da lesão usando a equação  $A = \pi lw$ , onde A é a área oval  
202 (Sakalidis et al. 2011). Diferenças na área das lesões causada por cada espécie de  
203 *Lasiodiplodia* foi determinada por ANOVA. Um fator e médias foram comparadas por teste  
204 de diferença mínima de Fisher's (LSD) em nível de 5% de significância usando STATISTIX.

205

## 206 **RESULTADOS**

207

### 208 **Análise Filogenética**

209 Os primers ITS e EF1- $\alpha$  produziram sequências de aproximadamente 500 e 300 pares  
210 de bases respectivamente, as sequências geradas nesse estudo foram depositadas no GenBank  
211 (Tabela 1). Após o alinhamento, foram identificados 8 grandes grupos de haplótipos (34, 31,  
212 22, 20, 17, 7, 6 e 5 isolados cada). Cinco sequências de cada um destes haplótipos foram  
213 escolhidas ao acaso para construção da árvore, juntamente com os demais isolados que  
214 apresentaram sequências únicas (Tabela 1). A combinação dos dados apresentou 873  
215 caracteres, dos quais 142 foram informativos a nível de parcimônia, 29 foram variáveis ou  
216 não informativos e 543 foram constantes. A análise de máxima parcimônia dos dois conjuntos  
217 de dados concatenados gerou oito árvores igualmente parcimoniosas (comprimento= 333,  
218 CI=0.685, RI=0.907 e HI=0.315). A topologia dessa árvore (Figura 2) foi consistente com a  
219 topologia da árvore gerada pela sequência do EF1- $\alpha$  quando analisado isoladamente (dados  
220 não mostrados). As análises combinadas identificaram cinco grupos correspondentes ao  
221 gênero *Lasiodiplodia*, comparadas com sequências de espécies descritas disponíveis no  
222 GenBank previamente identificadas (Tabela 2). Sendo o primeiro (suporte 84% de *bootstrap*)  
223 correspondendo às sequências de *L. hormozganensis*. O segundo (suporte 64% de *bootstrap*)  
224 correspondendo às sequências de *Lasiodiplodia* sp. terceiro (suporte 99% de *bootstrap*)

225 correspondendo às sequências de *L. pseudotheobromae* e quarto correspondendo a  
226 sequências de *L. theobromae* disponíveis no Genbank.

227

### 228 **Distribuição das espécies de *Lasiodiplodia* spp.**

229 No total, quatro espécies de *Lasiodiplodia* foram encontradas nas populações  
230 amostradas neste estudo. *L. theobromae* foi a espécie mais frequente (Figura 3), seguida por  
231 *Lasiodiplodia* sp., *L. pseudotheobromae* e *L. hormozganensis*. Apenas *L. theobromae* foi  
232 encontrado em todas as populações. *L. pseudotheobromae* foi encontrado nas populações C e  
233 D. *Lasiodiplodia* sp. foi encontrado nas populações C e E. A espécie *L. hormozganensis* foi  
234 encontrada apenas na população C.

235

### 236 **Caracterização morfológica**

237 Foram obtidos um total de 166 isolados monospóricos de *Lasiodiplodia*. Todos os  
238 isolados produziram picnídios em acículas em meio AA 2% dentro de duas semanas.  
239 Nenhuma estrutura sexual foi observada. Os conídios foram inicialmente hialinos e  
240 asseptados, e com a maturidade apresentaram-se pigmentados e com um septo mediano  
241 transversal (Figura 6,7 e 8). Houve diferença entre as medidas de comprimento e largura dos  
242 conídios entre as diferentes espécies (Tabela 3). *Lasiodiplodia theobromae* apresentou como  
243 características culturais: micélio aéreo branco macio e abundante, tornando-se pale mouse  
244 grey (15''''b) à Smoke grey (23''''d), com os lados reversos das colônias dark mouse grey  
245 (15''''k) à Grey olivaceous (21''''i). Colônias atingindo 33 mm em MEA após dois dias no  
246 escuro a 25°C. Com temperatura ótima para o crescimento: 32,5°C, cobrindo uma 90 mm de  
247 diâmetro placa de Petri após três dias em MEA no escuro, nenhum crescimento observada a  
248 10°C. *Lasiodiplodia hormozganensis* apresentou como características culturais: micélio aéreo  
249 abundante, macio e branco, tornando-se pale mouse grey (13''''d) à grey olivaceous (21''''b),

250 com os lados reversos das colônias grey olivaceus (21''''b) à dark slate blue (39''''k).  
251 Colônias atingindo 42 mm em MEA após dois dias no escuro a 25°C. Com temperatura ótima  
252 para o crescimento: 31,4°C, cobrindo uma 90 mm de diâmetro placa de Petri após três dias em  
253 MEA no escuro, nenhum crescimento observada a 10°C. *Lasiodiplodia pseudotheobromae*  
254 apresentou como características culturais: micélio aéreo pouco denso e branco a cinza,  
255 tornando-se mouse grey (13''''i) à grey olivaceus (21''''i), com os lados reversos das  
256 colônias dark mouse grey (17''''k) à grey olivaceous (23''''i). Colônias atingindo 37 mm em  
257 MEA após dois dias no escuro a 25°C. Com temperatura ótima para o crescimento: 32,4°C,  
258 cobrindo uma 90 mm de diâmetro placa de Petri após três dias em MEA no escuro, nenhum  
259 crescimento observada a 10°C. *Lasiodiplodia* sp. apresentou características culturais: micélio  
260 aéreo abundante, macio e branco, tornando-se mouse grey (13''''i) à mouse grey (17''''i),  
261 com os lados reversos das colônias grey olivaceous (21''''b) à olivaceous black (27''''m).  
262 Colônias atingindo 39 mm em MEA após dois dias no escuro a 25°C. Com temperatura ótima  
263 para o crescimento: 32,8°C, cobrindo uma 90 mm de diâmetro placa de Petri após três dias em  
264 MEA no escuro, nenhum crescimento observada a 10°C. Não houve diferença significativa  
265 ( $P>0,05$ ) entre as espécies de *Lasiodiplodia* quanto à temperatura ótima para o crescimento  
266 micelial e à taxa de crescimento micelial a 30°C. As temperaturas ótimas variaram entre  
267 31,4°C (*L. hormozganensis*) e 32,8°C (*Lasiodiplodia* sp.), enquanto as taxas de crescimento  
268 variaram entre 35,7 mm/dia (*L. hormozganensis*) e 41,0 mm/dia (*L. pseudotheobromae*).  
269 (Figura 4)

270

### 271 **Teste de patogenicidade**

272 Todas as especies foram patogênicas, resultando em infecção nos frutos, 72 horas após  
273 inoculação. Houve diferença significativa quanto à área das lesões. A espécie *L.*  
274 *hormozganensis* apresentou-se mais virulenta, com as maiores áreas de lesão, enquanto que as

275 demais espécies foram menos virulentas não havendo diferença significativa entre elas  
276 (Figura 5).

