

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE PLANTAS**

**TIAGO JORGE DE ARAUJO BARBOSA**

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE BOTRYOSPHAERIACEAE E DE**  
*Neopestalotiopsis* **ASSOCIADAS A DOENÇAS FOLIARES DO COQUEIRO**

**RIO LARGO-AL**

**2019**

**TIAGO JORGE DE ARAUJO BARBOSA**

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE BOTRYOSPHAERIACEAE E DE**  
*Neopestalotiopsis* **ASSOCIADAS A DOENÇAS FOLIARES DO COQUEIRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Proteção de Plantas da Universidade Federal de  
Alagoas, como requisito parcial para obtenção do  
título de Doutor em Proteção de Plantas.

Orientação: Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima

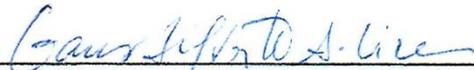
**RIO LARGO-AL**

**2019**

TIAGO JORGE DE ARAUJO BARBOSA

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE BOTRYOSPHAERIAEAE E DE  
*Neopestalotiopsis* ASSOCIADAS A DOENÇAS FOLIARES DO COQUEIRO**

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas.



---

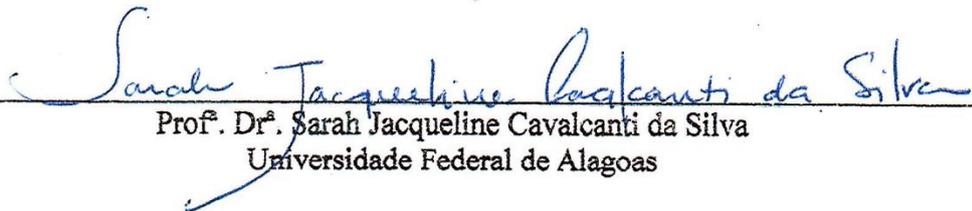
Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima (Orientador)  
Universidade Federal de Alagoas

**Banca Examinadora:**



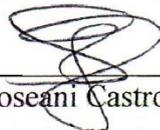
---

Prof. Dr.ª Maria de Fátima Muniz  
Universidade Federal de Alagoas



---

Prof.ª Dr.ª Sarah Jacqueline Cavalcanti da Silva  
Universidade Federal de Alagoas



---

Dr.ª Joseani Castro da Silva  
EMATER - AL

RIO LARGO-AL

2019

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale CRB4 - 6611

B238i Barbosa, Tiago Jorge de Araújo.

Identificação de espécies de Botryosphaeriaceae e de *Neopestalotiopsis* associadas a doenças foliares do coqueiro / Tiago Jorge de Araújo Barbosa. – Maceió, 2019.

82 f. : il. color.

Orientador: Gaus Silvestre de Andrade Lima.

Tese (Doutorado em Agronomia.) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas. Rio Largo, 2019.

Inclui bibliografias.

1. Cocoicultura. 2. Patógeno foliar. 3. Neodeightonia. 4. Pestalotioid, filogenia. I. Título.

CDU: 634.616

*À minha amada esposa, Willyane dos Santos Barbosa,*

*por ser o porto seguro e a principal incentivadora desse projeto;*

*Aos meus filhos, Tiago Vinicius dos Santos Barbosa e Davi Felipe dos Santos Barbosa,*

*pela inspiração, incentivo e motivação para superar os obstáculos;*

*Aos meus pais, José Ferreira Barbosa e Severina de Araujo Barbosa,*

*pelos ensinamentos e pelo incondicional incentivo à educação.*

***Dedico***

## AGRADECIMENTOS

*Ao meu bom Deus pelo dom da vida e por colocar em meu caminho, pessoas maravilhosas que me deram amor e me ajudaram nas horas que mais precisei.*

*À Universidade Federal de Alagoas, por meio do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas, pela oportunidade a mim concedida para a realização desse sonho.*

*Ao Instituto Federal de Alagoas, em especial ao Campus Maragogi – IFAL Maragogi (meu local de trabalho), por oportunizar este servidor a qualificação.*

*Em especial à Prof Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima, pela oportunidade, orientação e ensinamentos a mim dedicado.*

*Ao Pós-Doutorando Dr. Frederico Monteiro Feijó, que Coorientou esse trabalho e contribuiu de forma significativa com a execução.*

*Aos colegas e professores do curso de Agroecologia do IFAL- Maragogi: André Sueldo, Francisco Xavier, Jailso Alves, Marcelo Cavalcante, Mônica Porto e Orcar Rafle, por assumirem minhas disciplinas e me proporcionarem o afastamento.*

*Aos companheiros e companheiras que também me ajudaram na execução deste trabalho: Antônio Duarte, Mayara Lima, Mayra Ferro e Nayana Bruschi.*

*Aos colegas do Laboratório Fitopatologia Molecular, pelo companheirismo, convivência e aprendizado.*

*A Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iraildes Pereira Assunção.*

*As Professoras: Dr<sup>a</sup> Maria de Fátima Muniz, Dr<sup>a</sup> Sônia Maria Fortti Broglio e Dr<sup>a</sup> Elineide Barbosa de Souza, não só pelo exemplo como professores, mas pelos ensinamentos a mim transmitidos.*

*Aos componentes da Banca examinadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria de Fátima Muniz, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sarah Jacqueline Cavalcanti da Silva e Dr<sup>a</sup>. Joseani Castro da Silva, pelas considerações relevantes a este trabalho.*

*Aos secretários do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas Gustavo e Maxsuel por toda dedicação e apoio.*

*Ao Professor do IFAL – Maceió, Me. Antônio Carlos de Lima Santos, pelo apoio e incentivo.*

*A todos os Professores, funcionários, colegas de curso, amigos e familiares que direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste projeto e para o meu crescimento como pessoa, MUITO OBRIGADO!*

## RESUMO GERAL

O cultivo do coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é realizado em vários países. No Brasil, a cultura é amplamente cultivada, sendo considerada uma frutífera de grande importância econômica. Nos últimos anos deixou de ser produzido apenas nas zonas costeiras e vem se expandindo para regiões mais centrais do país. Com o aumento na produção houve o favorecimento da disseminação de doenças fúngicas, sobretudo as foliares, responsáveis por redução do potencial de produção. A queima das folhas é considerada a doença foliar mais importante em coqueiro. A doença está associada a espécies de *Lasiodiplodia* spp., porém, se faz necessário revisar se o gênero *Lasiodiplodia* é o único membro da família Botryosphaeriaceae a causar queima das folhas do coqueiro. Outra doença foliar importante é a mancha de pestalotia do coqueiro. Essa doença tem como agente etiológico, fungos pertencentes ao complexo Pestalotioid, que estão amplamente distribuídos na natureza. Entretanto, existem poucas informações sobre a real identificação desses patógenos. Diante disso, se torna importante a busca por informações sobre esses patógenos foliares, fazendo-se necessário uma identificação precisa das espécies associadas a essas doenças. Assim, este trabalho teve como objetivos: identificar filogenética e morfológicamente espécies de Botryosphaeriaceae associadas a queima das folhas do coqueiro no nordeste do Brasil e identificar e caracterizar espécies do complexo Pestalotioid associadas a mancha de pestalotia na cultura do coqueiro. No primeiro capítulo, foram obtidos 28 isolados patogênicos de Botryosphaeriaceae, oriundos de plantios comerciais nos Estados de Alagoas e Sergipe. As análises morfológicas e moleculares permitiram a identificação de duas espécies pertencentes a dois gêneros distintos de Botryosphaeriaceae associadas à queima das folhas do coqueiro, *L. theobromae* e *Neodeightonia alagoensis* sp. nov. No segundo capítulo foram obtidos 10 isolados patogênicos de lesões típicas de mancha de pestalotia do coqueiro. De acordo com as análises morfológicas e moleculares, identificou-se três espécies pertencentes ao gênero *Neopestalotopsis*: *N. foedans*, *N. ellipospora* e *Neopestalotopsis* sp. associadas à mancha de pestalotia do coqueiro no Brasil.

**Palavras-chave:** *Cocos nucifera*, *Neodeightonia*, complexo Pestalotioid, filogenia multilocus.

## ABSTRACT

Coconut cultivation (*Cocos nucifera* L.) is carried out in several countries. In Brazil, the culture is widely cultivated, being considered a fruit of great economic importance. In recent years it has ceased to be produced only in coastal areas and has been expanding to more central regions of the country. With the increase in production, there was favoring the spread of fungal diseases, especially foliar diseases, responsible for the reduction of production potential. Leaf burning is considered the most important foliar disease in coconut. The disease is associated with species of *Lasiodiplodia* spp., However, it is necessary to review if the genus *Lasiodiplodia* is the only member of the family Botryosphaeriaceae to cause burning of the leaves of the coconut. Another important leaf disease is the spot of coconut palm pestalotia. This disease has as etiological agent, fungi belonging to the Pestalotioid complex, which are widely distributed in nature. However, there is little information on the actual identification of these pathogens. Therefore, it is important to search for information on these foliar pathogens, making it necessary to accurately identify the species associated with these diseases. The objective of this work was to identify phylogenetically and morphologically Botryosphaeriaceae species associated with the burning of coconut palm leaves in the northeast of Brazil and to identify and characterize species of the Pestalotioid complex associated to the spot of pestalotia in the coconut palm crop. In the first chapter, 28 pathogenic isolates of Botryosphaeriaceae were obtained from commercial plantations in the States of Alagoas and Sergipe. Morphological and molecular analyzes allowed the identification of two species belonging to two distinct genera of Botryosphaeriaceae associated to the burning of the coconut leaves, *L. theobromae* and *Neodeightonia alagoensis* sp. nov. In the second chapter 10 pathogenic isolates were obtained from lesions typical of coconut pestalotia spot. According to the morphological and molecular analyzes, three species belonging to the genus *Neopestalotopsis* were identified: *N. foedans*, *N. ellipsospora* and *Neopestalotopsis* sp. associated with coconut pestalotia spot in Brazil.

**Key words:** *Cocos nucifera*, *Neodeightonia*, Pestalotioid complex, multilocus phylogeny.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Árvore filogenética de inferência Bayesiana com base nas sequências combinadas das regiões ITS, TEF1- $\alpha$  e LSU. *Spencermatinsia viticola* foi utilizado como outgroup. Isolados caracterizados neste estudo estão destacadas em negrito..... 49
- Figura 2** Sintomas de queima das folhas do coqueiro e aspectos culturais, morfológicos e patogênicos de *Neodeightonia alagoensis*. Sintoma em “V” invertido, típico da doença no campo (**A**); Sintomas visualizados em folha e raque nos testes de patogenicidade (**B-C**); Colônia em BDA com 10 dias (**D**); Picnídio sobre acícula de pinheiro (**E**); Ascas maduras e imaturas (**F**); Células conidiogênicas sem presença de paráfises (**G-H**); e conídios de *N. alagoensis* (**I**)..... 51
- Figura 3** Árvore filogenética de inferência Bayesiana com base nas sequências concatenadas das regiões ITS,  $\beta$ -tub e TEF1- $\alpha$ . *Pestalotiopsis trachicarpicola* foi utilizado como outgroup. Isolados caracterizados neste estudo estão destacadas em negrito..... 71
- Figura 4** Sintomas de *Neopestalotiopsis* em folíolos de *Cocos nucifera* oriundos de plantios comerciais (**AI** e **AII**); Detalhe das lesões após o teste de patogenicidade (**AIII**); Colônias em meio BDA, corpos de frutificação e conídios maduros de *N. foedans* (**B**), *N. ellipsospora* (**C**) e *Neopestalotiopsis* sp. (**D**)..... 73

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Descrição dos primers utilizados para identificação dos gêneros fúngicos de Botryosphaeriaceae.....	44
<b>Tabela 2</b>	Números de acesso GenBank das sequências de Botryosphaeriaceae utilizadas nas análises filogenéticas.....	45
<b>Tabela 3</b>	Isolados coletados de plantios comerciais nos estados de Alagoas e Sergipe.....	48
<b>Tabela 4</b>	Características morfológicas da espécie de <i>Neodeightonia</i> encontrada neste estudo e das espécies já descritas.....	51
<b>Tabela 5</b>	Descrição dos primers usados para identificação de espécies pertencentes ao gênero <i>Neopestalotiopsis</i> .....	66
<b>Tabela 6</b>	Números de acessos GenBank das sequências utilizadas em análises filogenéticas de fungos do complexo Pestalotioid.....	67

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
2.1 A cultura do coqueiro.....	15
2.1.1 Coqueiro-anão .....	15
2.1.2 Importância econômica da cultura.....	16
2.2 Doenças foliares do coqueiro .....	17
2.2.1 Queima das folhas do coqueiro .....	17
2.2.1.1 Família Botryosphaeriaceae .....	18
2.2.1.2 Aspectos filogenéticos da família Botryosphaeriaceae.....	19
2.2.1.3 Gênero <i>Lasiodiplodia</i> .....	21
2.2.1.4 Gênero <i>Neodeightonia</i> .....	22
2.2.2 Mancha de Pestalotia .....	23
2.2.2.1 Complexo Pestalotioid.....	24
2.2.2.2 Aspectos filogenéticos do complexo Pestalotioid .....	25
2.2.2.3 Gênero <i>Neopestalotiopsis</i> .....	26
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>26</b>
<b>3 CAPÍTULO I: IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE BOTRYOSPHAERIACEAE ASSOCIADAS A QUEIMA DAS FOLHAS DO COQUEIRO NOS ESTADOS DE ALAGOAS E SERGIPE .....</b>	<b>38</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>39</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>40</b>
3.1 Introdução.....	41
3.2 Material e Métodos.....	42
3.2.1 Obtenção e preservação dos isolados .....	42
3.2.2 Teste de patogenicidade .....	43
3.2.3 Caracterização molecular .....	43
3.2.3.1 Extração, amplificação e sequenciamento de DNA .....	43
3.2.3.2 Análises filogenéticas .....	44
3.2.4 Caracterização cultural e morfológica .....	46

3.3 Resultados e Discussão.....	47
3.3.1 Resultados.....	47
3.3.1.1 Obtenção dos isolados .....	47
3.3.1.2 Teste de patogenicidade .....	48
3.3.1.3 Análise filogenética .....	48
Taxonomia .....	50
3.3.2 Discussão .....	52
3.4 Conclusões.....	55
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>56</b>
<b>4 CAPÍTULO II: IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE <i>Neopestalotiopsis</i></b> <b>ASSOCIADAS À MANCHA DE PESTALOTIA DO COQUEIRO.....</b>	<b>61</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>62</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>63</b>
4.1 Introdução.....	64
4.2 Material e Métodos.....	65
4.2.1 Origem, obtenção e preservação dos isolados .....	65
4.2.2 Teste de patogenicidade .....	65
3.2.3 Caracterização molecular .....	66
4.2.2 Caracterização morfológica e cultural .....	68
4.3 Resultados e Discussão.....	69
4.3.1 Resultados.....	69
4.3.1.1 Obtenção dos isolados .....	69
4.3.1.2 Teste de patogenicidade .....	69
4.3.1.3 Análise filogenética .....	70
4.3.1.4 Caracterização morfológica e cultural .....	72
4.3.2 Discussão .....	73
4.4 Conclusões.....	77
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>78</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.), monocotiledônea pertencente à família Arecaceae, é amplamente cultivado em todo o mundo, sendo considerada uma das mais importantes espécies tropicais utilizadas pelo homem. É uma espécie perene, com viabilidade econômica de 30 a 70 anos, de acordo com a variedade cultivada. Originário do sudeste asiático, o coqueiro abrange terras intertropicais de mais de 90 países com cerca de 12 milhões de hectares plantados, caracterizando-se por ser uma cultura de muitas aplicações (CINTRA, 2009; JESUS-JUNIOR et al., 2015).

No Brasil, a cocoicultura vem se destacando nos últimos anos. Em 1990 o país ocupava a 10º posição no ranking mundial, com uma produção ao redor de 477 mil toneladas de coco. Atualmente o país é o quarto maior produtor mundial com uma produção aproximada de 2,9 milhões de toneladas, em uma área colhida de mais de 250 mil ha de coqueiros beneficiando diretamente mais de 220 mil produtores (FAOSTAT, 2016; BRAINER, 2017).

Atualmente a região Nordeste é a principal produtora do país com aproximadamente 75% da produção de coco, e o principal motivo para isso são as condições edafoclimáticas favoráveis ao cultivo. A crescente na produção, verificada nessa região nos últimos anos, se deve ao aumento da área plantada e dos financiamentos públicos e investimentos privados em plantios de coqueiro (JESUS-JUNIOR et al., 2015; IBGE, 2017). Contudo, com o incremento da produção muitos problemas fitossanitários começaram a ser observados, podendo ser ocasionados por fatores abióticos, insetos-pragas, ácaros e fitopatógenos, principalmente, as doenças causadas por fungos, como a queima das folhas do coqueiro e a mancha de pestalotia (FONTES; WANDERLEY, 2006).

A queima das folhas destaca-se por afetar negativamente a produção, uma vez que provoca abscisão prematura das folhas inferiores, reduzindo a área fotossintética em até 50% e deixando os cachos sem sustentação, conseqüentemente, os frutos caem antes do ponto de colheita (SOUSA FILHO et al., 1979; PUNITHALINGAM, 1980; MARIANO; SILVEIRA, 2005; MARIANO et al., 2016). Por muito tempo a doença foi atribuída à espécie *Lasiodiplodia theobromae* (SOUSA FILHO et al., 1979; MARIANO; SILVEIRA, 2005; COUTINHO et al., 2017) mas, estudos recentes identificaram mais três espécies associadas a queima das folhas do coqueiro, *L. euphorbicula* (COUTINHO et al., 2017), *L. brasiliense* e *L. pseudotheobromae* (SANTOS, 2017).