277

## 278 **DISCUSSÃO**

279

280 O presente estudo é o primeiro levantamento de espécies da *Lasiodiplodia* que estão  
281 associados à podridão peduncular em mamão na região do Nordeste do Brasil. Quatro  
282 espécies de *Lasiodiplodia* foram identificados, *L. theobromae*, *L. hormozganensis*, *L.*  
283 *pseudotheobromae* e *Lasiodiplodia* sp. com base em características morfológicas e análises  
284 de suas sequências. Sendo uma delas, *Lasiodiplodia* sp. possivelmente como nova. Esta  
285 espécie pode ser distinta filogeneticamente das demais espécies presente nesse estudo.

286 Apesar de 26 espécies de *Lasiodiplodia* sejam corretamente conhecidas, culturas de  
287 apenas 13 espécies estão disponíveis em coleções de culturas e todas estão descritas desde  
288 2004. Por esta razão que somente estas espécies recentemente conhecidas podem ser incluídas  
289 em estudos de análises filogenéticas para esse gênero. Descoberta de novas espécies de  
290 *Lasiodiplodia* talvez não seja tão surpreendente, devido ao fato que mais de 10 espécies serem  
291 atribuídas a este gênero e que Punithalingam (1976), as reduziu em sinônimas em sua  
292 monografia. Atualmente existe um problema que é o fato de nenhum dos isolados atuais pode  
293 ser associado ao isolado tipo. Pavlic et al. (2004) não obtiveram sucesso em localizar um  
294 holótipo de *L. theobromae* e recorreram as descrições originais da espécie. Alves et al. (2008)  
295 mostraram que isolados previamente identificados como *L. theobromae* são na verdade, um  
296 complexo de diferentes espécies crípticas. A presente diversidade de espécies é similar a que  
297 ocorre em outros hospedeiros no mundo (Abdollahzadeh et al., 2010; Alves et al., 2008;  
298 Burgess et al., 2006; Pavlic et al., 2004).

299 As análises filogenéticas de ITS combinada com EF1- $\alpha$  claramente separa todas as  
300 espécies dentro de *Lasiodiplodia*. Este resultado mostra que as novas espécies de  
301 *Lasiodiplodia* descritas estão proximamente relacionadas, mas distintas de *L. theobromae*. Em  
302 termos filogenéticos *L. hormozganensis*, *L. pseudotheobromae* e *Lasiodiplodia* sp. são mais  
303 estreitamente relacionados entre si do que *L. theobromae*. Variação intraespecífica pode ser  
304 observada no clado de *L. theobromae* no qual houve um subclado com suporte de 71% de  
305 *bootstrap*. Resultados semelhantes foram observados por Alves et al. (2008) e Burgess et al.  
306 (2006). A alta variabilidade intra-específica pode estar levando a formação de agrupamentos  
307 dentro de *L. theobromae*. *Lasiodiplodia* sp. é distinta morfológica e filogeneticamente de *L.*  
308 *theobromae*, *L. hormozganensis* e *L. pseudotheobromae* que possivelmente poderá se tratar de  
309 uma nova espécie. Burgess et al. (2006) examinaram mais de 200 isolados de *Lasiodiplodia*  
310 obtidos de pinos, eucalipto, acácia e na Austrália, África do Sul, Venezuela e México e entre  
311 todos esse isolados somente 10 (menos que 10%) foram encontrados sendo distinto de *L.*  
312 *theobromae*. No presente trabalho foi observado que aproximadamente 11% dos isolados  
313 foram distintos. Isso confirma que *L. theobromae* é considerado um patógeno pantropical que  
314 ocorre no mundo em uma ampla gama de hospedeiro, mas outras espécies podem ser  
315 descritas.

316 *Lasiodiplodia theobromae* aparenta ocorrer mais comumente em regiões tropicais  
317 como é vista nas condições climáticas do Nordeste brasileiro onde as amostras foram  
318 coletadas. *L. pseudotheobromae* faz parte de um complexo de espécies criptas que  
319 originalmente foram identificadas como *L. theobromae*. Há relatos na África, Europa e  
320 America Latina. A gama de hospedeiro de *L. pseudotheobromae* é pouco conhecida. Alguns  
321 isolados foram obtidos de *Rosa* sp. na Holanda, *Gmelina arborea* e *Acacia mangium* na Costa  
322 Rica, *Coffea* sp. na República Democrata do Congo, *Citrus* spp. no Suriname e Irã, *Mangifera*  
323 *indica* na Austrália, sendo este o primeiro relato dessa espécie em *C. papaya*. Isto mostra um

324 aumento na disseminação desse fungo, sugerindo que *L. pseudotheobromae* assim como *L.*  
325 *theobromae*, tem uma distribuição mundial e uma ampla gama de hospedeiro. Recentemente  
326 *L. hormozganensis* foi descrito em *M. indica* e *Olea* sp. no Irã, *Adansonia digitata* na  
327 Austrália e pela primeira vez na América do Sul em *C. papaya* causando podridão  
328 peduncular.

329 O teste de patogenicidade mostrou que *L. hormozganensis* foi mais virulento que todas  
330 as espécies testadas. Portanto, este estudo fornece os primeiros dados sobre a patogenicidade  
331 dessa espécie. Estudos devem avançar no sentido de determinar sua gama de hospedeiro e  
332 distribuição com a finalidade de entender melhores medidas de manejo. Caracterização da  
333 morfologia das culturas raramente tem sido usada como um caractere para separação das  
334 espécies em *Lasiodiplodia*. Abdollahzadeh et al. (2010) e Alves et al.(2008) observaram  
335 crescimento de *L. hormozganensis* e *L. pseudotheobromae*, respectivamente, a 10°C, o que  
336 contrasta com os resultados deste trabalho no qual não houve crescimento para essas espécies.  
337 Assim, características culturais podem variar largamente entre isolados de qualquer espécie e  
338 portanto, são de valor limitado na determinação das espécies. Diferenças foram encontradas  
339 no tamanho de conídios e coloração de colônia. Conídios de *Lasiodiplodia* sp. são maiores do  
340 que os de *L. hormozganensis* e menores do que os de *L. theobromae* e *L. pseudotheobromae*.  
341 Para *L. hormozganensis* as medidas dos conídios e coloração das colônias estão de acordo  
342 com Abdollahzadeh et al. (2010). Com relação à distribuição das espécies nas populações  
343 amostradas, foi observada uma maior variabilidade das espécies na população C,  
344 possivelmente há uma correlação entre as medidas de manejo como, por exemplo, o tipo de  
345 fungicidas aplicado, havendo pressão de seleção. A única espécie que está presente em todas  
346 as populações foi *L. theobromae* demonstrando assim que esta espécie possivelmente  
347 desenvolveu algum tipo de resistência ou adaptação a certos fungicidas como os aplicados nas

348 áreas. Atualmente, as espécies de *Lasiodiplodia* são distinguidas com base nas sequências da  
349 região ITS e EF-1 $\alpha$ , características morfológicas e cultural, como também o tipo de manejo.