*Lasiodiplodia* é um dos 23 gêneros que compõem a família Botryosphaeriaceae. Essa família é constituída por complexos de espécies “crípticas”, ou seja, indivíduos semelhantes morfológicamente, mas que se diferem geneticamente (BICKFORD et al., 2006; ALVES et

al., 2007; SLLIPERS et al., 2017). Por esse motivo, a identificação das espécies passou a ser resolvida através de uma análise filogenética robusta com a combinação de pelo menos três regiões gênicas, nas quais, os genes do fator de alongamento da tradução 1  $\alpha$  (TEF1- $\alpha$ ) e da  $\beta$ -tubulina ( $\beta$ -tub) e a região do espaço interno transcrito (ITS) são as mais indicadas (PHILLIPS et al., 2013; MARQUES et al., 2013; SLIPPERS et al., 2014; MACHADO et al., 2014; ROSADO et al., 2016). Os membros dessa família são considerados importantes fitopatógenos e já foram detectados na maioria das áreas geográficas do mundo, causando doenças em muitas frutíferas e em culturas nativas, exóticas e de importância econômica para países tropicais e subtropicais (PHILLIPS et al., 2013; SLLIPERS et al., 2017).

A mancha de pestalotia do coqueiro, caracteriza-se por apresentar manchas elípticas com coloração parda-escura, de tamanhos variados, resultantes da coalescência das lesões menores (CARDOSO et al., 2003). A doença é atribuída a fungos do complexo Pestalotioid, que é formado por três gêneros distintos: *Pestalotiopsis*, *Neopestalotiopsis* e *Pseudopestalotiopsis* (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014). Os fungos desse complexo eram considerados de importância secundária, entretanto, tem ocasionado significativas perdas econômicas em uma ampla gama de hospedeiros (ÚRBEZ-TORRES et al., 2012; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014; JAYAWARDENA et al., 2016; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2016, ISMAIL, et al., 2017).

Segundo Maharachchikumbura et al. (2014), os gêneros podem ser distinguidos com base na morfologia dos conídios, especificamente com relação à pigmentação das três células medianas. As espécies do gênero *Pestalotiopsis* distinguem-se dos demais por apresentarem conídios fusiformes, com cinco células, sendo as três células medianas concolor marrom-claras, com extremidade hialina. Por outro lado, *Pseudopestalotiopsis* possui células medianas concolor marrom-escuras. Já *Neopestalotiopsis* apresenta conídios fusiformes, com cinco células, com células medianas versicolor (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014; JAYAWARDENA et al., 2016). Contudo, devido à similaridade morfológica entre espécies do complexo Pestalotioid, a identificação passou a ser realizada por meio do sequenciamento de DNA, com o uso de regiões genômicas específicas como, ITS, TEF1- $\alpha$  e  $\beta$ -tub (CROUS; HAWKSWORTH; WINGFIELD, 2015).

Estudos relacionados à etiologia da queima das folhas e da mancha de pestalotia são necessárias para estabelecer medidas fitossanitárias de controle e futuros programas de melhoramento de plantas. Assim, os objetivos deste trabalho foram: identificar e caracterizar espécies de Botryosphaeriaceae associadas à queima das folhas do coqueiro no nordeste do

Brasil e identificar e caracterizar espécies do complexo Pestalotioid associados à mancha de pestalotia na cultura do coqueiro.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A cultura do coqueiro

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.), da classe Monocotyledoneae, pertence à família Arecaceae. É uma cultura de grande importância mundial, devido à geração de empregos e renda em vários países. Seu cultivo contribui para a fixação do homem no campo, dada a variedade de produtos que oferece e a diversidade de uso, além de permitir a consorciação com cultivos de subsistência e até mesmo com criação de animais. Além dos frutos, todos os órgãos da planta são aproveitáveis como a raiz, o estipe, a inflorescência e as folhas que geram diversos subprodutos ou derivados de interesse econômico, sendo a planta também utilizada no paisagismo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; BRAINER, 2017).

No Brasil é conhecido como coco-da-baía, pois a introdução da cultura no país teria ocorrido pelo estado da Bahia. Atualmente são cultivados em quase todos os estados brasileiros, nos mais diversos solos, climas e condições de manejo. Assim, a cocoicultura passou a representar grande importância na sustentabilidade dos agroecossistemas das regiões tropicais costeiras (SIQUEIRA et al., 2002; IBGE, 2017).

#### 2.1.1 Coqueiro-anão

O gênero *Cocos*, constituído apenas pela espécie *C. nucifera*, apresenta duas variedades principais, a gigante (var. *typica*) e a anã (var. *nana*), conhecido também como coqueiro-anão. O coqueiro-anão se divide em três subvariedades: verde, amarela e vermelha. Além disso, existem diversos híbridos resultantes do cruzamento entre essas duas variedades (MARIANO et al., 2016).

O coqueiro-anão é essencialmente tropical e apresenta produção escalonada durante todo o ano com grande adaptabilidade a amplas variações climáticas. Em razão da sua precocidade, melhor sabor da água e menor porte, a variedade anã é a mais recomendada para exploração comercial de água de coco (OHLER, 1984; SIQUEIRA et al., 2002).

A área de plantio da variedade coqueiro-anão verde é a que mais cresce, pois, tal variedade mostra maior aceitação, bem como vantagens sob os aspectos de produtividade e precocidade. Esta variedade começa a produzir entre três e quatro anos, enquanto o coqueiro gigante leva cerca de sete anos para o início da produção. Além disso, produz maior número de frutos/planta/ano e apresenta menor altura da planta, favorecendo a colheita (CASTRO, 2009; BRAINER, 2017).

### 2.1.2 Importância econômica da cultura

O coco é produzido em cerca de 90 países que destinam o fruto, principalmente, para a produção de copra e óleo, principais derivados comercializados no mercado internacional. A Indonésia, Filipinas e Índia, principais produtores mundiais, detêm juntos 72,4% de área cultivada e 72,5% da produção mundial. O Brasil encontra-se em quarta colocação com apenas 2,6% de área cultivada, mas participa com 15,3% da produção mundial em virtude de sua elevada produtividade comparada aos três principais produtores (FAOSTAT, 2016).

A concorrência do Brasil com os países Asiáticos, maiores produtores da cultura, é de certa forma desigual, tendo em vista o subsídio que os governos desses países oferecem aos seus produtores. Sem citar que, na maioria dos países produtores, o coco é utilizado para a produção de óleo, enquanto no Brasil, talvez um dos únicos que exploram a cultura como fruteira e também como oleaginosa. Do coqueiro se aproveita tudo, desde o estipe para fabricação de móveis até as folhas que são utilizadas na confecção de produtos artesanais, além de servirem como cobertura de casas rústicas. Mas o fruto é o principal produto, tanto verde, para o consumo da água, muito apreciada em todo Brasil e também no exterior, quanto seco, de onde se extrai a copra (albúmen sólido) utilizada na fabricação de diversos produtos como óleo de coco, coco ralado, leite de coco, manteiga, cosméticos, entre outros (FONTES, 2013; EMBRAPA, 2016).

O coqueiro é cultivado em quase todo território nacional, com uma área de mais de 241,0 mil hectares com produção de de cerca de 1,7 milhões de toneladas de frutos. Ao contrário da produção mundial, que entre os anos de 2007 a 2014 registraram decréscimo na produção, o Brasil tem aumentado seus rendimentos, cujo crescimento no período, elevou a produção (IBGE, 2017; FAOSTAT, 2016). Este acréscimo ocorre em consequência da expansão do coqueiro para outras regiões, a qual se deu em função de uma crescente demanda por água de coco e consequente elevação de seu preço. Esse episódio gerou uma grande mudança na cultura do coqueiro no Brasil, a partir da modernização do seu processo produtivo, com utilização intensiva de insumos, de tecnologia, implantação de grandes projetos em perímetros irrigados e utilização da variedade de coqueiro anão verde (FONTES; WANDERLEY, 2006; CAVALCANTE, 2015).

A Região Nordeste é a principal produtora nacional de coco, cuja posição foi conquistada desde a introdução do coqueiro no País e que ainda vem se mantendo, devido às condições edafoclimáticas favoráveis nas zonas litorâneas. Nessa Região concentram-se 83,2% da área colhida de coco do Brasil e 74,5% de sua produção (IBGE, 2017).

Mesmo sendo a região com maior produção, a produtividade ainda é baixa se comparado ao potencial da cultura. O rendimento médio na região Nordeste é de 6,6 mil toneladas de frutos por hectare, sendo que em alguns estados, como Pernambuco, esse rendimento chega a 25 mil toneladas de frutos por hectare (IBGE, 2017). Um dos fatores que podem explicar a baixa produtividade é que em muitos locais ainda predomina, o sistema de cultivo semiextrativista em áreas litorâneas, sem adoção de práticas de manejo cultural (BRAINER, 2017). Além disso, com o aumento da área plantada e uma maior distribuição da cultura, não apenas no nordeste, mas em todo país, o cultivo do coqueiro tem sofrido com o ataque de doenças, as quais podem comprometer o potencial de rendimento da cultura, principalmente na variedade anão, devido a sua uniformidade genética, ao espaçamento utilizado (menor do que o coqueiro-gigante) e pela exploração intensiva (CARON, 2012).

## **2.2 Doenças foliares do coqueiro**

A cultura do coqueiro sofre interferência severa de alguns patógenos. Entre as principais doenças que afetam a cocoicultura brasileira, destacam-se as doenças fúngicas foliares: queima das folhas, causada por *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl, lixa-pequena causada por *Camarotella torrendiella* (Batista) Bezerra & Vitória e lixa-grande causada por *C. acrocomiae* (Montagne) Hyde & Cannon que, favorecidas pelas condições climáticas, ocorrem de forma generalizada em praticamente todos os coqueirais do país, além de doenças que podem ser consideradas emergentes, como a mancha de pestalotia (WARWICK; LEAL, 2003; SILVEIRA et al., 2004; MARIANO; SILVEIRA, 2005; VITÓRIA et al., 2008).

### **2.2.1 Queima das folhas do coqueiro**

Dentre as doenças foliares citadas, a queima das folhas destaca-se por afetar negativamente a produção. Conhecida também como fogo do coqueiro, ocorre de forma epidêmica nos estados de Alagoas, Bahia, Paraíba, Pará, Rio Grande do Norte e Sergipe, causando sérios prejuízos a cocoicultura, reduzindo a produção de coco em mais de 50% (MARIANO et al., 2016).

A infecção ocorre principalmente nas folhas inferiores e, portanto, mais velhas. As lesões internas na raque progridem do ápice para a base, podendo atingir a bainha e o estipe, resultando na exsudação de resina nas áreas necrosadas da base dos folíolos e, abaxialmente, em rachaduras da raque lesionada e bainha. A invasão sistêmica e descendente na raque causa morte dos tecidos foliares e resulta na seca dos folíolos e de toda a folha, acarretando um

sintoma conhecido como empardecimento em “V”, que é característico da doença (TALAMINI et al., 2013; MARIANO et al., 2016).

A queima das folhas ainda acarreta perda da área fotossintética ocasionando morte prematura das folhas mais velhas, e como consequência deixa os cachos sem sustentação física e fisiológica, provocando atraso no crescimento, redução do número de folhas funcionais e consequentemente, queda dos frutos antes do ponto de colheita (SOUSA FILHO et al., 1979; MARIANO et al., 2016).

A doença é policíclica e as plantas infectadas, ou seus restos culturais no solo, constituem as principais fontes de inóculo. Os primeiros sintomas são observados em plantas com idade acima de um ano e meio (RAM, 1989), no entanto, pode ocorrer em qualquer idade da planta (SOUZA FILHO et al., 1979; CORREIA; COSTA, 2005) e durante todo o ano, sendo as maiores intensidades dessa doença observadas nos meses onde ocorrem temperaturas mais elevadas e baixa umidade relativa do ar e precipitação (RAM, 1989).

A queima das folhas foi relatada pela primeira vez no Brasil por Sousa Filho em 1975, no estado de Sergipe (SOUSA FILHO et al., 1979). Até então, *L. theobromae* era considerada a única espécie responsável por causar os sintomas da doença em coqueiro. Recentemente, Coutinho et al. (2017) analisando a diversidade do gênero fúngico em fruteiras tropicais e Santos (2017) coletando amostras em coqueiros com sintomas da doença, relataram *L. euphorbicola*, *L. brasiliense* e *L. pseudotheobromae*, associadas a queima das folhas.

### **2.2.1.1 Família Botryosphaeriaceae**

Todas as espécies encontradas, associadas a queima das folhas do coqueiro, pertencem ao gênero *Lasiodiplodia* que é um membro da família Botryosphaeriaceae, a qual se destaca por compor diversos gêneros/espécies de importância para fruticultura do Nordeste, causando declínios na produção, em grandes e pequenos pomares (FREIRE et al., 2011; MARQUES et al., 2013; NETTO et al., 2014; CORREIA et al., 2016; COUTINHO et al., 2017).

Taxonomicamente, a família Botryosphaeriaceae pertence ao Reino Fungi; Filo Ascomycota; Classe Dothideomycetes e Ordem Botryosphaeriales (SCHOCH et al., 2006). Espécies de Botryosphaeriaceae são responsáveis por diversas doenças, provocando sintomas como, morte descendente e seca de ramos, exsudação de resinose pelos hospedeiros, lesões necróticas e cancos em ramos, caules e tubérculos, morte progressiva de plantas jovens, adultas e porta-enxetos, além de atuarem como patógenos de sementes e podridões pedunculares e pós-colheita em frutos (CARDOSO et al., 2009; MARQUES et al., 2013; NETTO et al., 2014; ZHAI et al., 2014; LAWRENCE et al., 2017).

Essa família é constituída por complexos de espécies crípticas, ou seja, indivíduos morfológicamente idênticos, mas que apresentam trajetória evolutiva e reprodutiva total ou parcialmente distintas (BICKFORD et al., 2006), o que torna complicada a identificação destes fungos ao nível de espécie, uma vez que os teleomorfos dificilmente são encontrados na natureza e os anamorfos possuem uma grande diversidade morfológica (JACOBS; REHNER, 1998; ZHOU et al., 2001; LUQUE et al., 2005; PHILLIPS et al., 2005; SLIPPERS et al., 2007). Por esta razão, as espécies eram identificadas por caracteres morfológicos do anamorfo, que é a forma mais comum encontrada na natureza (DENMAN et al., 2000; JACOBS; REHNER, 1998). Esses caracteres incluem: tamanho, forma, cor, septação, espessura da parede e textura dos conídios, bem como detalhes da conidiogênese (JACOBS; REHNER, 1998; ZHOU; STANOSZ, 2001; SLIPPERS et al., 2004b). Porém, a identificação de espécies, utilizando caracteres exclusivamente morfológicos, torna-se uma tarefa subjetiva, que podem ter levado a confusões taxonômicas durante anos e a subestimação da biodiversidade em torno dos indivíduos dessa família (COUTINHO et al., 2017).

Diante da diversidade fenotípica que os membros da família Botryosphaeriaceae possuem, estudiosos afirmam que, apesar das características morfológicas e culturais terem sido amplamente utilizadas para identificação das espécies, o uso apenas desses caracteres, torna-se uma tarefa difícil e não confiável. Dessa forma, torna-se necessário usar ferramentas que possam fornecer identificações mais precisas e reprodutíveis, como o uso de métodos de moleculares, principalmente técnicas baseadas em PCR, tem fornecido importantes contribuições nesta área (ALVES et al., 2007; PHILLIPS et al., 2008).

#### **2.2.1.2 Aspectos filogenéticos da família Botryosphaeriaceae**

O método de caracterização mais utilizado para delimitar espécies da família Botryosphaeriaceae é o molecular, por meio do sequenciamento de regiões do DNA (DEANMAN et al., 2000; PHILLIPS et al., 2013; SLIPPERS et al., 2014). No entanto, para a delimitação de uma filogenia fidedigna desses microrganismos bem como a descrição de novas espécies, devem atender as regras do Código Internacional de Nomenclatura para algas, fungos e plantas (ICN). As regras que regem o ICN, são o uso conjunto de caracteres morfológicos, biológicos, ecológicos e patogênicos, que visam o embasamento do desenvolvimento dos microrganismos e das hipóteses evolucionárias pré-ditas por dados moleculares (DEANMAN et al., 2000; WILL; RUBINOFF, 2004; PHILLIPS et al., 2013; SLIPPERS et al., 2014).

Para caracterização de diversidade genética de fitopatógenos, onde características morfológicas são ausentes ou incapazes de diferenciação de isolados, são utilizados marcadores moleculares (SHARMA et al., 1999; SHARMA et al., 2005). Estudos sobre a taxonomia de Botryosphaeriaceae têm empregado métodos moleculares para revelar relações filogenéticas entre as espécies (PHILLIPS et al., 2013; SLIPPERS et al., 2013; WIKKEE et al., 2013) 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; BEGOUDE et al. 2010; SAKALIDIS et al. 2011).

Os marcadores moleculares são capazes de mapear regiões específicas do DNA e possuem alto valor filogenético. Para este fim, genes de algumas regiões são bastante utilizadas e comprovadamente eficazes na delimitação filogenética de Botryosphaeriaceae tais como: regiões codificadoras de proteínas, como o fator de alongamento da tradução 1  $\alpha$  (TEF1- $\alpha$ ) e da  $\beta$ -tubulina ( $\beta$ -tub); a segunda maior subunidade da RNA polimerase II (RPB2); as regiões dos espaços internos transcritos (ITS); a pequena subunidade do rDNA (SSU) e; a grande subunidade do rDNA (LSU) (PHILLIPS et al., 2013).

Jacobs; Rehner (1998) foram os primeiros a usar as sequências de rDNA em análises filogenéticas de *Botryosphaeria* e mostrar que havia alguma congruência entre caracteres morfológicos, culturais e as sequências de rDNA, pelo menos para alguns táxons. Mas, apesar do impacto que os dados de sequências de nucleotídeos da região ITS apresentaram sobre a taxonomia e filogenia de espécies de *Botryosphaeria*, o uso apenas desse gene pode subestimar a verdadeira diversidade especialmente entre espécies estreitamente relacionadas ou crípticas (TAYLOR et al., 2000). Assim, os dados de sequências de nucleotídeos do gene ITS associados a outros genes têm sido aplicados com sucesso para discriminar espécies crípticas e elucidar as relações filogenéticas em Botryosphaeriaceae e anamorfos associados como verificado em inúmeros trabalhos (DE WET et al., 2003; SLIPPERS et al., 2004a; PHILLIPS et al., 2008; INDERBITZIN et al., 2010; URBEZ-TORRES et al., 2012; NETTO et al., 2014).

Em um amplo estudo filogenético, Crous et al., (2006) avaliaram dados de sequência da região 28S do rDNA de 113 isolados, representando a maioria das variações morfológicas atualmente reconhecidos em Botryosphaeriaceae. As análises revelaram 10 linhagens em Botryosphaeriaceae e neste estudo novos gêneros foram descritos.

Posteriormente, Phillips et al., (2013) aceitaram 17 gêneros na família Botryosphaeriaceae. Esses gêneros foram caracterizados com base em 17 linhagens em uma filogenia multilocus. Embora a região ITS sozinha tenha sido suficiente para separar as

espécies dentro de cada gênero de Botryosphaeriaceae, a inclusão do TEF1- $\alpha$  resultou em uma separação mais robusta, e foi considerada essencial para alguns gêneros, como *Diplodia*, *Lasiodiplodia* e *Neofusicoccum*.

Recentemente, Slippers et al., (2017) através de análise multilocus, relataram haver 23 gêneros descritos para esta família: *Allanphillipsia* Crous & M.J. Wingf., *Bahusutrabeeja* Subram. & Bhat, *Barriopsis* Abdollahzadeh, Zare & A.J.L. Phillips, *Botryobambusa* R. Phookamsak, J.K. Liu & K.D. Hyde, *Botryosphaeria* Ces. & De Not., *Cophinforma* Doilom, J.K. Liu & K.D. Hyde, *Diplodia* Fr, *Dothiorella* Sacc., *Eutiarosporella* Crous, *Lasiodiplodia* Ellis & Everh, *Macrophomina* Petr., *Marasasiomyces* Crous, *Mucoharknessia* Crous et al., *Neodeightonia* C. Booth, *Neofusicoccum* Crous et al., *Neoscytalidium* Crous & Slippers, *Oblongocollomyces* Tao Yang & Crous, *Othia* Nitschke ex Fuckel, *Phaeobotryon* Theiss. & Syd., *Sakireeta* Subram. & K. Ramakr, *Sardiniella* Linaldeddu et al., *Sphaeropsis* Sacc. e *Tiarosporella* Hohn.

Estudos apontam que dependendo do complexo de espécies investigado, para a obtenção de uma análise filogenética robusta se faz necessário a combinação de sequências de pelo menos duas regiões gênicas, nas quais ITS, TEF1- $\alpha$  e  $\beta$ -tub são as mais indicadas para Botryosphaeriaceae (PHILLIPS et al., 2013; MARQUES et al., 2013; SLIPPERS et al., 2014; MACHADO et al., 2014; ROSADO et al., 2016).

O atual aumento no número de espécies é reconhecido em grande parte devido à utilização de dados moleculares, mas este aumento ocorre também devido à amostragem, em regiões até então pouco exploradas, incluindo Venezuela (BURGESS et al. 2006), Austrália (PAVLIC et al. 2008), Irã (ABDOLLAHZADEH et al. 2010), Egito (ISMAIL et al. 2012), Tailândia (TRAKUNYINGCHAROEN et al. 2015) e Brasil (MARQUES et al., 2013; MACHADO et al., 2014; CORREIA et al., 2016; COUTINHO et al. 2017). Dos gêneros descritos para Botryosphaeriaceae, *Lasiodiplodia* é o que apresenta o maior número de espécies descritas (SLIPPERS et al., 2017).

### 2.2.1.3 Gênero *Lasiodiplodia*

O gênero *Lasiodiplodia*, introduzido por Ellis; Everh em 1896, possui como espécie tipo *L. theobromae* (Pat.) Griffin; Maublanc, 1909. Até o ano de 2004, *L. theobromae* era a única espécie do gênero, porém, por meio de análises filogenética multilocus de DNA, cerca de 39 espécies foram identificadas, porém apenas 28 estão disponíveis para análises filogenéticas e todas estas são espécies recém descritas e possuem sequências de DNA depositadas em banco de dados, como por exemplo, o GenBank (PHILLIPS et al., 2013;

SLIPERS et al., 2017).

No Brasil, já foram relatadas cerca de 15 espécies de *Lasiodiplodia*, em associação com diversas doenças: morte descendente e podridão peduncular em mangueira (MARQUES et al., 2013), morte descendente dos ramos da videira, cajueiro e outras frutíferas tropicais (CORREIA et al., 2016; COUTINHO et al., 2017), podridão do colo e radicular em pinhão manso e mandioca (MACHADO et al., 2014), gomose em cajueiro (NETTO et al., 2016), podridão peduncular em mamoeiro (NETTO et al., 2014) e podridão do fruto (ROSADO et al., 2016) e queima das folhas (COUTINHO et al., 2017; SANTOS, 2017) em coqueiro.

Dessas 15 espécies, oito foram descritas pela primeira vez no Brasil: *L. brasiliense* (NETTO et al., 2014), *L. marypalme* (= *L. euphorbicula*), *L. jatrophicola*, *L. subglobosa* e *L. macrospora* (MACHADO et al., 2014), *L. gravistriata* (NETTO et al., 2016), *L. caatinguensis* e *L. pontae* (COUTINHO et al., 2017), indicando grande diversidade desse gênero associados as diferentes culturas, inclusive no coqueiro.

*Lasiodiplodia theobromae* é a espécie mais importante do gênero. É um fungo cosmopolita, polífago e oportunista, com pouca especialização patogênica, além de ser geralmente associado a processos patogênicos em plantas estressadas e submetidas a ferimentos (TAVARES, 2002; PEREIRA et al., 2006). Essa espécie já foi relatada em cerca de 500 hospedeiros (DAMM; CROUS; FOURIE, 2007; URBEZ-TORRES et al., 2008; DUGAN et al., 2015; VIEIRA et al., 2018).

Em cultura pura, em meio de BDA, as colônias de *L. theobromae* são acinzentadas a negras, com abundante micélio aéreo e no reverso da cultura em placa de Petri são foscas ou negras. Formam picnídios frequentemente agregados, escuros, estomáticos, ostiolados, com formato ligeiramente ovoide. Os conidióforos são curtos e simples, contendo na extremidade um único conídio. Os conídios apresentam morfologias diferentes dependendo do nível de maturidade destes. Os imaturos são sub-hialinos, unicelulares, ovoides e apresentam parede dupla, enquanto os maduros tornam-se marrom-escuro, bicelulares, medindo entre 23-29 µm de comprimento por 13-15 µm de largura com parede apresentando estrias longitudinais e com um septo transversal (SANTOS, 2017).

#### **2.2.1.4 Gênero *Neodeightonia***

O gênero *Neodeightonia* C. Booth foi estabelecido por Punithalingam (1969), com a espécie tipo *N. subglobosa*, entretanto, Von Arx; Müller (1975), considerando que os ascósporos nessa espécie poderiam ser marrons, transferiram a espécie tipo *N. subglobosa* para o gênero *Botryosphaeria*. No entanto, Phillips et al. (2008) restabeleceu novamente o

gênero *Neodeightonia*, visto que este se distingue morfológicamente (baseado nos ascósporos escuros e septados) e filogeneticamente do gênero *Botryosphaeria*.

Punithalingam (1969) fez referências a fendas germinativas nos conídios. Crous et al. (2006) sugeriram que estas eram de fato estriações na parede do conídio, e que mais do que uma estria poderia ocorrer por conídio, característica esta que foi confirmada por Phillips et al. (2008). Morfológicamente *Neodeightonia* é um gênero que se assemelha a *Diplodia* e *Lasiodiplodia*. Pode ser distinguido de *Lasiodiplodia* pela ausência de paráfises hifais que se formam entre as células conidiogênicas e de *Diplodia* pela presença de estrias conidiais (PHILLIPS et al., 2008; 2013). Filogeneticamente, o sequenciamento multilocus de ITS, TEF1- $\alpha$ , LSU, SSU e  $\beta$ -tub têm sido utilizados para identificação de espécies desse gênero (LIU et al., 2012; PHILLIPS et al., 2013), sendo os quatro primeiros os mais informativos ou mais utilizados (KONTA et al., 2016).

Atualmente são reconhecidas sete espécies dentro do gênero *Neodeightonia*: *N. subglobosa* (PHILLIPS et al., 2008), *N. microspora* (DAI et al., 2016), *N. palmicola* (LIU et al., 2010), *N. phenicum* (PHILLIPS et al., 2008), *N. licuriensis* (ADAMČÍK et al., 2015), *N. rattanica* e *N. rattanicola* (KONTA et al., 2016). Além dessas, há uma espécie disponível como *Neodeightonia* sp. com depósito de sequências de ITS, TEF1- $\alpha$  no banco de dados do GenBank, porém ainda não identificada (ELLIOT et al., 2018).

A espécie-tipo de *Neodeightonia* foi encontrada em *Bambusa* (PUNITHALINGAM, 1969), gênero de plantas conhecidas como bambus, enquanto as outras espécies encontradas, foram isoladas de plantas da família das Arecaceae, como *Arenga westerhoutii*, *Phoenix* sp., *Caryota urens*, *Syagrus coronata* e *Calamus* sp. (PHILLIPS et al., 2008; DAI et al., 2016; LIU et al., 2010; ADAMČÍK et al., 2015; KONTA et al., 2016; ELLIOT et al., 2018).

### 2.2.2 Mancha de Pestalotia

A mancha de pestalotia, relatada por Anjos; Charchar; Ramos (2000), foi observada em folhas de coqueiro no Distrito Federal. Nesse trabalho os autores identificaram *Pestalotiopsis guepinii* como agente etiológico da doença. Os sintomas são manchas irregulares de tamanhos variados nas folhas, com coloração castanho escuro no centro das lesões que são circundadas por um halo amarelo. Em seguida, Cardoso et al. (2003) observaram com frequência os sintomas em folhas de coqueiro no estado da Paraíba, a partir dos quais foi isolada uma espécie de *Pestalotiopsis* associada a doença.

Os sintomas também já foram relatados em outros países produtores da cultura, como Indonésia, China e Tailândia, onde a doença é conhecida como ferrugem do coqueiro, a qual

também é atribuída a fungos Pestalotioid. Nesses países, várias espécies já foram identificadas causando sintomas da doença, sendo *P. meneziana*, *Neopestalotiopsis* sp., *N. piceana*, *N. javaensis* e *N. cocoes* (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014; NIU et al., 2015; HYDE et al., 2016).

### 2.2.2.1 Complexo Pestalotioid

O complexo de Pestalotioid é composto por fungos que possuem conídios semelhantes a *Pestalotiopsis*, com cinco células, sendo as das extremidades hialinas e as medianas pigmentadas (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014). Engloba indivíduos saprofitos, endofíticos e patogênicos (SURYANARAYANAN et al., 2011; XU et al., 2014), e são regularmente encontrados em ecossistemas tropicais e subtropicais (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2011; KRUSCHEWSKY et al., 2014).

Os fungos desse complexo eram considerados de importância secundária e iniciavam o processo infeccioso a partir de aberturas naturais e/ou de ferimentos ocasionados por insetos, pesticidas ou danos provocados pelo sol (HOPKINS; MCQUILKEN, 2000; AGRIOS, 2005). Entretanto, esses fungos têm ocasionado significativas perdas econômicas em ampla gama de hospedeiros (ÚRBEZ-TORRES et al., 2012; ARZANLOU et al., 2013; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014; JAYAWARDENA et al., 2015; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2016).

A patogenicidade desses fungos tem sido comprovada em diversas culturas. (JAYAWARDENE et al., 2015; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2016). Em *C. nucifera*, espécies de Pestalotioid já foram relatadas, como endofíticas e também patogênicas (CARDOSO et al., 2003; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014; ROSADO et al., 2015). Cardoso et al. (2003) avaliando a etiologia e o progresso da mancha de pestalotia do coqueiro, no estado da Paraíba, constataram que um fungo do gênero *Pestalotiopsis* era patogênico em folhas daquela cultura. Isso indica que muitas espécies fúngicas podem se comportar de formas distintas em função das condições do hospedeiro (HYDE et al., 2014).

O gênero *Pestalotiopsis* foi proposto por Steyaert (1949), que também propôs alterações taxonômicas com base nas formas dos conídios. O mesmo autor sugeriu três gêneros de fungos, sendo *Pestalotia*, *Pestalotiopsis* e *Truncatella*. Posteriormente, o mesmo autor subdividiu o gênero *Pestalotiopsis* e agrupou as espécies com base no número de apêndices apicais e coloração das células medianas em versicolor e concolor. Mas, as alterações propostas por ele não foram aceitas por Moreau (1949), Guba (1956, 1961) e Dube; Bilgrami (1965).

Posteriormente, uma nova classificação foi proposta por Guba (1961), na qual se considerava o número de células, a cor das células medianas e a morfologia dos apêndices apical e basal. Desta forma, mediante esses critérios, foram descritas diferentes categorias e seções do gênero *Pestalotia*. Mais adiante, Sutton (1980) apoiou a nova divisão, porém dificuldades, complexidade e conflitos técnicos na taxonomia de *Pestalotiopsis* foram reconhecidos.

Nag Raj (1985, 1993) concordou com a ideia da redistribuição das espécies de *Pestalotia* para outros gêneros, porém, entendia que o gênero *Pestalotiopsis* também teria que englobar as espécies de conídio com três células. Jeewon et al. (2003) verificaram que apenas caracteres como pigmentação das células medianas e apêndices apicais seriam confiáveis para separar as espécies do gênero *Pestalotiopsis*, mas foi sugerido que análises moleculares deveriam ser associadas para obter a correta identificação das espécies.

Revisões do gênero *Pestalotiopsis* têm sido realizadas mediante análises moleculares e morfológicas, as quais têm propiciado novas alterações taxonômicas (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014; MAHARACH-CHIKUMBURA et al., 2016). Maharachchikumbura et al. (2014) combinando dados morfológicos e moleculares contribuíram para uma grande revisão dos táxons tipo de *Pestalotiopsis* e estabeleceram dois novos gêneros, *Neopestalotiopsis* e *Pseudopestalotiopsis*, pertencentes à ordem *Xylariales*.

Com base em evidências morfológicas e filogenéticas, Crous; Hawksworth; Wingfield (2015) inseriram os gêneros *Pestalotiopsis*, *Neopestalotiopsis* e *Pseudopestalotiopsis* em uma nova família, a *Pestalotiopsidaceae* Maharachch. & K. D. Hyde, perfazendo a acomodação na subclasse *Xylariomycetidae* O. E. Erikss e Winka e ordem *Amphisphaeriales* D. Hawksw. & O. E. Erikss. A nova família *Pestalotiopsidaceae* acomoda os gêneros *Ciliochorella* Syd., *Neopestalotiopsis* Maharachch., *Pestalotiopsis* Steyaert., *Pseudopestalotiopsis* Maharachch. e *Seiridium* Nees.

#### **2.2.2.2 Aspectos filogenéticos do complexo Pestalotioid**

Por haver similaridade morfológica entre espécies dos gêneros fúngicos, a identificação passou a ser mais bem-sucedida por meio do sequenciamento de DNA (CROUS; HAWKSWORTH; WINGFIELD, 2015). Foi devido a utilização de sequenciamento de regiões gênicas que modificações taxonômicas foram realizadas, e dessa forma, espécies de *Pestalotiopsis* passaram a ser compreendidas por complexo Pestalotioid (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014).

A revisão molecular dos gêneros e de espécies do complexo Pestalotioid, tem

propiciado mudanças muito significativas na identificação dos taxons e que ainda estão em andamento. Maharachchikumbura et al. (2012) realizaram o sequenciamento de dez regiões gênicas diferentes, sendo, o espaçador interno transcrito (ITS),  $\beta$ -tubulina ( $\beta$ -tub), fator de alongamento 1- $\alpha$ , (TEF1- $\alpha$ ), a grande subunidade do gene do RNA ribossômico nuclear (LSU), a pequena subunidade do gene do RNA ribossômico nuclear (SSU), actina (ACT), glutamina sintase (GS), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPDH), RNA polimerase II (RPB1) e calmodulina (CAL), para reavaliar as espécies do complexo Pestalotioid. Eles concluíram, com ajuda de dados morfológicos, que o sequenciamento da região ITS e dos genes codificadores da  $\beta$ -tub e o TEF1- $\alpha$  poderiam fornecer resultados mais acurados para tal fim. Sequências concatenadas dessas regiões resultaram em clados fortemente suportados (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014).

A região ITS, pode resolver a identificação em gênero e espécie dos fungos do complexo Pestalotioid e desde o desenho dos oligonucleotídeos por White et al. (1990), tornou-se a mais empregada em estudos filogenéticos. Porém, essa região associada com os genes TEF1- $\alpha$  e  $\beta$ -tub, fortalecem os ramos e colaboram para uma melhor separação de espécies (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014; HYDE et al., 2014).