350 Este trabalho mostra que várias espécies do gênero *Lasiodiplodia* estão associadas à  
351 podridão penular no mamão. As espécies *L. pseudotheobromae*, *L. hormozganensis* e  
352 *Lasiodiplodia* sp. são aqui relatadas pela primeira vez, tanto no Brasil como na cultura do  
353 mamão. Apesar de *L. theobromae* ser o mais frequente não é único o agente etiológico. Os  
354 resultados desse estudo certamente serão decisivos para uma melhor formulação de estratégias  
355 de controle e programas de melhoramento genético para a cultura do mamoeiro.

356

### 357 **AGRADECIMENTOS**

358

359 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo  
360 suporte financeiro, e à Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) pelo suporte  
361 científico e tecnológico.

362

### 363 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

364

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

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

369 Begoude BAD, Slippers B, Wingfield MJ, Roux J (2010) Botryosphaeriaceae associated with  
370 *Terminalia catappa* in Cameroon, South Africa and Madagascar. *Mycologia Progress* 9:101-  
371 123.

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

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

378 Denman S, Crous PW, Groenewald JZ, Slippers B, Wingfield BD, Wingfield MJ (2003)  
379 Circumscription of *Botryosphaeria* species associated with *Proteaceae* based on morphology  
380 and DNA sequence data. *Mycologia* 95:294–307.

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

383 Jacobs KA, Rehner SA (1998) Comparison of cultural and morphological characters and ITS  
384 sequences in anamorphs of *Botryosphaeria* and related taxa. *Mycologia* 90:601–610.

385 Martins DS, Costa AFS (Eds.) (2003) A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção.  
386 Vitória: Incaper.

387 Oliveira SMA, Terao D, Dantas SAF, Tavares SCCH (Eds.) (2006) Patologia pós-colheita:  
388 frutas, olerícolas e ornamentais tropicais. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica.

389 Page RDM (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal  
390 computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12:357-358.

391 Pavlic D, Slippers B, Coutinho CTA, Gryzenhout M, Wingfield MJ (2004) *Lasiodiplodia*  
392 *gonubiensis* sp. nov., a new *Botryosphaeria* anamorph from native *Syzygium cordatum* in  
393 South Africa. *Studies in Mycology* 50:313-322.



394 Phillips AJL, Fonseca F, Pova V, Castilho R, Nolasco G (2002) A reassessment of the  
395 anamorphic fungus *Fusicoccum luteum* and description of its teleomorph *Botryosphaeria*  
396 *lutea* sp. nov. *Sydowia* 54:59–77.

397 Phillips AJL *Botryosphaeria*. Portugal: Universidade Nova Lisboa, 2004. Disponível em:  
398 <[http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria\\_site/genus\\_concept.htm](http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site/genus_concept.htm)>. Acesso em: 24 de  
399 maio de 2011.

400 Rayner RW (1970) A mycological colour chart. CMI and British Mycological Society, Kew,  
401 Surrey, UK.

402 Rezende JAM, Martins MC (2005) Doenças do mamoeiro. In: Kimati H, Amorim L, Rezende  
403 JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA (Eds.) Manual de Fitopatologia, vol.2: Doenças das  
404 plantas cultivadas. São Paulo: Ceres, 435-443.

405 Ritzinger CHSP, Souza JS (2000) Mamão Fitossanidade. EMBRAPA: Brasília.

406 Sakalidis ML, Hardy GE StJ, Burgess TI (2011) Endophytes as potential pathogens of the  
407 baobab species *Adansonia gregorii*: a focus on the Botryosphaeriaceae. *Fungal Ecology* 4:1–  
408 14.

409 Santana EM, Martins MVV, Lima IM, Costa H, Ventura JA, Vieira P (2007) Manejo das  
410 Doenças do Mamoeiro. In: Núcleo de Estudos em Fitopatologia, Universidade Federal de  
411 Lavras. Manejo Integrado de doenças de fruteiras. Brasília: Sociedade Brasileira de  
412 Fitopatologia 107-127.

413 Sharma TR, Singh BMP (1999) Applications of polymerase chain reaction in  
414 phytopathogenic microbes. *Indian Journal Microbiology* 39:79-91.

415 Sharma M, Gupta SK, Sharma TR (2005) Characterization of variability in *Rhizoctonia solani*  
416 by using morphological and molecular markers. *Journal Phytopathology* 153:449-456.

417 Slippers B, Crous PW, Denman S, Coutinho TA, Wingfield BD, Wingfield MJ (2004)  
418 Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species  
419 previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia* 96:1:83-101.

420 Smith RS, Crous PW, Wingfield MJ, Coutinho TA, Wingfield BD (2001) *Botryosphaeria*  
421 *eucalyptorum* sp. nov., a new species in the *B. dothidea*-complex on *Eucalyptus* in South  
422 Africa. *Mycologia* 93:277–284.

423 Swofford DL. PAUP\* (2003) Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods)  
424 Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

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

428 White, TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and sequencing of fungal ribosomal  
429 RNA genes for phyogenetics. In: Innis, M.<sup>a</sup> et al., (eds.) *PCR Protocols, a Guide to Methods*  
430 *and Applications*. New York. Academic Press, 315-322.

431 Young ND, Healy J (2003) GapCoder automates the use of indel characters in phylogenetic  
432 analysis. *BMC Bioinformatics*, United Kingdom, 4:6.

**Tabela 1** Relação de isolados de *Lasiodiplodia* utilizados no presente trabalho

<b>ISOLADO*</b>	<b>ESPÉCIE</b>	<b>LOCAL</b>	<b>CULTIVAR DE MAMOEIRO</b>
CMM 2168	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Parnamirim, RN	Golden
CMM 2170	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	Parnamirim, RN	Golden
CMM 2171	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	Parnamirim, RN	Golden
CMM 2173	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	Parnamirim, RN	Golden
CMM 2179	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	São José do Mapitu, RN	Golden
CMM 2183	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	São José do Mapitu, RN	Golden
CMM 2184	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	São José do Mapitu, RN	Golden
CMM 2185	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Santa Rita, PB	Baixinho de Santa Amélia
CMM 2186	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Santa Rita, PB	Baixinho de Santa Amélia
CMM 2188	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Santa Rita, PB	Baixinho de Santa Amélia
CMM 2190	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Santa Rita, PB	Baixinho de Santa Amélia
CMM 2193	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Santa Rita, PB	Golden
CMM 2208	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Conde/PB	Havai
CMM 2209	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Conde, PB	Havai
CMM 2210	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Conde, PB	Havai
CMM 2212	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Pitibú PB	Calimosa
CMM 2214	<i>Lasiodiplodia hormozganensis</i>	Pitibú PB	Calimosa
CMM 2215	<i>Lasiodiplodia hormozganensis</i>	Pitibú PB	Calimosa
CMM 2216	<i>Lasiodiplodia hormozganensis</i>	Pitibú PB	Calimosa
CMM 2219	<i>Lasiodiplodia hormozganensis</i>	Pitibú PB	Calimosa
CMM 2220	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Pitibú PB	Calimosa
CMM 2231	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	São José do Mapitu, RN	Havai