### 2.2.2.3 Gênero *Neopestalotiopsis*

O gênero *Neopestalotiopsis* é facilmente distinguido de *Pseudopestalotiopsis* e *Pestalotiopsis* por suas células medianas versicoladas (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014). Espécies com células medianas obscuras-escamosas com apêndices apicais foram definidas como *Pseudopestalotiopsis* (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014). Desde a monografia de MAHARACHCHIKUMBURA et al. (2014), várias novas espécies de Pestalotioid também foram introduzidas (ARIYAWANSA et al., 2015; HYDE et al., 2016; JAYAWARDERA et al., 2016; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2016a, b).

O gênero *Neopestalotiopsis* foi separado de *Pestalotiopsis* com base em análise filogenética e diferenças morfológicas e já são mais de 25 espécies descritas para o gênero. A espécie tipo do gênero é *N. protearum* (Crous & L. Swart) Maharachch., K.D. Hyde & Crous (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014; SOLARTE et al., 2018).

## REFERÊNCIAS

ABDOLLAHZADEH, J. et al. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. **Persoonia**, v.25, p.1-10, 2010.

ADAMČÍK, S. et al. Fungal Biodiversity Profiles 1-10. **Cryptogamie, Mycologie**, v.36, n.2, p.121-166, 2015.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005, 922p.

ALVES, A. et al. *Botryosphaeria corticola*, sp. nov. on *Quercus* species, with notes and description of *Botryosphaeria stevensii* and its anamorph, *Diplodia mutila*. **Mycologia**, v.96, p.598-613, 2004.

ALVES, A. et al. Rapid differentiation of species of Botryosphaeriaceae by PCR fingerprinting. **Research in Microbiology**, v.158, n.2, p.112–121, 2007.

ANJOS, J. R. N.; CHACHAR, M. J. A.; RAMOS, V. H. V. Mancha foliar causada por *Pestalotiopsis guepinii*. em coqueiro no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.121-215, 2000.

ARIYAWANSA, H. A. et al. Fungal diversity notes 111–252—taxonomic and phylogenetic contributions to fungal taxa. **Fungal Diversity**, v.75, p.27-274, 2015.

ARZANLOU, M. et al. *Truncatella angustata* associated with grapevine trunk disease in Northern Iran. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v.46, n. 10, p.1168-1181, 2013.

BEGOUDE, B. A. D. et al. Botryosphaeriaceae associated with *Terminalia catappa* in Cameroon, South Africa and Madagascar. **Mycologia Progress**, v.9, p.101-123, 2010.

BICKFORD, D. et al. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, v.22, n.3, p.148-155, 2006.

BRAINER, S. **A adaptação do Nordeste ao cenário de modernização da cocoicultura brasileira**. Cadernosetorial: ETENE. v.2, n.18. 25p. 2017.

BURGESS, T. I. et al. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. **Mycologia**, v.98, p.423-435, 2006.

CARDOSO, G. D. et al. Etiologia e progresso da mancha de pestalotia do coqueiro (*Cocos nucifera* L.), em São Gonçalo, Paraíba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, n.2, p.335-336, 2003.

CARDOSO, J. E. et al. Ocorrência endofítica de *Lasiodiplodia theobromae* em tecidos de cajueiro e sua transmissão por propágulos. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.4, p.262-266, 2009.

CARON, E. S. Eficiência de fungicidas via aplicação axilar no controle da queima-das-folhas em coqueiro-anão verde. 2012. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. 2012. 84 p.

CASTRO, P. C. Comportamento de cultivares de coqueiro anão (*Cocos nucifera* L.) nos tabuleiros costeiros do norte de Sergipe. 2007. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Sergipe: São Cristovão. 2007.

CAVALCANTE, L. V. A nova geografia da produção de coco no Brasil. In: XI ENCONTRO NACIONAL DA ANPEGE. **Anais...** Mato Grosso do Sul: Editora UFGD, 2015. p.2709-2720.

CINTRA, F. L. D. Solos da Baixada Litorânea e dos Tabuleiros Costeiros cultivados com coqueiro gigante: principais características. In: CINTRA, F. L. D.; FONTES, H. R.; PASSOS, E. E. M.; FERREIRA, J. M. S. **Fundamentos tecnológicos para a revitalização das áreas cultivadas com coqueiro gigante no nordeste do Brasil**. Aracaju-SE: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2009, p.61-74.

CORREIA, M. S.; COSTA, J. L. S. Dispersão anemófila do fungo *Lasiodiplodia theobromae* em plantações de coqueiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.150-154, 2005.

CORREIA, K. C. et al. Phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of table grape in the main Brazilian exporting region. **Plant Pathology**, v.65, p.92-103, 2016.

COUTINHO, I. B. L. et al. Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. **Plant Pathology**, v.66, p.90-104, 2017.

CROUS, P. W. et al. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. **Studies in Mycology**, v.55, n.1, p.235-253, 2006.

CROUS, P. W.; HAWKSWORTH, D. L.; WINGFIELD, M. J. Identifying and Naming Plant-Pathogenic Fungi: Past, Present and Future. **Annual Review of Phytopathology**. v.53, p.247-267, 2015.

DAI, D. Q. et al. Bambusicolous fungi. **Fungal Diversity**, p.1-105, 2016.

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

DENMAN, S. et al. An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. **Studies in Mycology**, v.45, p.129-140. 2000.

DENMAN, S. et al. Circumscription of *Botryosphaeria* species associated with *Proteaceae* based on morphology and DNA sequence data. **Mycologia**, v.95, p.294-307, 2003.

DE WET, J. et al. Multiple gene genealogies and microsatellite markers reflect relationships between morphotypes of *Sphaeropsis sapinea* and distinguish a new species of *Diplodia*. **Mycological Research**, v.107, n.5, p.557-566, 2003.

DUBE, H. C.; BILGRAMI, K. S. *Pestalotia* or *Pestalotiopsis*? **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, v.29, p.33-54, 1965.

DUGANI, F. M. et al. New Records of *Lasiodiplodia theobromae* in Seeds of *Tetrapleura tetraptera* from Nigeria and Fruit of *Cocos nucifera* From Mexico. **Journal Phytopathology**, v.164, p.65-68, 2015.

ELLIOTT, M. L.; MORALES, A. D.; DES JARDIN, E. A. New records of Botryosphaeriaceae genera associated with palms in Florida, USA. **Sydowia**, v.70, p.166-178, 2018.

EMBRAPA (2016). Sistema de produção Embrapa. A importância econômica da cocoicultura no Brasil. Disponível em: <https://www.spo.cnptia.embrapa.br>. Acesso em: 19 de fev. 2019.

FAOSTAT. (2016). Food and Agriculture Organization of the United Nations. **World Production**. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/342/default.aspx>. Acesso em: 10 dez. 2018.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed., Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220p. 1998.

FONTES, H. R. (2013) **Caracterização do quadro atual e principais ameaças à produção de coco seco no nordeste do Brasil**. Disponível em: <http://www.portaldoagronegocio.com.br/artigo/caracterizacao-do-quadro-atual-e-principais-ameacas-a-producao-de-coco-seco-no-nordeste-do-brasil>. Acesso em: 16 nov. 2018.

FONTES, H. R.; WANDERLEY, M. **Situação atual e perspectivas para a cultura do coqueiro no Brasil**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. 16 p.

FREIRE, F. C. O. et al. Status of *Lasiodiplodia theobromae* as a plant pathogen in Brazil. **Essentia**, v.12, p.53-71, 2011.

GUBA, E. F. *Monochaetia* and *Pestalotia* vs. *Truncatella*, *Pestalotiopsis* and *Pestalotia*. **Annals of Microbiology**, v.7, p.74-76, 1956.

GUBA, E. F. **Monograph of *Pestalotia* and *Monochaetia***. Cambridge: Harvard University Press, 1961.

HOPKINS, K. E.; MCQUILKEN, M. P. Characteristics of *Pestalotiopsis* associated with hardy ornamental plants in the UK. **European Journal of Plant Pathology**, v.106, n.1, p.77-85, 2000.

HYDE, K. D. et al. One stop shop: backbone trees for important phytopathogenic genera: I. **Fungal Diversity**, v.67, p.21-125, 2014.

HYDE, K. D. et al. Fungal diversity notes 367–490: taxonomic and phylogenetic contributions to fungal taxa. **Fungal Diversity**, v.80, p.1-270, 2016.

IBGE. (2017). **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Disponível em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/...Sistematico...Producao.../lspa\\_20171](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/...Sistematico...Producao.../lspa_20171). Acesso em: 11 dez. 2018.

INDERBITZIN, P. et al. Six locus phylogeny reveals high species diversity in Botryosphaeriaceae from California almond. **Mycologia**, v.102, n.6, p.1350-1368, 2010.

ISMAIL, A. M. et al. *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica*) in Egypt. **Australasian Plant Pathology**, v.41, n.6, p.649-660, 2012.

ISMAIL, S. I. et al. First Report of *Neopestalotiopsis saprophytica* Causing Leaf Spot of Oil Palm (*Elaeis guineensis*) in Malaysia. **Plant Disease**, v.101, n.10, p.1821, 2017.

JACOBS, K. A.; REHNER, S. A. Comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of *Botryosphaeria* and related taxa. **Mycologia**, v.90, p.601-610, 1998.

JAYAWARDENA, R. S. et al. *Neopestalotiopsis vitis* sp. nov. causing grapevine leaf spot in China. **Phytotaxa**, v.258, n.1, p.063–074, 2016.

JEEWON, R. et al. Phylogenetic significance of morphological characters in the taxonomy of *Pestalotiopsis* species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.27, p.372-383, 2003.

JESUS-JUNIOR, L. A. et al. Análise da produção do coco no Brasil, Nordeste e Sergipe. **Proceeding of ISTI**, v.3, n.1, p.317-324, 2015.

KONTA, S. et al. Botryosphaeriaceae from palms in Thailand II - two new species of *Neodeightonia*, *N. rattanica* and *N. rattanicola* from *Calamus* (rattan palm). **Mycosphere**, v.7, n.7, p.950-961, 2016.

KRUSCHEWSKY, M. C.; LUZ, E. D. M. N.; BEZERRA, J. L. O GÊNERO *Pestalotiopsis* (ASCOMYCOTA, 'COELOMYCETES') NO BRASIL. **Agrotrópica**, v.26, n.2, p.89-98, 2014.

LAWRENCE, D. P. et al. Botryosphaeriaceae species associated with dieback and canker disease of bay laurel in northern California with the description of *Dothiorella californica* sp. nov. **Fungal Biology**, v.121, n.4, p.347-360, 2017.

LIU, J. K. et al. Phylogeny and morphology of *Neodeightonia palmicolasp.* nov. from palms. **Sydowia**, v.62, p.261-276, 2010.

LIU, J. K. et al. Towards a natural classification of Botryosphaeriales. **Fungal Diversity**, v.57, p.149-210, 2012.

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

MACHADO, A. R.; PINHO, D. B.; PEREIRA, O. L. Phylogeny, identification and pathogenicity of the Botryosphaeriaceae associated with collar and root rot of the biofuel plant *Jatropha curcasi* n Brazil, with a description of new species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Diversity**, v.67, p.231-247, 2014.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N. et al. *Pestalotiopsis*—morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. **Fungal Diversity**, v. 50, n. 1, p. 167-187, 2011.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N. et al. *Pestalotiopsis* revisited. **Studies in Mycology**, v.79, p.121-186, 2014.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N. et al. Characterization of *Neopestalotiopsis*, *Pestalotiopsis* and *Truncatella* species associated with grapevine trunk diseases in France. **Phytopathologia Mediterranea**, v.55, n.3, p.380-390, 2016.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N. et al. First report of sweet potato leaf spot caused by *Neopestalotiopsis ellipsospora* in Guizhou province, China. **Journal of Plant Pathology**, v.98, n.3, p.677-697, 2016b.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. Doenças do coqueiro (*Cocos nucifera* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Eds.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p.271-281, 2005.

MARIANO, R. L. R. et al. Doenças do coqueiro. In: AMORIM, L.; RESENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 5.ed. v.2. Ouro Fino-MG: Agronômica Ceres, 2016, 810p.

MARQUES, M. W. et al. Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, v.61, p.181-193, 2013.

MOREAU, C. Micomycetes africains. I. **Revue de Mycologie, Suppliment Colonial**, v.14, p.15-22, 1949

NAG RAJ, T. R. **Coelomycetous anamorphs with appendage bearing conidia**. Waterloo: Mycologue publications, 1993.

NAG RAJ, T. R. Redisposals and redescriptions in the *Monchaetia Seiridium*,

*Pestalotia-Pestalotiopsis* complexes. I. The correct name for the type species of *Pestalotiopsis*. **Mycotaxon**, v.22, p.43-51, 1985.

NETTO, M. S. B. et al. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. **Fungal Diversity**, v.67, p.127-41, 2014.

NETTO, M. S. B. et al. Analysis of phylogeny, distribution, and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with gummosis of *Anacardium* in Brazil, with a new species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Biology**, v.121, p.437-451, 2017.

NIU, X.-Q. et al. First Report of *Pestalotiopsis menezesiana* Causing Leaf Blight of Coconut in Hainan, China. **Plant Disease**, v.99, n.4, p.554, 2015.

OHLER, J. G. **Coconut Tree of Life**. Roma: FAO, 1984. 446p.

PAVLIC, D. et al. Seven new species of the Botryosphaeriaceae from baobab and other native trees in Western Australia. **Mycologia**, v.100, p.851-866, 2008.

PHILLIPS, A. J. L. et al. A reassessment of the anamorphic fungus *Fusicoccum luteum* and description of its teleomorph *Botryosphaeria lutea* sp. nov. **Sydowia**, v.54, p. 59-77, 2002.

PHILLIPS, A. J. L. et al. Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. **Mycologia**, v.97, n.2, p.513-529, 2005.

PHILLIPS, A. J. L. et al. Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the Botryosphaeriaceae. **Persoonia**, v.21, n.1, p.29-55, 2008.

PHILLIPS, A. J. L. et al. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. **Studies in Mycology**, v. 76, p. 51-167, 2013.

PUNITHALINGAM, E. Plant diseases attributed to *Botryodiplodia theobromae* Pat. **Bibl Mycol.** v.71, p.1-123, 1980.

ROSADO, A. W. C.; MACHADO, A. R.; PEREIRA, O. L. Postharvest Stem-End Rot on Immature Coconut Caused by *Pestalotiopsis adusta* in Brazil. **Plant Disease**, v.99, n.7, p.1036, 2015.

ROSADO, A. W. C. et al. Phylogeny, identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia* associated with postharvest stem-end rot of coconut in Brazil. **Plant Disease**, v.100, p.561-568, 2016.

SAKALIDIS, M. L.; HARDY, G. E. S.; BURGESS, T. I. Endophytes as potential pathogens of the baobab species *Adansonia gregorii*: a focus on the Botryosphaeriaceae. **Fungal Ecology**, v.4, p.1-14, 2011.

SANTOS, P. H. D. Patogenicidade e caracterização morfomolecular de fungos Botriosphaeriaceos associados ao coqueiro e filogeografia de *Lasiodiplodia theobromae*. 2017. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro: Campos dos Goytacazes-RJ, 2017. 86p.

SCHOCH, C. L. et al. A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. **Mycologia**, v.98, p.1041-1052, 2006.

SHARMA, M.; GUPTA, S. K.; SHARMA, T. R. Characterization of variability in *Rhizoctonia solani* by using morphological and molecular markers. **Journal Phytopathology**, v.153, p.449-456, 2005.

SHARMA, T. R.; SINGH, B. M. PRACHI. Applications of polymerase chain reaction in phytopathogenic microbes. **Indian Journal Microbiology**, v.39, p.79-91, 1999.

SILVEIRA, S. F. et al. **Situação fitossanitária de coqueirais (*Cocos nucifera* L.) da Região Norte Fluminense**. In: 2ª. Mostra de Extensão da UENF, Campos-RJ. Campos: UENF, 2004, v.2. p.1-1.

SIQUEIRA, L. A.; ARAGÃO, W. M.; TUPINAMBÁ, E. A. **A introdução do coqueiro no Brasil: importância histórica e agrônômica**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2002. 24 p.

SLIPPERS, B. et al. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. **Mycologia**, v.96, n.1, p.83-101, 2004a.

SLIPPERS, B. et al. Multiple gene sequences delimit *Botryosphaeria australis* sp. nov. from *B. lutea*. **Mycologia**, v.96, n.5, p.1030-1041, 2004b.

SLIPPERS, B. et al. Taxonomy, phylogeny and identification of Botryosphaeriaceae associated with pome and stone fruit trees in South Africa and other regions of the world. **Plant Pathology**, v.56, n.1, p.128-139, 2007.

SLIPPERS, B. et al. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriales: a systematic and evolutionary framework. **Studies in Mycology**, v.76, p.31-149, 2013.

SLIPPERS, B. et al. Confronting the constraints of morphological taxonomy in the *Botryosphaeriales*. **Persoonia**, v.33, p.155–168, 2014.

SLIPPERS, B. et al. Diversity in the Botryosphaeriales: Looking back, looking forward. **Fungal Biology**, v.121, p.307-321, 2017.

SMITH, R. S. et al. *Botryosphaeria eucalyptorum* sp. nov., a new species in the *B. dothidea*-complex on *Eucalyptus* in South Africa. **Mycologia**, v. 93, p.277-284, 2001.

SOUZA FILHO, B. F. DE.; SANTOS FILHO, H. P.; ROBBES, C. F. Etiologia da ‘queima’ das folhas do coqueiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.4, p.5-10, 1979.

SOLARTE, F. et al. Diversity of *Neopestalotiopsis* and *Pestalotiopsis* spp., Causal Agents of Guava Scab in Colombia. **Plant Disease**. v.102, p.49-59, 2018.