**Tabela 1 Cont.**

---

CMM 2232	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	São José do Mapitu, RN	Havai
CMM 2235	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Juazeiro, BA	Golden
CMM 2237	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	São José do Mapitu, RN	Havai
CMM 2238	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	São José do Mapitu, RN	Havai
CMM 2239	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	São José do Mapitu, RN	Havai
CMM 2241	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	São José do Mapitu, RN	Golden
CMM 2248	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Mossoró, RN	Formosa
CMM 2249	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Mossoró, RN	Formosa
CMM 2251	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Quixere, CE	Formosa
CMM 2253	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Quixere, CE	Formosa
CMM 2255	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Quixere, CE	Formosa
CMM 2256	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Quixere, CE	Formosa
CMM 2257	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Quixere, CE	Formosa
CMM 2258	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Quixere, CE	Formosa
CMM 2259	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Quixere, CE	Formosa
CMM 2260	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Quixere, CE	Formosa
CMM 2261	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Goiana, PE	Havai
CMM 2262	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Goiana, PE	Havai
CMM 2265	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Goiana, PE	Havai
CMM 2266	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Goiana, PE	Havai
CMM 2267	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Goiana, PE	Havai
CMM 2268	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Goiana, PE	Havai
CMM 2269	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Goiana, PE	Havai

---

**Tabela 1 Cont.**

CMM 2271	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	Goiana, PE	Golden
CMM 2272	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	Goiana, PE	Golden
CMM 2274	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	Goiana, PE	Golden
CMM 2275	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	Goiana, PE	Golden
CMM 2276	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Amaraji, PE	Havai
CMM 2278	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Amaraji, PE	Havai
CMM 2280	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Amaraji, PE	Havai
CMM 2282	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Amaraji, PE	Golden
CMM 2287	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	Goiana, PE	Golden
CMM 2288	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	Goiana, PE	Golden
CMM 2289	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	Mossoró, RN	Formosa
CMM 2292	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Mossoró, RN	Formosa
CMM 2294	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Santa Rita, PB	Golden
CMM 2295	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Santa Rita, PB	Baixinho de Santa Amélia
CMM 2297	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Conde/PB	Havai
CMM 2298	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	São José do Mapitu, RN	Golden
CMM 2303	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Santa Rita, PB	Golden
CMM 2306	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	São José do Mapitu, RN	Golden
CMM 2310	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Santa Rita, PB	Golden
CMM 2312	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Petrolina, PE	Havai
CMM 2313	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Petrolina, PE	Havai
CMM 2314	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Petrolina, PE	Havai
CMM 2315	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Petrolina, PE	Havai
CMM 2317	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Petrolina, PE	Havai

**Tabela 1 Cont.**

CMM 2318	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Petrolina, PE	Havai
CMM 2319	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Petrolina, PE	Havai
CMM 2321	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Petrolina, PE	Havai
CMM 2327	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Juazeiro, BA	Golden
CMM 2328	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Juazeiro, BA	Golden
CMM2218	<i>Lasiodiplodia hormozganensis</i>	Pitibú PB	Calimosa

\* Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos "Profª. Maria Menezes".

**Tabela 2** Relação dos isolados e número de acesso do GenBank das sequências utilizadas como referência

ESPECIE	IDENTIFICAÇÃO	HOSPEDEIRO	LOCAL	AUTOR	CODIGO DE ACESSO DO GENBANK	
					ITS	EF-1 $\alpha$
<i>L. theobromae</i>	CBS164.96	Fruit on coral reef coast	Nova Guiné	A.Aptroot	AY640255	AY640258
<i>L. hormozganensis</i>	CBS111530	desconhecido	desconhecido	Desconhecido	EF622074	EF622054
	IRAN1500C	<i>Olea</i> sp	Irã	J. Abdollahzadeh/A. Javadi	GU945355	GU945340
<i>L. crassispora</i>	IRAN1498C	<i>Magifera indica</i>	Irã	J. Abdollahzadeh/A. Javadi	GU945356	GU945344
	CMW13488	<i>E. urophylla</i>	Venezuela	S. Mohali	DQ103552	DQ103559
	CMW 14691	<i>S. album</i>	Australia	T.I. Burgess/G. Pegg	DQ103550	DQ103557
<i>L. iraniensis</i>	IRAN1520C	<i>Salvadora persica</i>	Irã	J. Abdollahzadeh/A. Javadi	GU945348	GU945336
<i>L. pseudotheobromae</i>	IRAN1502C	<i>Juglans</i> sp.	Irã	A. Javadi	GU945347	GU945335
	CBS116459	<i>Gmelina arborea</i>	Costa Rica	J. Carranza-Velásquez	EF622077	EF622057
	IRAN1518C	<i>Citrus</i> sp.	Irã	J. Abdollahzadeh/A. Javadi	GU973874	GU973866
<i>L. gonubiensis</i>	CMW14078	<i>Syzigium cordatum</i>	Africa do Sul	D. Pavlic	AY639594	DQ103567
	CBS115812	<i>Syzygium cordatum</i>	Africa do Sul	D. Pavlic	DQ458892	DQ458860
<i>L. margaritaceae</i>	CBS122065	<i>Adansonia gibbosa</i>	Australia Ocidental	T.I. Burgess	EU144051	EU144066

**Tabela 2** Cont.

	CBS122519	<i>Adansonia gibbosa</i>	Australia Ocidental	T.I. Burgess	EU144050	EU144065
<i>L. rubropurpurea</i>	CMW 14700	<i>E. grandis</i>	Queensland	T.I. Burgess/G. Pegg	DQ103553	DQ103571
	WAC12536	<i>E. grandis</i>	Queensland	T.I. Burgess/G. Pegg	DQ103554	DQ103572
<i>L. mahajangana</i>	CMW27820	<i>Terminalia catappa</i>	Madagascar	J. Roux	FJ900597	FJ900643
	CMW27801	<i>Terminalia catappa</i>	Madagascar	J. Roux	FJ900595	FJ900641
<i>L. venezuelensis</i>	WAC12539	<i>Acacia mangium</i>	Venezuela	S. Mohali	DQ103547	DQ103568
	WAC12540	<i>Acacia mangium</i>	Venezuela	S. Mohali	DQ103548	DQ103569
<i>L. parva</i>	CBS494.78	Cassava-field soil	Colombia	O. Rangel	EF622084	EF622064
	CBS456.78	Cassava-field soil	Colombia	O. Rangel	EF622083	EF622063
<i>L. citricola</i>	IRAN1522C	<i>Citrus</i> sp	Irã	J. Abdollahzadeh/A. Javadi	GU945354	GU945340
	IRAN1521C	<i>Citrus</i> sp	Irã	A. Shekari	GU945353	GU945339
<i>L. plurivora</i>	STE-U5803	<i>Prunus salicina</i>	Africa do Sul	U.Damm F.	EF445362	EF445395
	STE-U4583	<i>Vitis vinifera</i>	Africa do Sul	Halleen	AY343482	EF445396
<i>L. gilaniensis</i>	IRAN1501C	desconhecido	Irã	J. Abdollahzadeh/A. Javadi	GU945352	GU945341
	IRAN1523C	desconhecido	Irã	J. Abdollahzadeh/A. Javadi	GU945351	GU945342
<i>L. viticola</i>	UCD2604MO	grapevines	Missouri, USA	k.Striegler & G.M.Leavitt	HQ288228	HQ288270