STEYAERT, R. L. Contribution à l'étude monographique de *Pestalotia* de Not. et *Monochaetia* Sacc. (*Truncatella* gen. nov. et *Pestalotiopsis* gen. nov.). **Bulletin du Jardin botanique de l'Etat/Bulletin van den Rijksplantentuin**, p. 285-347, 1949.

SURYANARAYANAN, T. S. et al. Endophytic fungal communities in woody perennials of three tropical forest types of the Western Ghats, southern India. **Biodiversity and Conservation**, v.20, p.913-928, 2011.

SUTTON, B. C. **The Coelomycetes e fungi imperfecti with acervuli and stromata**. Slough: CABI Publishing, 1980.

TALAMINI, V.; FERREIRA, J. M. S.; RAMOS, S. R. R. Avaliação da intensidade da queimadas-folhas em cultivares de coqueiro. **Magistra**, v. 24, 2013.

TAYLOR, J. W. et al. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v.31, p.21-32, 2000

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

TRAKUNYINGCHAROEN, T. et al. Caulicolous *Botryosphaerales* from Thailand. **Persoonia**, v.34, p.87-99, 2015.

ÚRBEZ-TORRES, J. R. et al. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of rot canker disease of grapevines in Mexico. **Plant Disease**, v.92, n.4, p.519-529, 2008.

URBEZ-TORRES, J. R. et al. Characterization of fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Arkansas and Missouri. **Fungal Diversity**, v.52, n.1, p.169-189, 2012.

VIEIRA, J. C. B. et al. First Report of *Lasiodiplodia theobromae* Causing Rot in Eggplant Fruit in Brazil. **Plant Disease**, v.102, n.10, p.2039, 2018.

VITÓRIA, N. S. et al. *Camarotella torrendiella* comb. nov. e *C. acrocomiae*: agentes etiológicos das lixas do coqueiro. **Tropical Plant Pathology**. v.33, n.4, p. 295-301, 2008.

VON ARX, J.A.; MÜLLER, E.— A re-evaluation of the bitunicate ascomycetes with keys to families and genera. **Studies in Mycology**, v.9, p.1-159, 1975.

WARWICK, D. R. N.; LEAL, E. C. **Principais doenças foliares**. In: FERREIRA, J. M. S. Coco: Fitossanidade. Brasília-DF: Embrapa/CPATC - Informações tecnológicas, 2003. p.41-50.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academy Press, 1990.

WIKKEE, S. et al. phylogenetic re-evaluation of *Phyllosticta* (*Botryosphaerales*). **Studies in Mycology**, v.76, p.1-29, 2013.

WILL, K. W.; RUBINOFF, D. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. **Cladistics**, v.20, n.1, p.47-55, 2004.

ZHAI, L. et al. Biological and molecular characterization of four *Botryosphaeria* species isolated from pear plants showing stem wart and stem canker in China. **Plant Disease**, v.98, p. 716-726, 2014.

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**, v.105, n.8, p.919-926, 2001.

XU, J.; YANG, X.; LIN, Q. Chemistry and biology of *Pestalotiopsis*-derived natural products. **Fungal Diversity**, v.66, n.1, p.37-68, 2014.

**3 CAPÍTULO I:  
IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE BOTRYOSPHAERIACEAE ASSOCIADAS A  
QUEIMA DAS FOLHAS DO COQUEIRO NOS ESTADOS DE ALAGOAS E  
SERGIPE**

## IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE BOTRYOSPHAERIACEAE ASSOCIADAS A QUEIMA DAS FOLHAS DO COQUEIRO NOS ESTADOS DE ALAGOAS E SERGIPE

**RESUMO:** O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma cultura de grande importância econômica no Brasil. Atualmente, o país é o maior produtor do continente americano e o quarto maior produtor mundial. A queima das folhas é a principal doença foliar da cultura e sua presença pode causar perdas significativas, limitando seu potencial produtivo. A doença está associada a espécies de *Lasiodiplodia* spp., porém, se faz necessário revisar se o gênero *Lasiodiplodia* é o único membro da família Botryosphaeriaceae a causar queima das folhas do coqueiro. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar espécies de Botryosphaeriaceae associadas à queima das folhas do coqueiro nos estados de Alagoas e Sergipe. Para isso, foram realizadas análises morfológicas e moleculares, com o uso de filogenia baseada em sequências nucleotídicas parciais dos genes do fator de alongamento da tradução 1  $\alpha$  (TEF1- $\alpha$ ), a grande subunidade do RNA ribossômico nuclear (LSU) e a região do espaço interno transcrito (ITS), para o correto posicionamento taxonômico dos isolados de Botryosphaeriaceae. Duas espécies pertencentes a dois gêneros foram identificadas causando sintomas de queima das folhas em coqueiro, *L. theobromae* e *Neodeightonia alagoensis* sp. nov. Este é o primeiro relato do gênero *Neodeightonia* causando doença em *C. nucifera*.

**Palavras-chave:** Arecaceae, *Neodeightonia*, *Lasiodiplodia theobromae*, filogenia multilocus.

## IDENTIFICATION OF SPECIES OF BOTRYOSPHAERIACEAE ASSOCIATED WITH BURNING OF COQUEIRO LEAVES IN THE STATE OF ALAGOAS AND SERGIPE

**ABSTRACT:** Coconut palm (*Cocos nucifera* L.) is a culture of great economic importance in Brazil. Currently, the country is the largest producer in the Americas and the fourth largest producer in the world. The burning of leaves is the main foliar disease of the crop and its presence can cause significant losses, limiting its productive potential. The disease is associated with species of *Lasiodiplodia* spp., however, it is necessary to review if the genus *Lasiodiplodia* is the only member of the family Botryosphaeriaceae to cause burning of the leaves of the coconut. In this context, the objective of this study was to identify and characterize Botryosphaeriaceae species associated with the burning of coconut leaves in the states of Alagoas and Sergipe. For this, morphological and molecular analyzes were performed using phylogeny based on partial nucleotide sequences of the translation elongation factor 1- $\alpha$  (TEF1- $\alpha$ ), the nuclear ribosomal RNA large subunit (LSU) and internal transcribed spacer region (ITS) for the correct taxonomic positioning of the isolates of Botryosphaeriaceae. Two species belonging to two genera were identified causing symptoms of leaf burning in coconut, *L. theobromae* and *Neodeightonia alagoensis* sp. nov. This is the first report of the genus *Neodeightonia* causing disease in *C. nucifera*.

**Key words:** Arecaceae, *Neodeightonia*, *Lasiodiplodia theobromae*, multilocus phylogen.

### 3.1 Introdução

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é membro da família Arecaceae e uma das espécies perenes de maior relevância do mundo. O seu provável centro de origem remonta ao Sudeste da Ásia visto que, nesta região, a espécie apresenta ampla diversidade morfológica (PURSEGLOVE, 1972; PERSLEY, 1992).

A Ásia é o continente com maior produção, cerca de 49.016.693 toneladas de frutos do coqueiro, e onde são encontrados os três maiores produtores mundiais, Indonésia, Filipinas e Índia. O Brasil é o maior produtor das Américas e o quarto maior produtor de coco do mundo. Em 2016, o país produziu mais de 2.649.246 toneladas de frutos, em uma área de aproximadamente 234 mil ha (FAOSTAT, 2016). A região nordeste é a principal produtora nacional. Nessa região concentram-se 83,2% da área colhida de coco e 76,7% de sua produção, onde os estados da Bahia (31%), Ceará (15%) e Sergipe (13%) são os maiores produtores do país (IBGE, 2017).

A produção de coco está diretamente relacionada ao número de folhas sadias por planta, no entanto, doenças como a queima das folhas, considerada a principal doença da cultura no Brasil, podem causar diminuição da área foliar do coqueiro e conseqüentemente redução da produtividade (MONTEIRO et al. 2013; BRAINER, 2017). O sintoma inicial da doença é conhecido como empardecimento em “V”, conforme evolui provoca abscisão das folhas inferiores, deixando os cachos sem sustentação, assim, os frutos caem prematuramente antes de atingirem o ponto de colheita (FONTES; WANDERLEY 2006).

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. é a principal espécie associada a esta doença e até pouco tempo era a única (TALAMINI; FERREIRA; RAMOS, 2013; SANTOS, 2017). Hoje, além de *L. theobromae* (RAM, 1989), outras três espécies já foram relatadas como agentes causais da queima das folhas do coqueiro: *L. euphorbicola* (COUTINHO et al., 2017), *L. pseudotheobromae* e *L. brasiliense* (SANTOS, 2017).

Todas as espécies relatadas pertencem à família Botryosphaeriaceae. Essa família contém inúmeras espécies “crípticas” com distribuição cosmopolita que ocorrem em uma grande variedade de hospedeiros de plantas cultivadas (MARQUES et al., 2013; MACHADO et al., 2014; ROSADO et al., 2016; COUTINHO et al., 2017). Os membros dessa família apresentam diversidade fenotípica e apesar das características morfológicas e culturais terem sido amplamente utilizadas, não são confiáveis para estabelecer a correta identificação, necessitando de ferramentas que possam fornecer dados mais precisos e confiáveis (ALVES et al., 2007; PHILLIPS et al., 2008; SLLIPERS et al., 2017).

Assim, estudos sobre a taxonomia de Botryosphaeriaceae empregando métodos moleculares, tornaram-se de extrema importância para revelar relações filogenéticas entre as espécies (PHILLIPS et al., 2013; SLIPPERS et al., 2013; DISSANAYAKE et al., 2016) e para ajudar a resolver complexo de espécies (SMITH et al. 2001; PHILLIPS et al. 2002; DENMAN, et al. 2003; ALVES et al. 2004; BEGOUDE et al. 2010; SAKALIDIS et al. 2011).

Diante dessas informações, o objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar, por meio de análises filogenéticas e morfológicas, espécies de Botryosphaeriaceae associadas à queima das folhas do coqueiro a fim de buscar um melhor entendimento sobre a etiologia da doença.

### **3.2 Material e Métodos**

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia Molecular do Centro de Ciências Agrárias (CECA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), localizado no município de Rio Largo, zona da mata alagoana.

#### **3.2.1 Obtenção e preservação dos isolados**

Isolados de Botryosphaeriaceae foram obtidos a partir de raques e folhas do coqueiro que apresentavam sintomas de queima das folhas, provenientes de três áreas de plantios comerciais, localizadas nos Estados de Alagoas e Sergipe.

No Laboratório, as folhas e raques foram lavadas e secas naturalmente. Em seguida realizou-se o isolamento indireto, onde fragmentos foram retirados de tecido sintomático da interface entre o tecido necrótico e o aparentemente não infectado, os quais foram desinfestados com soluções de álcool 70% por 30 segundos e depois hipoclorito de sódio a 1% por 1 minuto. Após ser lavado por duas vezes com água destilada e esterilizada durante 30s, o material foi então seco em papel de filtro esterilizado e em seguida, fragmentos de 5 mm foram transferidos para placas de Petri contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA). Após a formação das colônias foram retirados fragmentos das bordas das placas e transferidos para novas placas de Petri contendo meio BDA.

Após a obtenção das culturas puras, pela excisão de pontas da hifa nas bordas da colônia em BDA, as quais foram incubadas a 25°C no escuro, os isolados foram preservados utilizando três métodos: tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA, Castellani e em papel filtro autoclavado.

### 3.2.2 Teste de patogenicidade

A patogenicidade dos isolados foi testada em fragmentos de raques e folíolos foliares sadios de coqueiro da variedade anão-verde. Os fragmentos foram desinfestados com solução de hipoclorito de sódio a 1% por 3 minutos e, posteriormente lavadas duas vezes em ADE por 1 minuto de cada vez. Raques e folíolos foram secos ao ar em toalhas de papel esterilizadas. Após a secagem, ferimentos foram realizados em três posições equidistantes da face adaxial de cada fragmento foliar, para isso, utilizou-se uma agulha previamente flambada.

Os fragmentos de raques e folíolos foram inoculados na região perfurada, sendo colocado um disco de 5 mm de meio de BDA com estruturas do fungo (cultivados por 7 dias) e para o tratamento controle foi depositado um disco de BDA sem crescimento fúngico. Foram utilizados três fragmentos para cada isolado e para testemunha. Após as inoculações, raques e folíolos foram colocadas em caixas do tipo gerbox, forradas com papel filtro umedecidos para proceder a câmara úmida de 48 horas. Em seguida foram incubadas a uma temperatura de  $25 \pm 1$  °C, fotoperíodo de 12 horas. Os tamanhos das lesões foram medidos sete dias após a inoculação.

### 3.2.3 Caracterização molecular

#### 3.2.3.1 Extração, amplificação e sequenciamento de DNA

Para a extração e amplificação do DNA, utilizou a massa micelial de cada isolado, obtida a partir do cultivo em meio líquido de L-Asparagina durante cinco dias em erlenmeyer de 50mL e incubados à temperatura ambiente ( $25 \pm 1$  °C) e fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, a massa micelial foi retirada do meio de cultura e posta para secar à temperatura ambiente. O protocolo de extração utilizado foi o CTAB adaptado de Doyle; Doyle (1987).

A amplificação de fragmentos do DNA foi feita por Reação da Cadeia da Polimerase (PCR). Inicialmente, todos os isolados foram amplificados para região espaçadora interna transcrita (ITS), usando os primers ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990). Após a identificação das espécies pela região ITS, os produtos de PCR do gene do fator de alongamento 1- $\alpha$  (TEF1- $\alpha$ ) e a grande subunidade do RNA ribossômico nuclear (LSU), amplificados usando os primers 728F e 986R (CARBONE; KOHN, 1999) e LR0R e LR5 (VILGALYS; HESTER, 1990), respectivamente, foram sequenciados para confirmar a identidade dos haplótipos representativos dentro de cada espécie (Tabela 1).

**Tabela 1.** Descrição dos primers utilizados para identificação dos gêneros fúngicos de Botryosphaeriaceae.

Gene	Primer	Sequência (5' – 3')	Referência
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	WHITE et al.,1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
TEF1- $\alpha$	728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	CARBONE; KOHN (1999)
	986R	TACTTGAAGGAACCCCTACC	
LSU	LR0R	ACCCGCTGAACTTAAGC	VILGALYS; HESTER, 1990
	LR5	TCCTGAGGGAAACTTCG	

As PCRs foram realizadas em termociclador Applied Biosystems (2720 Thermal Cycler) nas seguintes condições: para a região ITS, a desnaturação inicial foi de 95°C por 2 min, seguidos por 38 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 55°C por 30s, extensão a 72°C por 45s e uma extensão final a 72°C por 10 min; para TEF1- $\alpha$  a desnaturação inicial foi de 94°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 60s, anelamento a 55°C por 60s, extensão a 72°C por 60s e uma extensão final a 72°C por 10 min; e para LSU a desnaturação inicial foi de 94°C por 3 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 55°C por 50s, extensão a 72°C por 60s e uma extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,0% com Tris Borato EDTA 1X, corado com brometo de etídio (5 mg. mL<sup>-1</sup>) e visualizado em transiluminador UV.

Após a confirmação das amplificações nos géis de agarose, alíquotas de 25  $\mu$ L do produto de PCR de cada amostra foram enviadas para a empresa MacroGen Inc., na Coreia do Sul, para purificação e sequenciamento do produto oriundo de cada par de iniciadores.

### 3.2.3.2 Análises filogenéticas

As sequências de nucleotídeos de cada isolado foram montadas com o software Codon Code Aligner v. 6.0.2 (www.codoncode.com) (Codon Code Corporation, Dedham, Massachusetts, USA). O arranjo dos nucleotídeos em posições ambíguas, foram corrigidos por comparação das sequências senso e anti-senso. Sequências parciais obtidas para os genes ITS, TEF1- $\alpha$  e LSU foram inicialmente analisadas com o algoritmo BLASTn e o banco de dados de nucleotídeos não-redundante do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) para determinar as espécies com as quais compartilharam maior identidade de sequência.

Alinhamentos múltiplos das sequências nucleotídicas foram realizadas utilizando a

ferramenta MUSCLE (EDGAR, 2004), implementado pelo programa MEGA v.6 (TAMURA et al., 2013). Sequências de espécie de Botryosphaeriaceae oriundas de estudos anteriores, disponíveis no GenBank, (Tabela 2), foram incluídas nas análises.