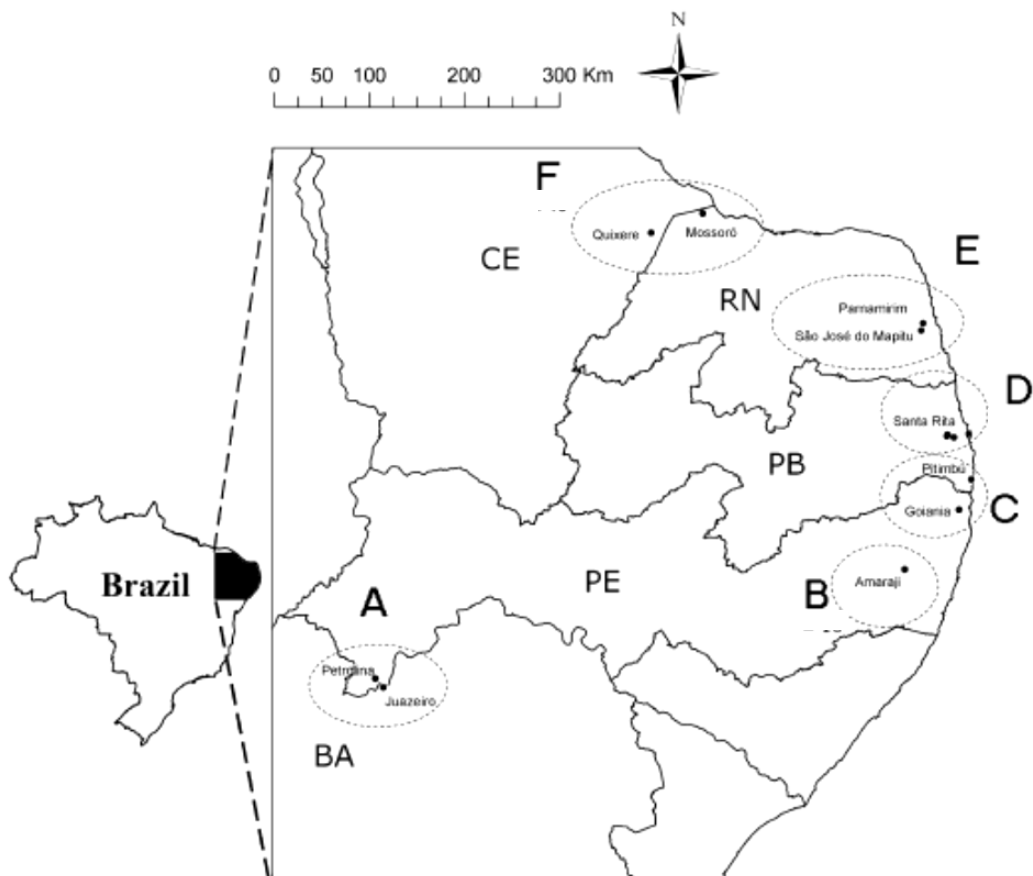
**Tabela 2** Cont.

	UCD2553AR	grapevines	Arkansas, USA	R.D. Cartwright & W.D. Gubler	HQ288227	HQ288269
<i>L. missouriana</i>	UCD2199MO	grapevines	Missouri, USA	k.Striegler & G.M.Leavitt	HQ288226	HQ288268
	UCD2193MO	grapevines	Missouri, USA	k.Striegler & G.M.Leavitt	HQ288225	HQ288267
<i>Diplodia seriata</i>	CBS112555	<i>Vitis vinifera</i>	Portugal	A.J.L. Phillips	AY259094	AY573220
<i>Diplodia mutila</i>	CBS112553	<i>Vitis vinifera</i>	Portugal	A.J.L. Phillips	AY259093	AY573219

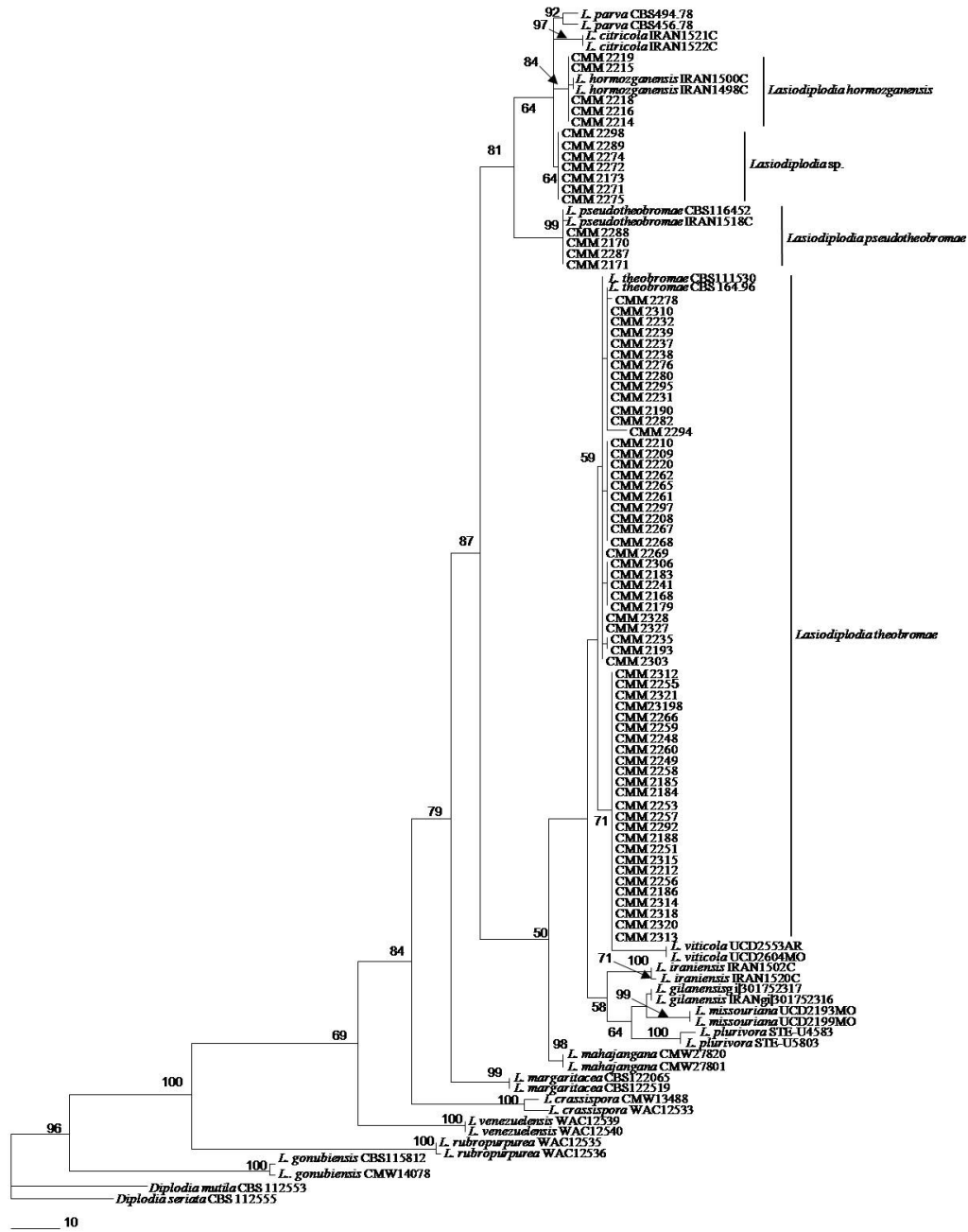
**Tabela 3** Dimensão dos conídios de espécies de *Lasiodiplodia*