**Tabela 2.** Números de acesso GenBank das sequências de Botryosphaeriaceae utilizadas nas análises filogenéticas.

Espécies	Isolados	ITS	TEF1- $\alpha$	LSU
<i>Diplodia corticola</i>	CBS 112549	AY259100	AY573227	AY928051
<i>D. corticola</i>	CBS 112546	AY259090	EU673310	EU673262
<i>D. mutila</i>	CBS 112553	AY259093	AY573219	AY928049
<i>D. mutila</i>	CBS 230.30	DQ458886	DQ458869	EU673265
<i>D. scrobiculata</i>	CBS 109944	DQ458899	DQ458884	EU673268
<i>D. scrobiculata</i>	CBS 113423	DQ458900	DQ458885	EU673267
<i>D. seriata</i>	CBS 112555	AY259094	AY573220	AY928050
<i>D. seriata</i>	CBS 119049	DQ458889	DQ458874	EU673266
<i>Lasiodiplodia bruguierae</i>	CMW41470	KP860833	KP860678	-
<i>L. bruguierae</i>	CMW42480	KP860832	KP860677	-
<i>L. caatinguensis</i>	IBL366	KT154760	KT008006	-
<i>L. caatinguensis</i>	IBL381	KT154757	KT154751	-
<i>L. crassispora</i>	CBS 110492	EF622086	EF622066	EU673251
<i>L. crassispora</i>	CBS 118741	DQ103550	EU673303	DQ377901
<i>L. exigua</i>	BL 104	KJ638317	KJ638336	-
<i>L. gilanensis</i>	IRAN1501C	GU945352	GU945341	-
<i>L. gilanensis</i>	IRAN1523C	GU945351	GU945342	-
<i>L. gonubiensis</i>	CBS 115812	DQ458892	DQ377902	DQ458877
<i>L. gonubiensis</i>	CBS 116355	AY639594	DQ103567	EU673252
<i>L. mahajangana</i>	CMW27801	MH057188	MH102251	-
<i>L. mahajangana</i>	CMW27818	FJ900596	FJ900642	-
<i>L. margaritacea</i>	CBS122519	EU144050	EU144065	-
<i>L. margaritacea</i>	CBS122065	EU144051	EU144066	-
<i>L. missouriana</i>	UCD2193MO	HQ288225	HQ288267	-
<i>L. missouriana</i>	UCD2199MO	HQ288226	HQ288268	-
<i>L. parva</i>	CBS 356.59	EF622082	EF622062	EU673257
<i>L. parva</i>	CBS 494.78	EF622084	EF622064	EU673258
<i>L. plurivora</i>	STEU5803	EF445362	EF44539	-
<i>L. pseudotheobromae</i>	CBS116459	EF622077	EF622057	EU673256
<i>L. pseudotheobromae</i>	CBS447.62	EF622081	EF622060	EU673255
<i>L. theobromae</i>	CBS 164.96	AY640255	AY640258	EU673253
<i>L. theobromae</i>	CBS124.13	DQ458890	DQ458875	AY928054
<b><i>L. theobromae</i></b>	<b>COUFAL0102</b>	MK792506	MK792505	-
<b><i>L. theobromae</i></b>	<b>COUFAL0103</b>	MK792507	MK792504	-
<i>L. viticola</i>	UCD2553AR	HQ288227	HQ288269	-
<i>L. viticola</i>	UCD2604MO	HQ288228	HQ288270	-
<b><i>Neodeightonia alagoensis</i></b>	<b>COUFAL0165</b>	MK792508	MK792523	MK792514
<b><i>N. alagoensis</i></b>	<b>COUFAL0171</b>	MK792509	MK792524	MK792515

**Tabela 2.** (Continuação)

<b>Espécies</b>	<b>Isolados</b>	<b>ITS</b>	<b>TEF1-<math>\alpha</math></b>	<b>LSU</b>
<i>N. alagoensis</i>	<b>COUFAL0173</b>	MK792510	MK792525	MK792516
<i>N. alagoensis</i>	<b>COUFAL0231</b>	MK792511	MK792520	MK792517
<i>N. alagoensis</i>	<b>COUFAL0232</b>	MK792512	MK792521	MK792518
<i>N. alagoensis</i>	<b>COUFAL0233</b>	MK792513	MK792522	MK792519
<i>N. licuriensis</i>	COAD1780	KP165429	KP165430	-
<i>N. microspora</i>	MFLUCC 11-0483	KU940110	-	KU863099
<i>N. microspora</i>	MFLUCC 11-0504	KU940111	-	KU863100
<i>N. palmicola</i>	MFLUCC 10-0822	HQ199221	-	HQ199222
<i>N. palmicola</i>	MFLUCC10-0823	HQ199224	-	HQ199225
<i>N. phoenicum</i>	CBS 122528	KF766198	EU673309	EU673261
<i>N. phoenicum</i>	CBS 123168	EU673339	EU673308	EU673260
<i>N. phoenicum</i>	CBS 169.34	EU673338	EU673307	EU673259
<i>N. rattanica</i>	MFLUCC 15-0712	KX646357	KX646360	KX646352
<i>N. rattanica</i>	MFLUCC 15-0313	KX646358	KX646361	KX646353
<i>N. rattanicola</i>	MFLUCC 15-0319	KX646359	KX646362	KX646354
<i>Neodeightonia</i> sp.	PLM-367	MG321231	MG309739	-
<i>Neodeightonia</i> sp.	PLM-610	MG321232	MG309740	-
<i>N. subglobosa</i>	CBS 448.91	KF766199	EU673306	DQ377866
<i>Spencermartinsia viticula</i>	CBS 117009	AY905554	AY905559	DQ377873

ITS = Internal transcribed spacer; TEF1- $\alpha$  = Translation elongation factor 1- $\alpha$ ; LSU= Nuclear ribosomal RNA large subunit (LSU). Isolados obtidos neste estudo estão destacados em negrito.

As relações filogenéticas foram inferidas pelo método de inferência Bayesiana (IB) utilizando o método de Cadeia de Markov de Monte Carlo (MCMC). Os conjuntos de dados ITS, TEF1- $\alpha$  e LSU (individuais e concatenados) foram reconstruídas no portal CIPRES (MILLER et al., 2010) usando MrBayes v. 3.2.3 (RONQUIST et al., 2012). O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi determinado para cada região genômica usando MrModeltest v. 2.3 (POSADA; BUCKLEY, 2004). Análises foram rodadas por 10 milhões de gerações usando quatro cadeias e amostrando a cada 1.000 gerações, para um total de 10.000 árvores. As árvores filogenéticas geradas foram visualizadas e editadas nos programas FigTree v. 1.4 ([ztree.bio.ed.ac.uk/software/figtree](http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree)) e Inkscape (<https://inkscape.org/pt/>).

### 3.2.4 Caracterização cultural e morfológica

Para avaliar o crescimento e coloração das colônias, foi retirado da borda de cada isolado (cultivados por sete dias), um disco de meio de cultura contendo estruturas do patógeno, e em seguida transferidos para o centro de placas de Petri contendo meio BDA. As placas foram incubadas a  $25 \pm 1$  °C com fotoperíodo de 12 horas. As medições do diâmetro do reverso das colônias em duas direções ortogonais, foram realizadas diariamente e concluída

quando o primeiro isolado atingiu a borda da placa, determinando-se assim, o Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) do fungo ( $\text{mm.dia}^{-1}$ ), que foi calculada com a seguinte fórmula:  $\text{IVCM} = \Sigma(D-D_a)/N$ , sendo: D = diâmetro médio atual da colônia;  $D_a$  = diâmetro médio da colônia do dia anterior e N = número de dias após a inoculação. Por fim, aos 10 dias após a incubação determinou-se a coloração das colônias, utilizando-se uma escala descritiva reportada por Lima et. al. (2013). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) com oito tratamentos e cinco repetições, em que cada placa de Petri constituiu uma unidade experimental.

Na caracterização morfológica dos esporos, foi retirado da borda de cada isolado (cultivados por sete dias), um disco de meio de cultura contendo estruturas do patógeno, que foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo meio Agar-Água (AA) onde, foram depositadas acículas de pinheiros autoclavadas. As placas foram incubadas a  $25 \pm 1$  °C, sob luz negra. As dimensões dos conídios (comprimento e largura) foram avaliadas após esporulação utilizando microscopia de luz. Dessa forma, imagens foram capturadas por câmera digital (Olympus IX2-SLP) acoplada ao microscópio com aumento de 400x através do software Cellsenses Standard (SAMSUNG SDC-415®). Foram avaliados 50 conídios por isolado.

### **3.3 Resultados e Discussão**

#### **3.3.1 Resultados**

##### **3.3.1.1 Obtenção dos isolados**

Foram obtidos 28 isolados de Botryosphaeriaceae. Destes, cinco isolados do município de Coruripe, litoral sul de Alagoas, 14 isolados do município de Satuba, zona da mata alagoana e nove isolados do município de Neópolis, localizado no leste do estado de Sergipe. Esses municípios foram escolhidos por apresentarem plantios comerciais de coco e por serem geograficamente distantes, além de pertencerem a microrregiões diferentes (Tabela 3). As culturas obtidas foram depositadas na Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos da Universidade Federal de Alagoas (COUFAL).

**Tabela 3.** Isolados coletados de plantios comerciais nos estados de Alagoas e Sergipe.

Município/UF	Parte da planta	Isolados
Coruripe-AL	Raque	FC-9, FC-13 (COUFAL0171), FC-16 (COUFAL0173), FC-22, FC-29
Satuba-AL	Raque	FS-3 (COUFAL0165), FS-4, FS-4.1, FS-5, FS-6, FS-9.1, FS-10 (COUFAL0103), FS-11, FS-11.1, FS-12, FS-12.1 (COUFAL0102), FS-14, FS-15, FS-15.1
Neópolis-SE	Folículo	NFO18 (COUFAL0231), NFO21, NFO30 (COUFAL0232), NFO35, NFO40, NFO47 (COUFAL0233)
	Raque	NRA9, NRA16, NRA39

### 3.3.1.2 Teste de patogenicidade

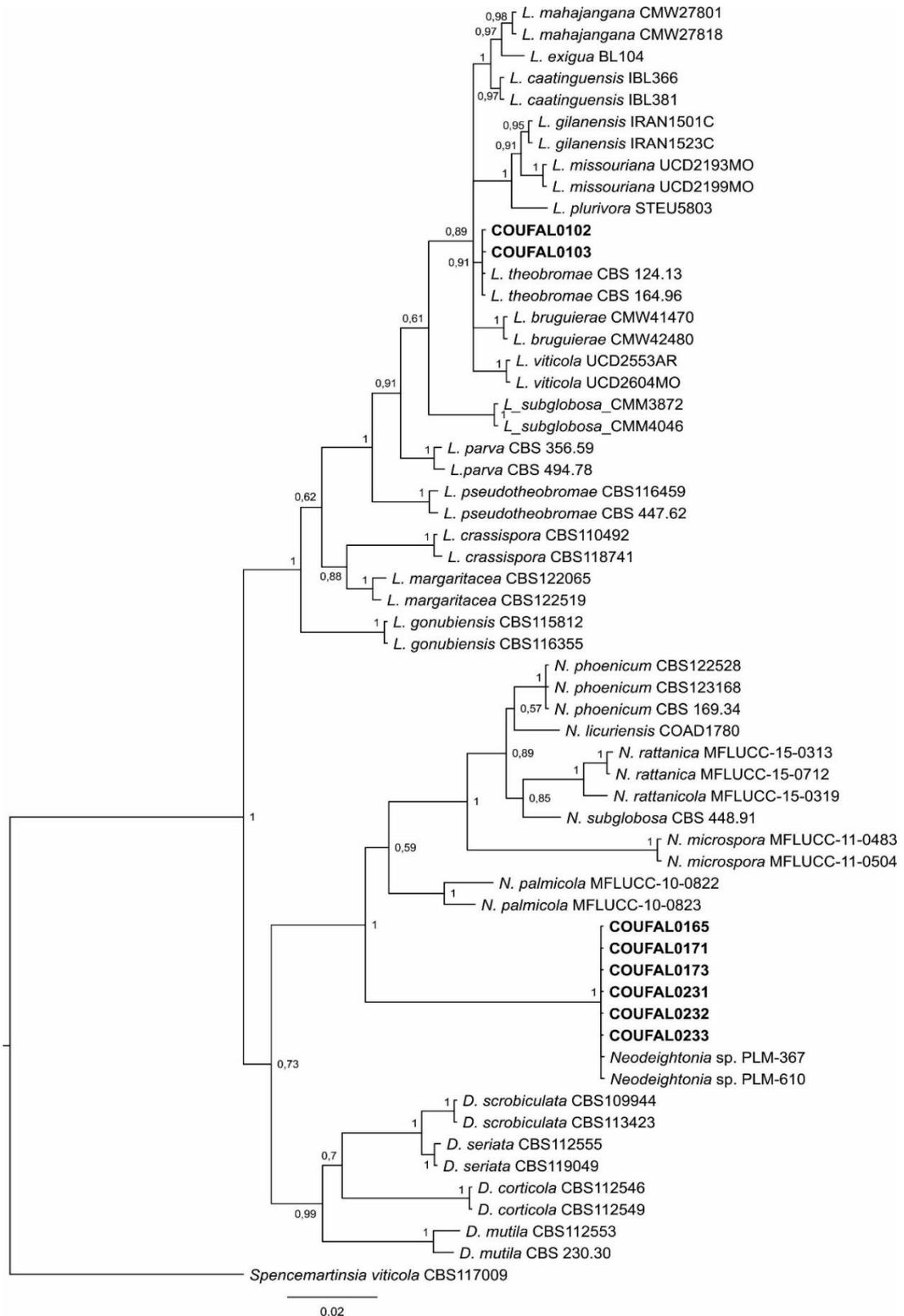
Todos os isolados foram patogênicos em raques e folhas de coqueiro, com sintomas iniciando 72 horas após as inoculações, onde observou-se o escurecimento dos vasos e posteriormente, necrose na região onde foram inoculadas (Figura 3B-C). Não foram observadas lesões nas folhas e raques do tratamento controle. As respectivas espécies foram reisoladas dos tecidos doentes, cumprindo assim os postulados de Koch.

### 3.3.1.3 Análise filogenética

Na reconstrução filogenética de inferência Bayesiana para os conjuntos de dados concatenados, foram utilizados os seguintes modelos evolutivos: HKY+I+G (ITS e TEF1- $\alpha$ ) e GTR+I+G (LSU) para os alinhamentos de sequências nucleotídicas. *Spencermartinsia viticula* (CBS117009) foi utilizado como outgroup.

As análises filogenéticas revelaram dois gêneros distintos de Botryosphaeriaceae, dentre os 28 isolados obtidos causando queima das folhas do coqueiro: *Lasiodiplodia* e *Neodeightonia*. Após uma análise prévia utilizando a região ITS, foram verificados nove haplótipos pertencentes ao gênero *Lasiodiplodia* e 19 haplótipos ao gênero *Neodeightonia*, onde separou-se dois e seis isolados representativos, respectivamente, para compor a filogenia. Na árvore de Inferência Bayesiana para o conjunto de dados concatenados (ITS, TEF1- $\alpha$  e LSU) observou-se que as espécies identificadas formaram grupos bem suportados. No gênero *Lasiodiplodia*, os isolados agruparam com a espécie *Lasiodiplodia theobromae* (COUFAL0102 e COUFAL0103). Entretanto, os isolados COUFAL0165, COUFAL0171, COUFAL0173, COUFAL0231, COUFAL0232 e COUFAL0233 pertencentes ao gênero *Neodeightonia*, formaram um clado com uma espécie ainda não relatada *Neodeightonia* sp. e, portanto, foram considerados como pertencentes a uma nova espécie: *Neodeightonia*

*alagoensis* sp. nov (Figura 1).



**Figura 1.** Árvore filogenética de inferência Bayesiana com base nas sequências combinadas das regiões ITS, TEF1- $\alpha$  e LSU. *Spencermartinsia viticola* foi utilizado como outgroup. Isolados caracterizados neste estudo estão destacadas em negrito.

## **Taxonomia**

*Neodeightonia alagoensis* T.J.A. Barbosa & G.S.A. Lima, **sp. nov.**

**Posição sistemática:** Ascomycota, Pezizomycotina, Dothideomycetes, Botryosphaeriales, Botryosphaeriaceae.

**Etimologia:** O nome é referente ao local onde o fungo foi encontrado, Estado de Alagoas, Brasil.

Colônias crescidas em acículas de pinheiro sobre meio de cultura AA expostas a luz negra produziram picnídios pretos e ásperos (Figura 2E). O **teleomorfo** produziu ascas hialinas com presença de oito ascósporos revestidos por uma bainha mucilaginosa (Figura 2F). O **anamorfo** apresenta célula conidiogênica hialina e alongada, com presença de gúttulas nos esporos em formação e ausência de paráfises (Figura 2G-H). Conídios hialinos quando jovem, granular, elipsóide, sendo mais largo no terço mediano, e quando maduros são hialinos, asseptados e alongados (Figura 2I) variando de 24,5-30,9 x 10,8-14,4 µm (Tabela 4).

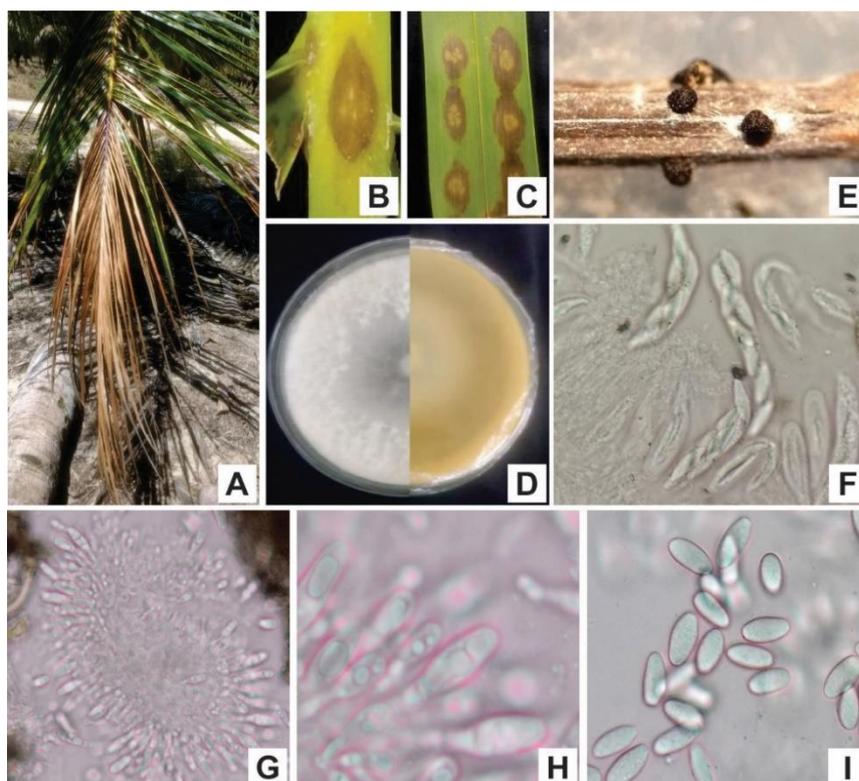
**Características da cultura:** Em meio BDA sintético, as colônias apresentaram inicialmente coloração branca e após dez dias a coloração variou de cinza claro a cinza escuro, com presença de micélio aéreo nas extremidades da placa. O reverso teve coloração variando de marrom claro a escuro e halos cinza-claro (Figura 2D). As colônias apresentaram taxa de crescimento micelial de 28,6 mm.dia<sup>-1</sup>, a 25° C e fotoperíodo de 12 horas.