Espécies	Tamanho do conídio ( $\mu\text{m}$ ) <sup>a</sup>	Média $\pm$ desvio padrão ( $\mu\text{m}$ )	L/W <sup>c</sup>	Tamanho do conídio ( $\mu\text{m}$ ) <sup>b</sup>	L/W	Referência
<i>Lasiodiplodia hormozganensi</i>	(16.2-)19.8-25.7 x (8.8-)11-12.8	20.9 $\pm$ 1.9 x 10.9 $\pm$ 0.8	1.9	19.6-23.4 x 11.7-13.3	1.7	Abdollahzadeh et al. 2010
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	(12.3-)21.7-33.6 x (10.3-)12.8-18.5	22.7 $\pm$ 2.0 x 12.9 $\pm$ 1.2	1.8	23.6-28.8 x 13-15.4	1.9	Alves et al. 2008
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	(19.9-)24.2-31.4 x (11.1-)13.2-14.9	23.5 $\pm$ 2.3 x 13.2 $\pm$ 0.7	1.8	21.7-26.3 x 13.4-14.8	1.7	Abdollahzadeh et al. 2010
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	(15.4-)19.1-28.5 x (8.8-)10-15.3	21.2 $\pm$ 3.2 x 11.4 $\pm$ 1.6	1.9	-----	---	

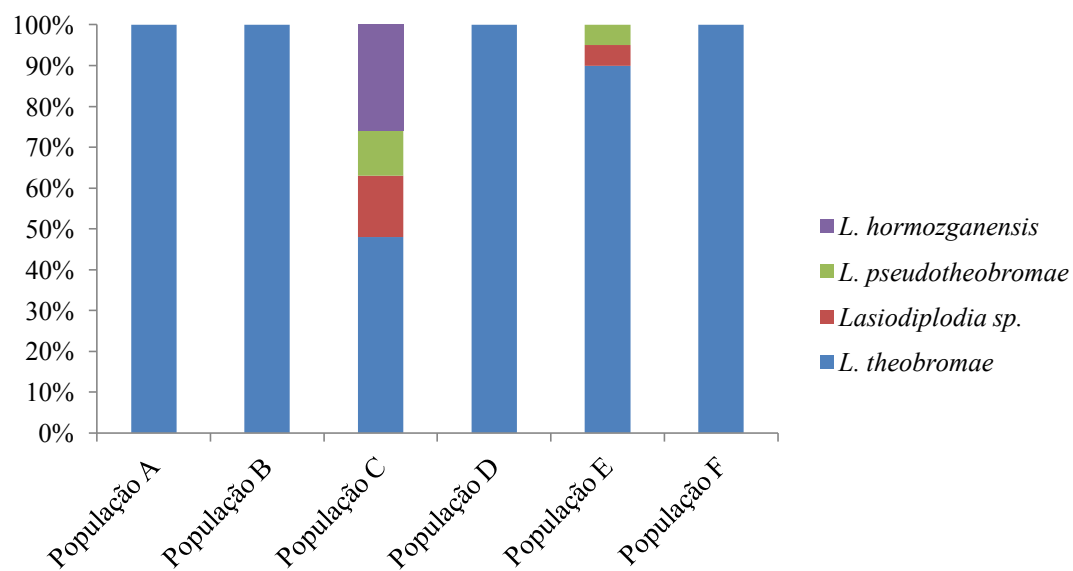
<sup>a</sup> Tamanho mínimo, moda e tamanho máximo do comprimento e largura de 50 conídios. <sup>b</sup> Tamanho mínimo e tamanho máximo do comprimento e largura de conídios na literatura. <sup>c</sup> Razão comprimento/ largura.



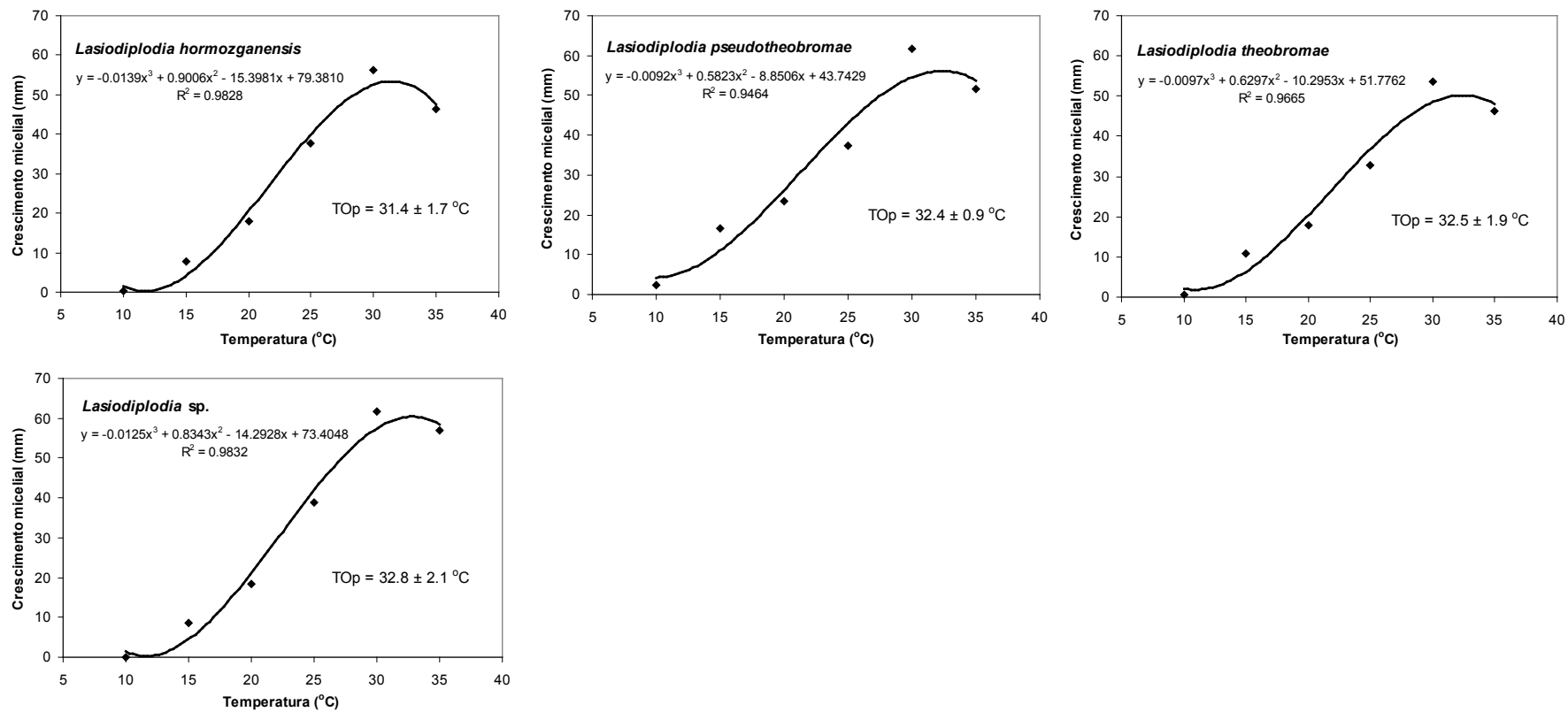
**Figura 1** Locais de coleta dos isolados de *Lasiodiplodia* em pomares brasileiros de mamão, localizados nos estados da Bahia (BA), Pernambuco (PE), Paraíba (PB), Rio Grande do Norte (RN) e Ceará (CE).



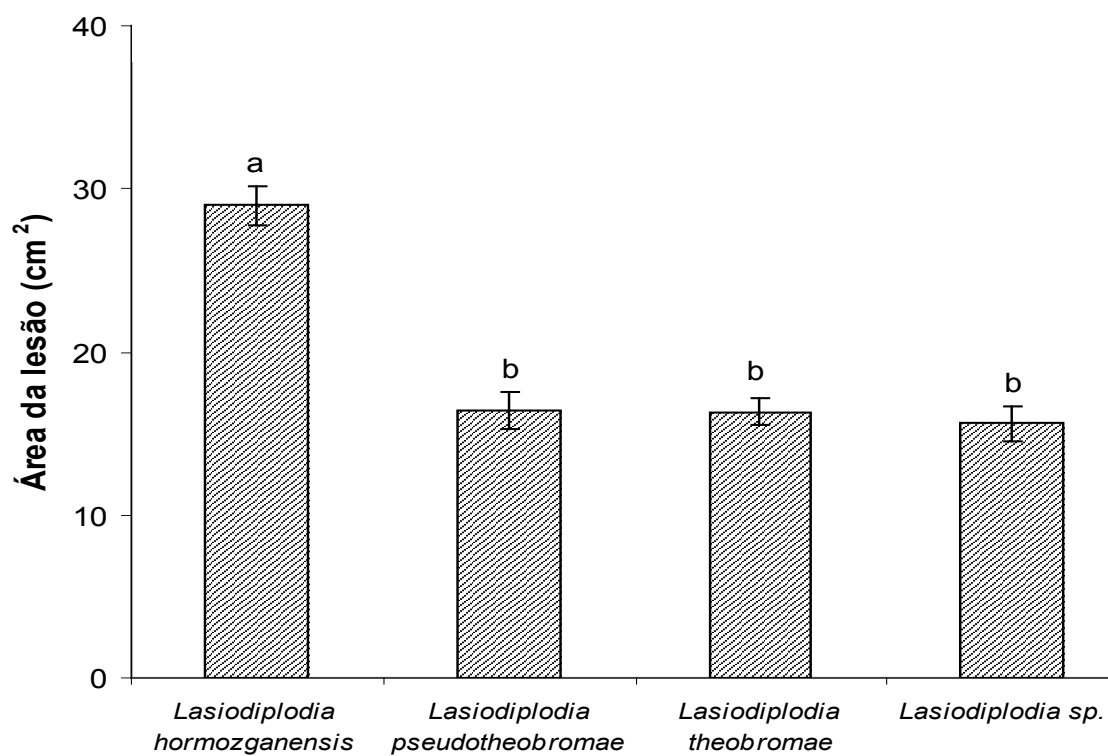
**Figura 2** Uma das oito árvores mais parcimoniosas obtidas a partir da análise combinada das sequências de ITS e EF1-alfa (comprimento= 333, CI=0.685, RI=0.907 e HI=0.315). Os valores de *Bootstrap* a partir de 1000 repetições são mostrados acima dos ramos.



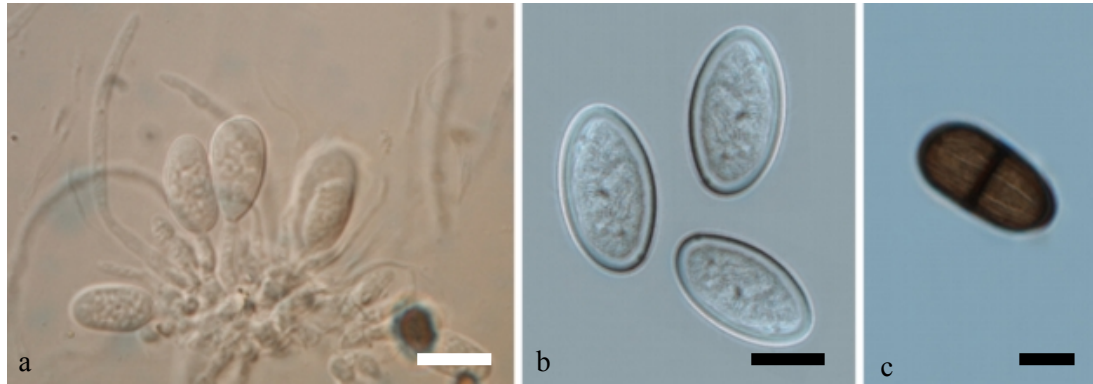
**Figura 3** Distribuição das espécies de *Lasiodiplodia* associadas com podridão peduncular em mamão no nordeste do Brasil.



**Figura 4** Influência da temperatura no crescimento micelial de quatro espécies de *Lasiodiplodia* associadas com podridão peduncular em mamão no nordeste do Brasil. TOp = temperatura ótima (média  $\pm$  erro padrão) para o crescimento micelial.