**Habitat:** Em folhas e raque foliar de *Cocos nucifera*.

**Distribuição conhecida:** Estado de Alagoas e Sergipe, Brasil e estado da Flórida, USA.

**Tipo:** Brasil, Alagoas, municípios de Coruripe e Satuba, Sergipe, município de Neópolis, em folíolos e raque foliar de *Cocos nucifera*, 2017, coletado por T.J.A. Barbosa, Holótipo URM XXXX, cultura seca em acículas de pinheiro e cultivada em meio de cultura, ex-type cultura URM XXXX.

**Notas:** *Neodeightonia alagoensis* agrupou em um clado com *Neodeightonia* sp. demonstrando 100% de similaridade nas sequências. Apresentou maior proximidade com *N. palmicola* com diferenças nas duas regiões genômicas disponíveis no banco de dados, sendo 66 nucleotídeos em ITS e 5 nucleotídeos em LSU. Com a espécie tipo, *N. subglobosa*, as diferenças filogenéticas foram nas três regiões genômicas, sendo 46 nucleotídeos em ITS, 60 nucleotídeos em TEF1-α e 17 nucleotídeos em LSU.



**Figura 2.** Sintomas de queima das folhas do coqueiro e aspectos culturais, morfológicos e patogênicos de *Neodeightonia alagoensis*. Sintoma em “V” invertido, típico da doença no campo (A); Sintomas visualizados em folha e raque nos testes de patogenicidade (B-C); Colônia em BDA com 10 dias (D); Picnídio sobre acícula de pinheiro (E); Ascas maduras e imaturas (F); Células conidiogênicas sem presença de paráfises (G-H); e conídios de *N. alagoensis* (I). Fonte: Autor.

**Tabela 4.** Características morfológicas da espécie de *Neodeightonia* encontrada neste estudo e das espécies já descritas.

Nome da espécie	Conídio µm	Número de septo	Crescimento micelial	Referência
<i>Neodeightonia alagoensis</i>	25,0-31,6 x 12,7-14,4	Asseptado	Em 4 dias, 9 cm em BDA a 25°C	Neste estudo
<i>Neodeightonia rattanica</i>	19-22 x 7-9	Asseptado	Em 2 semanas 7-8,5 cm em MEA a 25°C	Konta et al., 2016
<i>Neodeightonia rattanicola</i>	13-20 x 7-8	Asseptado	Em 2 semanas 7-8,5 cm em MEA a 25°C	Konta et al., 2016
<i>Neodeightonia phenicum</i>	14,5-24 x 9-14	1	Não informado	Phillips et al., 2008, 2013
<i>Neodeightonia palmicola</i>	17,5-24,5 x 9,5-12,5	1	Em 4 dias, 5 cm em BDA	Liu et al., 2010
<i>Neodeightonia microspora</i>	- *	-	Em uma semana, 5 cm em BDA a 28°C	Daí et al., 2016
<i>Neodeightonia licuriensis</i>	14.6-20,5 × 8,3-11,4	Até 3	Em 10 dias, 9 cm em BDA 25°C	Adamčík et al., 2015
<i>Neodeightonia subglobosa</i> (espécie tipo)	11-13,5 x 8-10,5	1	Em 5 dias, 5 cm a 28°C	Phillips et al., 2008, 2013; Liu et al., 2010; Daí et al., 2016

\*Em trabalho de Dai et al. (2016), não foi encontrado o morfo sexual da espécie.

Na caracterização morfocultural de *Lasiodiplodia theobromae*, o índice de crescimento micelial médio foi de 52,0 mm.dia<sup>-1</sup>, com variação de 39,3 e 64,8 mm entre os isolados desta espécie. Em relação à morfologia das colônias, essa espécie apresentou coloração variando de cinza claro a escuro, com reverso em tom escuro, quase preto, sendo que, algumas colônias com o centro do reverso escuro e bordas de cor cinza. Essas colônias produziram picnídios sobre o meio de cultura a partir da terceira semana e apresentaram conídios com dimensão média de 24,8 x 14,2 µm, variando entre 19,6-31,3 x 11,2-17,4 µm.

### 3.3.2 Discussão

Esse é o primeiro estudo que visa a identificação de espécies de Botryosphaeriaceae associadas a queima das folhas do coqueiro nos Estados de Alagoas e Sergipe. Os resultados demonstram que a queima das folhas não é causada apenas por espécies do gênero *Lasiodiplodia*, mas também pelo gênero *Neodeightonia*, indicando que assim como a podridão dos frutos (ROSADO et al., 2016), a queima das folhas está associada à um complexo de espécies (SANTOS, 2017). Além disso, este é o primeiro relato do gênero *Neodeightonia* causando doença em *Cocos nucifera*.

Entre os gêneros de Botryosphaeriaceae, *Lasiodiplodia* é o que apresenta o maior número de espécies descritas, cerca de 38 (SLLIPERS et al., 2017). Essas espécies são comumente encontradas nas regiões tropicais e subtropicais, causando muitas doenças em uma ampla gama de hospedeiros (PUNITHALINGAM, 1980; MACHADO et al., 2014; CORREIA et al., 2015; COUTINHO et al., 2017). Em coqueiro, espécies de *Lasiodiplodia* spp. já foram relatadas por diversos autores causando podridão dos frutos e principalmente, queima das folhas, que é considerada uma das principais doenças do coqueiro no Brasil (RAM, 1989; ROSADO et al., 2016; COUTINHO et al. 2017; SANTOS, 2017).

A espécie *L. theobromae*, identificada no presente estudo, é o principal agente etiológico da queima das folhas e até pouco tempo era tida como a única espécie responsável pela doença (SOUSA FILHO et al., 1979; MARIANO; SILVEIRA, 2005; COUTINHO et al., 2017). Porém, estudos recentes detectaram mais três espécies associadas a essa doença, *L. euphorbicula* (COUTINHO et al., 2017), *L. pseudotheobromae* e *L. brasiliense* (SANTOS, 2017). Os resultados obtidos por estes autores deixam claro que, a queima das folhas até então era especificamente causada por espécies do gênero *Lasiodiplodia*. Contudo, este estudo demonstra que o gênero *Neodeightonia* também está associado a doença, além disso, ela é a espécie que predomina causando a doença nas áreas amostradas dos estados de Alagoas e Sergipe.

O gênero *Neodeightonia* foi introduzido por Booth (PUNITHALINGAM, 1969) e atualmente são reconhecidas sete espécies, *N. subglobosa* (espécie tipo) (PUNITHALINGAM, 1969; PHILLIPS et al., 2008; LIU et al., 2010; DAI et al., 2016), *N. palmicola* (LIU et al., 2010), *N. microspora* (DAI et al., 2016), *N. phoenicum* (PHILLIPS et al., 2008), *N. licuriensis* (ADAMČÍK et al., 2015), *N. rattanica* e *N. rattanicola* (KONTA et al., 2016). Destas, apenas *N. licuriensis* foi relatada no Brasil causando doença em licuri (*Syagrus coronata*), que é uma palmeira nativa do Bioma Caatinga (ADAMČÍK et al., 2015).

No passado, o gênero *Neodeightonia* era sinonimizado como *Botryosphaeria* (VON ARX; MÜLLER, 1975), no entanto, com base em estudos morfológicos e filogenéticos, Phillips et al. (2008) reintroduziram o gênero. De acordo com estes autores, esse gênero assemelha-se aos gêneros *Diplodia* e *Lasiodiplodia*, morfológicamente. Podendo ser distinguido de *Diplodia* apenas pela presença de estrias conidiais e de *Lasiodiplodia* pela ausência de paráfises hifais, que são hifas estéreis que se formam entre as células conidiogênicas (PHILLIPS et al., 2008; 2013).

Filogeneticamente, o sequenciamento multilocus de ITS, TEF1- $\alpha$ , LSU, SSU e  $\beta$ -tub têm sido eficientes para identificação de espécies desse gênero, sendo os quatro primeiros os mais utilizados (LIU et al., 2012; PHILLIPS et al., 2013; KONTA et al., 2016). No entanto, Phillips et al. (2013), demonstraram que apenas a região ITS foi suficiente para separar as espécies de *Neodeightonia*. Resultado este, observado no presente estudo, quando esta região (ITS) separou não só as espécies relatadas do gênero mais também a espécie aqui identificada. Porém, quando adicionamos TEF1- $\alpha$  e LSU observamos uma filogenia mais robusta, com clados bem suportados, comprovando a importância do uso de mais de uma região genômicas para a identificação precisa das espécies desse gênero. Konta et al. (2016) também relataram ramos bem definidos para as espécies de *Neodeightonia* quando utilizaram quatro regiões genômicas (ITS, TEF1- $\alpha$ , LSU e SSU).

Neste estudo, introduzimos uma nova espécie de *Neodeightonia*, *N. alagoensis*. Esta espécie foi isolada de folhas e raque de *C. nucifera* e com base em análises morfológicas e filogenéticas diferenciou-se das demais espécies descritas para o gênero (PUNITHALINGAM 1969; PHILLIPS et al., 2008, 2013; LIU et al., 2010; DAI et al., 2016; ADAMČÍK et al., 2015; KONTA et al., 2016). Porém, agrupou com sequências de ITS, TEF1- $\alpha$  depositadas no banco de dados “Genbank”, com uma espécie ainda não descrita, *Neodeightonia* sp. Os referidos isolados foram obtidos de *Washingtonia robusta*, uma Arecacea ornamental bem típica na cidade da Flórida, nos Estados Unidos. Para esses isolados não foram realizadas

nenhuma caracterização morfológica e nem cultural (ELIOTT; MORALES; DES JARDIN, 2018).

Em relação às características morfológicas, *N. alagoensis* apresentou conídios asseptados, largos, alongados e em formato elipsóide, se constituindo nas maiores dimensões de conídios do gênero. Diferencia-se de *N. subglobosa* (espécie tipo), que possui conídios mais curtos e ovóide e presença de septo nos conídios (PHILLIPS et al., 2008; LIU et al., 2010; DAI et al., 2016). Diferencia-se ainda de *N. palmicola* e *N. licuriensis* que também apresentam septação nos conídios e assemelha-se as espécies *N. rattanica*, *N. rattanicola* e *N. phenicum* quanto a ausência de septos nos conídios (ADAMČÍK et al., 2015; KONTA et al., 2016). Além disso, observou-se a fase sexuada de *N. alagoensis*, fase esta, relatada na maioria das espécies de *Neodeightonia*, exceto em *N. licuriensis* e *N. phenicum*

Em relação ao crescimento micelial, *N. alagoensis*, colonizou toda a placa de Petri em apenas quatro dias. Entre as espécies descritas para o gênero, foi a que obteve o crescimento mais rápido (ADAMČÍK et al., 2015; KONTA et al., 2016). Quanto à coloração das colônias, assemelha-se com a coloração encontrada para a espécie *N. licuriensis*, *N. rattanica* e *N. rattanicola*, as quais apresentaram coloração branco a ligeiramente cinzento na maturidade (ADAMČÍK et al., 2015; KONTA et al., 2016).

Já a espécie *L. theobromae* apresentou taxa de crescimento micelial, em meio BDA, de 3,93 a 6,48 cm.dia<sup>-1</sup>, corroborando com os encontrados por outros autores (LIMA et al., 2013; MARQUES et al., 2013). Os dados da variação na coloração das colônias se assemelham aos parâmetros encontrados para Botryosphaeriaceae (LIMA et al., 2014; SANTOS, 2017; OSORIO et al., 2017). As características dos conídios de *L. theobromae*, identificado no presente estudo, estão de acordo com resultados observados por outros autores (ALVES et al., 2008; MACHADO et al., 2014; ROSADO et al., 2016).

No presente estudo foram obtidos 28 isolados, destes, 19 no estado de Alagoas e nove no estado de Sergipe (Tabela 3). No estado de Alagoas as duas espécies identificadas estavam presentes nos locais de coleta. No município de Coruripe, 60% dos isolados obtidos eram de *N. alagoensis* e 40% de *L. theobromae*, e no município de Satuba, 50% de *N. alagoensis* e 50% de *L. theobromae*. No Estado de Sergipe, 100% dos isolados foram de *N. alagoensis*. Esses resultados demonstram que a espécie *N. alagoensis* é o principal agente etiológico da queima das folhas do coqueiro, nas áreas amostradas. Até então, nesses estados só havia relatos de *L. theobromae* como agente etiológico da queima das folhas do coqueiro (SOUZA FILHO et al., 1979; FONTES; FERREIRA; SIQUEIRA, 2002).

Podemos observar ainda que a capacidade patogênica das espécies relatadas pertencentes ao gênero *Neodeightonia*, incluindo a espécie aqui identificada, é quase exclusivamente específica de plantas da família Areaceae como, *Arenga westerhoutii*, *Calamus* sp., *Caryota urens*, *Phoenix* sp., *Syagrus coronata*, *Washingtonia robusta* (PHILLIPS et al., 2008; LIU et al., 2010; DAI et al., 2016; ADAMČÍK et al., 2015; KONTA et al., 2016; ELIOTT; MORALES; DES JARDIN, 2018) e *Cocos nucifera*, com exceção da espécie tipo (*N. subglobosa*) que foi relatada em *Bambusa*, gênero botânico pertencente à família Poaceae, em uma espécie popularmente conhecidas como bambu (DAÍ et al., 2016)

Neste estudo demonstramos que a queima das folhas é causada por mais de um gênero da família Botryosphaeriaceae, pois até então, apenas espécies de *Lasiodiplodia* estavam associados à doença. Assim, podemos incluir também a espécie *N. alagoensis* como agente etiológico da doença. Os resultados representam uma importante contribuição para a etiologia e epidemiologia da queima das folhas do coqueiro no Nordeste do Brasil. Contudo, novas amostragens precisam ser realizadas antes de uma conclusão definitiva sobre a real diversidade de Botryosphaeriaceae associadas à queima das folhas do coqueiro.

### 3.4 Conclusões

- No estado de Alagoas as espécies *Lasiodiplodia theobromae* e *Neodeightonia alagoensis* estão associadas à queima das folhas do coqueiro e no estado de Sergipe apenas a espécie *N. alagoensis* está associada a doença;

- Este é o primeiro relato do gênero *Neodeightonia* causando doença em coqueiro.

## REFERÊNCIAS

ADAMČÍK, S. et al. Fungal Biodiversity Profiles 1-10. **Mycologie**, v.36, n.2, p.121-166, 2015.

ALVES, A. et al. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. **Fungal Diversity**, v.28, p.1-13, 2008.

ALVES, A. et al. *Botryosphaeria corticola*, sp. nov. on *Quercus* species, with notes and description of *Botryosphaeria stevensii* and its anamorph, *Diplodia mutila*. **Mycologia**, v. 96, p. 598-613, 2004.

ALVES, A. et al. Rapid differentiation of species of Botryosphaeriaceae by PCR fingerprinting. **Research in Microbiology**, Paris, v.158, n.2, p. 112–121, 2007.

BEGOUDE, B. A. D. et al. Botryosphaeriaceae associated with *Terminalia catappa* in Cameroon, South Africa and Madagascar. **Mycologia Progress**, v.9, p.101-123, 2010.

BRAINER, S. **A adaptação do Nordeste ao cenário de modernização da cocoicultura brasileira**. Caderno setorial: ETENE. v. 2, n.18. 25p. 2017.

CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, v.91, n.3, p.553-556, 1999.

CORREIA, K. C. et al. Phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of table grape in the main Brazilian exporting region. **Plant Pathology**, v. 65, p. 92-103, 2015.

COUTINHO, I. B. L. et al. Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. **Plant Pathology**, v. 66, p. 90–104, 2017.

DAI, D. Q. et al. Bambusicolous fungi. **Fungal Diversity**, p.1–105, 2016.

DENMAN, S. et al. Circumscription of *Botryosphaeria* species associated with *Proteaceae* based on morphology and DNA sequence data. **Mycologia**, v.95, p.294-307, 2003.

DISSANAYAKE, A. J. et al. *Botryosphaeriaceae*: Current status of genera and species. **Mycosphere**, v.7, n.7, p.1001–1073, 2016.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.

EDGAR, R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Res**, v.32, p.1792–1797, 2004.

ELLIOTT, M. L.; MORALES, A. D.; DES JARDIN, E. A. New records of Botryosphaeriaceae genera associated with palms in Florida, USA. **Sydowia**, v.70, p.166-178, 2018.

FAOSTAT. (2016). Food and Agriculture Organization of the United Nations. **World Production**. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/342/default.aspx>. Acesso em: 10 dez. 2018.

FONTES, H. R.; WANDERLEY, M. **Situação atual e perspectivas para a cultura do coqueiro no Brasil**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. 16p. (Documentos, 94).

FONTES, H. R.; FERREIRA, J. M. S.; SIQUEIRA, L. A. **Sistema de Produção para a Cultura do Coqueiro**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2002. 65p.

IBGE. (2017). **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Disponível em: <http://www2.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?z=t&o=1&i=P&c=1618>. Acesso em: 11 dez. 2018.

KONTA, S. et al. Botryosphaeriaceae from palms in Thailand II - two new species of *Neodeightonia*, *N. rattanica* and *N. rattanicola* from *Calamus* (rattan palm). **Mycosphere**, v.7, n.7, p. 950-961, 2016.