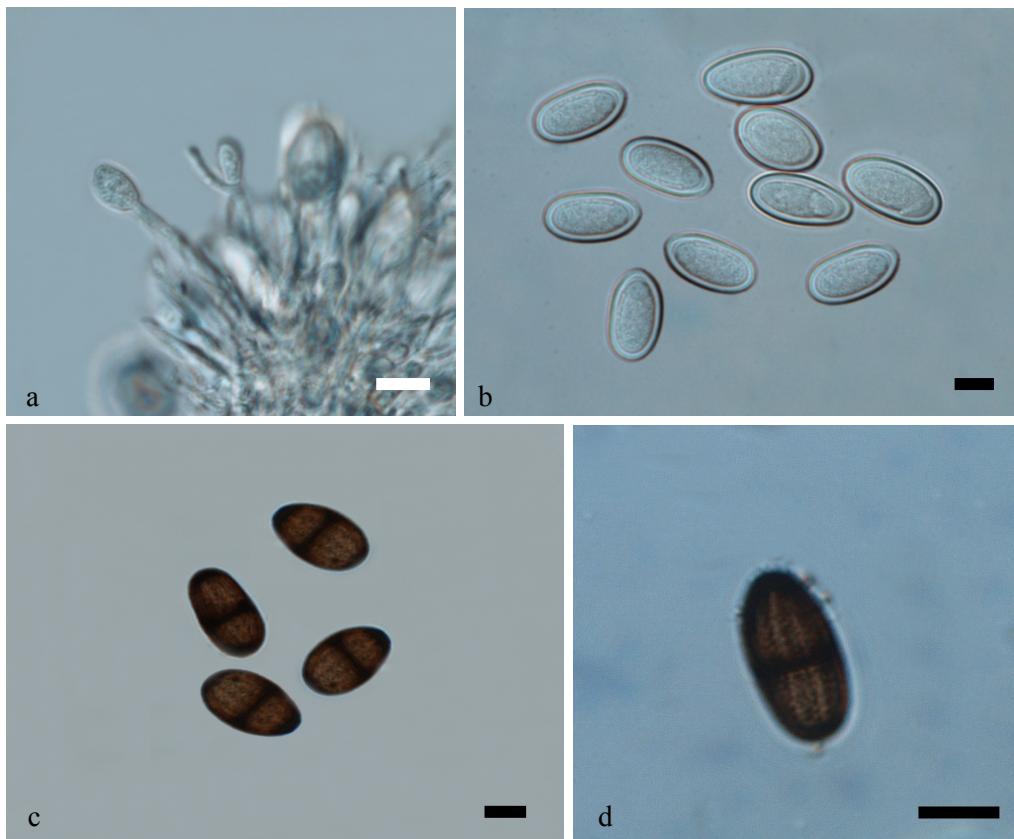


**Figura 5** Médias das áreas (cm<sup>2</sup>) de lesões em mamão (cv. Golden) induzidas por quatro espécies de *Lasiodiplodia* associadas com podridão peduncular no nordeste do Brasil. As barras representam o erro padrão da média e áreas de lesões significativamente diferentes ( $P \leq 0,05$ ) apresentam uma letra diferente sobre a barra de erro.

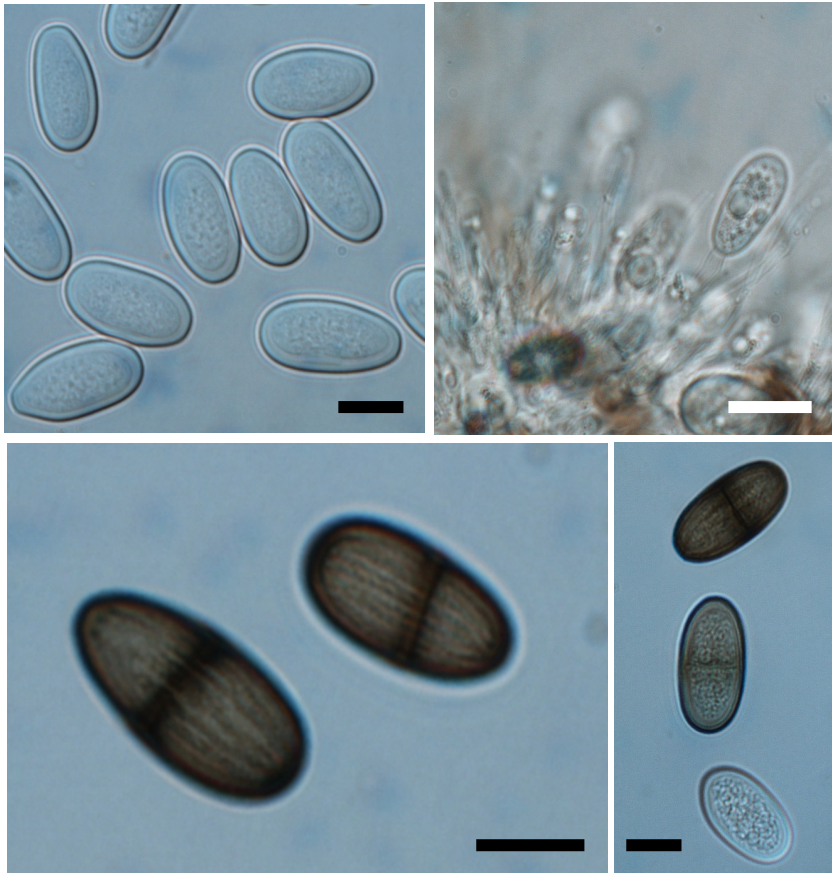


**Figura 6** *Lasiodiplodia theobromae* a. célula conidiogênica, b. conídio imaturo; c. conídio maduro mostrando as estrias longitudinais; d. Escala = 10 $\mu$ m.





**Figura 7** *Lasiodiplodia* sp. a. célula conidiogênica; b. conídio imaturo; c. conídios maduros; d. conídio maduro mostrando as estrias longitudinais. Escala = 10 $\mu$ m.



**Figura 8** *Lasiodiplodia hormozganensis* a. conídio imaturo;  
b. célula conidiogénica; c. conídio maduro mostrando as  
estrias longitudinais; d. conídio maduro, conídio imaturo.  
Escala = 10 $\mu$ m.

## **Conclusões Gerais**

---

---

## CONCLUSÕES GERAIS

- A combinação dos genes ITS e EF-1 $\alpha$  foram eficientes para a identificação das espécies *L. theobromae*, *L.pseudotheobromae*, *L. hormozganensis* e *Lasiodiplodia* sp. associados a podridão peduncular no Brasil;
- Taxa de crescimento não foi uma variável eficiente para separa as espécies de *Lasiodiplodia*;
- *Lasiodiplodia theobromae* não é o único agente etiológico associado à podridão peduncular do mamoeiro.