LIMA, J. S. et al. Caracterização cultural, morfológica e patogênica de *Lasiodiplodia theobromae* associado a frutíferas tropicais. **Summa Phytopathologica**, v.39, n.2, p.81-88, 2013.

LIMA, J. S. et al. Caracterização cultural e patogenicidade de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* em plantas de cajaraneira. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.13, n. 4, p.296-302, 2014.

LIU, J. K. et al. Phylogeny and morphology of *Neodeightonia palmicola* sp. nov. from palms. **Sydowia**, v.62, p.261–276, 2010.

MACHADO, A. R.; PINHO, D. B.; PEREIRA, O. L. Phylogeny, identification and pathogenicity of the Botryosphaeriaceae associated with collar and root rot of the biofuel plant *Jatropha curcas* in Brazil, with a description of new species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Diversity**, v.67, p.231-247, 2014.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. Doenças do coqueiro (*Cocos nucifera* L.). In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L. E. A.; Rezende, J. A. M. (Eds.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p.271-281, 2005.

MARQUES, M. W. et al. Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, v.61, p.181-193, 2013a.

MONTEIRO, C. M. et al. Control of foliar diseases by the axillary application of systemic fungicides in Brazilian coconut palms. **Crop Protection**, v. 52, p. 78–83, 2013.

OSORIO, J. A. et al. Endophytic Botryosphaeriaceae, including five new species, associated with mangrove trees in South Africa. **Fungal Biology**, v.121, p.361-393, 2017.

PERSLEY, G.J. **Replanting the tree of life: Towards an international agenda for coconut palm research**. Wallingford, UK, CAB, 1992, 156p.

PHILLIPS, A. J. L. et al. reassessment of the anamorphic fungus *Fusicoccum luteum* and description of its teleomorph *Botryosphaeria lutea* sp. nov. **Sydowia**, v.54, p. 59-77, 2002.

PHILLIPS, A. J. L. et al. Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the Botryosphaeriaceae. **Persoonia**, v.21, n.1, p.29–55, 2008.

PHILLIPS, A. J. L. et al. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. **Studies in Mycology**, v. 76, p. 51-167, 2013.

PURSEGLOVE, J.W. **Tropical crops monocotyledos**. London: Longman, 1972. 607p.

PUNITHALINGAM, E. Studies on *Sphaeropsidales* in culture. **Mycological Papers**, v.119, p.1–24, 1969.

PUNITHALINGAM, E. Plant diseases attributed to *Botryodiplodia theobromae* Pat. **Bibl Mycol**. v.71, p.1–123, 1980.

RAM, C. Epidemiologia e controle químico da “Queima das folhas” (*Lasiodiplodia theobromae*) em *Cocos nucifera*. **Fitopatologia Brasileira**, v.14, p.215-220, 1989.

RONQUIST, F. et al. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. **Systematic Biology**, v.61, p.539–542, 2012.

ROSADO, A. W. C. et al. Phylogeny, identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia* associated with postharvest stem-end rot of coconut in Brazil. **Plant Disease**, v.100, p.561-568, 2016.

SAKALIDIS, M. L.; HARDY, G. E. S.; BURGESS, T. I. Endophytes as potential pathogens of the baobab species *Adansonia gregorii*: a focus on the Botryosphaeriaceae. **Fungal Ecology**, v.4, p.1-14, 2011.

SANTOS, P. H. D. Patogenicidade e caracterização morfomolecular de fungos Botriosphaeriaceos associados ao coqueiro e filogeografia de *Lasiodiplodia theobromae*. 2017. 86f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes-RJ, 2017.

SLIPPERS, B. et al. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriales*: a systematic and evolutionary framework. **Studies in Mycology**, v.76, p.31-149, 2013.

SLIPPERS, B. et al. Diversity in the Botryosphaeriales: Looking back, looking forward. **Fungal biology**, v.121, p.307-321, 2017.

SMITH, R. S. et al. *Botryosphaeria eucalyptorum* sp. nov., a new species in the *B. dothidea*-complex on *Eucalyptus* in South Africa. **Mycologia**, v. 93, p.277-284, 2001.

SOUZA FILHO, B. F. DE.; SANTOS FILHO, H. P.; ROBBS, C. F. Etiologia da ‘queima’ das folhas do coqueiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.4, p.5-10, 1979

TALAMINI, V.; FERREIRA, J. M. S.; RAMOS, S. R. R. Avaliação da intensidade da queimadas-folhas em cultivares de coqueiro. **Magistra**, v. 24, 2013.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, p.2725–2729, 2013.

VILGALYS, R.; HESTER, M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. **Journal of bacteriology**, v.172, p.4238–4246, 1990.

VON ARX, J.A.; MÜLLER, E.— A re-evaluation of the bitunicate ascomycetes with keys to families and genera. **Studies in Mycology**, v.9, p.1-159, 1975.

WHITE T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: **PCR - Protocols and Applications: A Laboratory Manual**, Academic Press, p.315–322, 1990.

**4 CAPÍTULO II:**  
**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Neopestalotiopsis* ASSOCIADAS À MANCHA**  
**DE PESTALOTIA DO COQUEIRO.**

## IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Neopestalotiopsis* ASSOCIADAS À MANCHA DE PESTALOTIA DO COQUEIRO

**RESUMO:** No Brasil, o cultivo do coqueiro (*Cocos nucifera* L.) vem se expandindo nos últimos anos, gerando emprego e renda a muitos produtores. Com o aumento na exploração da cultura muitas doenças de origem fúngicas passaram a ser observadas. A mancha de pestalotia é uma destas doenças e se caracteriza por apresentar manchas irregulares nas folhas do coqueiro, essas manchas diminuem a área fotossintética da planta e conseqüentemente, a produção. A espécie *Pestalotiopsis guepiini*, até então, é o único agente etiológico da doença no Brasil. Contudo, este estudo precisa ser revisto, uma vez que a espécie foi identificada apenas com base na morfologia, podendo levar a erros no processo de identificação. Além disso, o gênero *Pestalotiopsis* foi desmembrado em mais dois gêneros *Neopestalotiopsis* e *Pseudopestalotiopsis*, passando a ser chamado de complexo Pestalotioid. Assim, o objetivo deste estudo foi identificar e caracterizar espécies pertencentes ao complexo Pestalotioid associadas a mancha de pestalotia do coqueiro. Foram obtidos 10 isolados patogênicos de folhas de coqueiro com sintomas da doença oriundos de plantio comercial no município Neópolis, Estado de Sergipe. As análises morfológicas e moleculares, realizadas por meio de filogenia multilocus, fator de alongamento da tradução 1  $\alpha$  (TEF1- $\alpha$ ), beta tubulina ( $\beta$ -tub) e a região espaçadora interna transcrita (ITS), agruparam os isolados no gênero *Neopestalotiopsis*, identificando três espécies causando mancha de pestalotia do coqueiro: *Neopestalotiopsis foedans*, *N. ellipospora* e *Neopestalotiopsis* sp. Esse é o primeiro relato dessas espécies causando doenças em coqueiro (*C. nucifera*) no mundo.

**Palavras-chave:** *Cocos nucifera*, complexo Pestalotioid, filogenia multilocus.

## IDENTIFICATION OF SPECIES OF *Neopestalotiopsis* ASSOCIATED WITH PESTALOTIA SPOT OF COCONUT

**ABSTRACT:** In Brazil, coconut palm cultivation (*Cocos nucifera* L.) has been expanding in recent years, generating jobs and income for many producers. With the increase in the exploitation of the culture many diseases of fungal origin happened to be observed. The spot of pestalotia is one of these diseases and is characterized by irregular spots on the leaves of the coconut, these spots diminish the photosynthetic area of the plant and consequently, the production. The species *Pestalotiopsis guepiini* until then is the only etiological agent of the disease in Brazil. However, this study needs to be reviewed, since the species was identified only on the basis of morphology, which could lead to errors in the identification process. In addition, the genus *Pestalotiopsis* was dismembered in two genera *Neopestalotiopsis* and *Pseudopestalotiopsis*, to be called the Pestalotioid complex. Like this, the objective of this study was to identify and characterize species belonging to the Pestalotioid complex associated with pestalotia spot of coconut. Ten pathogenic isolates of coconut leaves with symptoms of the disease from commercial plantations were obtained in Neópolis, State of Sergipe. The morphological and molecular analysis, using multilocus phylogeny, translation elongation factor 1 $\alpha$  (TEF-1 $\alpha$ ), beta tubulin ( $\beta$ -tub) and internal transcribed spacer region (ITS), grouped the isolates in the genus *Neopestalotiopsis*, identifying three species causing spot of pestalotia in coconut palms: *Neopestalotiopsis foedans*, *N. ellipsospora* and *Neopestalotiopsis* sp. This is the first report of these species causing coconut disease (*C. nucifera*) in the world.

**Key words:** *Cocos nucifera*, Pestalotioid complex, multilocus phylogeny.

#### 4.1 Introdução

Originário do sudeste asiático, o coqueiro (*Cocos nucifera* L.) abrange terras intertropicais em mais de 90 países com cerca de 12 milhões de hectares plantados, caracterizando-se por ser uma cultura com diferentes aplicações. No Brasil, a cocoicultura vem ganhando importância nos últimos anos, passando a ser o quarto maior produtor mundial, com uma produção aproximada de 2,9 milhões de toneladas, em uma área colhida de mais de 250 mil ha de coqueiros, beneficiando diretamente mais de 220 mil produtores (JESUS-JUNIOR et al., 2015; IBGE, 2017; FAOSTAT, 2016).

Com o aumento na exploração da cultura, muitos problemas fitossanitários passaram a ser observados, como doenças foliares causadas por fungos do complexo Pestalotioid (FONTES; WANDERLEY, 2006; SILVA et al., 2017; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014). Fungos deste complexo eram considerados de importância secundária até pouco tempo e iniciavam o processo infeccioso a partir de aberturas naturais e/ou de ferimentos ocasionados por insetos, pesticidas ou danos provocados pelo sol (HOPKINS; MCQUILKEN, 2000; AGRIOS, 2005). Entretanto, têm ocasionado significativas perdas econômicas em ampla gama de hospedeiros (ÚRBEZ-TORRES et al., 2012; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014; JAYAWARDENA et al., 2014; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2016, ISMAIL et al., 2017).

No Brasil, a principal doença do coqueiro causada por espécies do complexo Pestalotioid é a mancha de pestalotia, que caracteriza-se por apresentar manchas irregulares de tamanhos variados nas folhas, com coloração castanho escuro no centro das lesões que são circundadas por um halo amarelo (ANJOS; CHARCHAR; RAMOS, 2000; CARDOSO et al. 2003; NIU et al., 2015). A doença está associada a espécie *Pestalotiopsis guepinii* (ANJOS; CHARCHAR; RAMOS, 2000; CARDOSO et al. (2003), no entanto, a caracterização da espécie foi realizada apenas por morfologia, caractere considerado insuficiente para a identificação a nível de espécie dentro do gênero *Pestalotiopsis*.

Atualmente, a identificação de espécies desse gênero é realizada com base em estudos moleculares, permitindo, dessa forma, que o gênero *Pestalotiopsis* fosse desmembrado em mais dois novos gêneros, *Neopestalotiopsis* e *Pseudopestalotiopsis*, dando origem ao complexo de Pestalotioid (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014). Com isso, uso de análises filogenéticas multilocus, se tornaram indispensáveis para identificar precisamente as espécies pertencentes a esse complexo, sendo a região espaçadora interna transcrita (ITS), associada com os genes  $\beta$ -tubulina ( $\beta$ -tub) e fator de alongamento da tradução 1- $\alpha$  (TEF1- $\alpha$ ), as mais precisas (HYDE et al., 2014).

Diante do exposto e considerando que trabalhos relacionados a mancha de pestalotia são escassos ou inexistentes no Brasil, objetivou-se com este estudo, identificar e caracterizar as espécies do complexo Pestalotioid associados a mancha de pestalotia na cultura do coqueiro.

## **4.2 Material e Métodos**

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia Molecular e Virologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias (CECA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), localizado no município de Rio Largo, zona da mata alagoana.

### **4.2.1 Origem, obtenção e preservação dos isolados**

Amostras de folhas com sintomas de mancha de pestalotia (Figura 4 AI-AIII) provenientes do coqueiro foram coletadas em cultivo comercial do município de Neópolis, principal polo produtor de frutas do Estado de Sergipe e um dos principais do Nordeste. Nessa região a maior parte do plantio de coco é da variedade anão-verde. O material coletado foi levado ao laboratório, onde foram lavadas e secas naturalmente. Em seguida foram realizados isolamentos indiretos, retirando fragmentos da área de transição entre o tecido sadio e o doente, os quais foram desinfestados com soluções de álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto, lavados em água destilada esterilizada (ADE) por duas vezes, postos para secar em papel de filtro e posteriormente transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar). Após a formação das colônias, discos do meio de cultura contendo o crescimento micelial do patógeno, foram retirados das bordas das colônias e transferidos para novas placas de Petri contendo meio BDA que foram mantidos à temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  até o surgimento das estruturas de reprodução do fungo para posterior identificação e obtenção das culturas monospóricas. Em seguida, os isolados foram preservados utilizando três métodos: tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA, Castellani e em papel filtro autoclavado.

### **4.2.2 Teste de patogenicidade**

A patogenicidade dos isolados foi testada em fragmentos de folíolos sadios de coqueiro, da variedade anão-verde. Os folíolos foram desinfetados por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 3 minutos e, posteriormente lavadas duas vezes em ADE. Os fragmentos foram secos ao ar em toalhas de papel esterilizadas. Após a secagem, ferimentos foram realizados em três posições equidistantes da face adaxial de cada fragmento foliar, para

isso, utilizou-se uma agulha previamente flambada.

Os folíolos foram inoculados na região perfurada, sendo depositados discos de 5 mm de BDA contendo estrutura do patógeno com sete dias de idade e na testemunha foi depositado discos de BDA, sem crescimento fúngico. Em cada fragmento de folíolo foram colocados três discos de BDA contendo estruturas do patógeno. Foram utilizados três fragmentos para cada isolado e para testemunha. Em seguida as folhas foram acondicionadas em caixas do tipo gerbox contendo papel filtro umedecido para manter a umidade a 100%. O experimento foi mantido a uma temperatura de  $25 \pm 1$  °C, fotoperíodo de 12 horas. Os tamanhos das lesões foram medidos sete dias após a inoculação.

### 3.2.3 Caracterização molecular

Para caracterização molecular, realizou-se a extração e amplificação do DNA, obtida da massa micelial de cada isolado, a partir de colônias crescidas em meio líquido de L-Asparagina durante cinco dias em erlenmeyer de 50mL e incubados à temperatura ambiente ( $25 \pm 1$  °C) e fotoperíodo de 12 horas. O protocolo de extração utilizado foi o CTAB, adaptado de Doyle; Doyle (1987).

A amplificação de fragmentos do DNA foi realizada por Reação da Cadeia da Polimerase (PCR). Foram utilizados os primers que codificam para as regiões genômicas ITS,  $\beta$ -tub e TEF1- $\alpha$  (Tabela 5). Em seguida, os produtos de PCRs foram enviados para purificação e sequenciamento diretamente na empresa Macrogen, em Seul, na Coreia do Sul.

**Tabela 5.** Descrição dos primers usados para identificação de espécies pertencentes ao gênero *Neopestalotiopsis*.

Gene	Primer	Sequências (5' - 3')	Referências
ITS	ITS1	TCCGTAGGTCAACCTGCGG	White et al., 1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
$\beta$ -tub	Bt2a	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	O'Donnell; Cigelnik, 1997
	Bt2b	TAGTGACCCTTGGCCAGTTG	
TEF1- $\alpha$	526F	GTCGTYGTYATYGGHCAYGT	Rehner, 2001
	1567R	ACHGTRCCRATACCACCRATCTT	

As sequências de nucleotídeos obtidas, foram alinhadas com o software Codon Code Aligner v. 6.0.2 e avaliadas visualmente para obter uma sequência de consenso das regiões amplificadas para todos os isolados. As análises das sequências foram feitas com o algoritmo BLAST $n$  (ALTSCHUL et al., 1990) e o banco de dados não-redundante do GenBank. Sequências de referência para várias espécies do gênero *Neopestalotiopsis*, anteriormente referidas por Maharachchikumbura et al. (2014), Jayawardena et al. (2016) e Solarte et al (2018), foram recuperadas a partir do GenBank (Tabela 6) e utilizadas para reconstrução da árvore filogenética.

**Tabela 6.** Números de acessos GenBank das sequências utilizadas em análises filogenéticas de fungos do complexo Pestalotioid.

Espécies	Código da cultura	Nº de acesso no GenBank		
		ITS	$\beta$ -tub	TEF1- $\alpha$
<i>Neopestalotiopsis aotearoa</i>	CBS 367.54	MH857366	KM199454	KM199526
<i>N. asiatica</i>	MFLUCC 12-0286	JX398983	JX399018	JX399049
<i>N. australis</i>	CBS 114159	KM199348	KM199432	KM199537
<i>N. chrysea</i>	MFLUCC 12-0261	JX398985	JX399020	JX399051
<i>N. chrysea</i>	MFLUCC 12-0262	JX398986	JX399021	JX399052
<i>N. clavispora</i>	MFLUCC 12-0281	JX398979	JX399014	JX399045
<i>N. clavispora</i>	MFLUCC 12-0280	JX398978	JX399013	JX399044
<i>N. cubana</i>	CBS 600.96	KM199347	KM199438	KM199521
<i>N. egyptiaca</i>	PEST1	KP943747	KP943746	KP943748
<i>N. ellipsospora</i>	MFLUCC 12-0283	JX398980	JX399016	JX399047
<i>N. ellipsospora</i>	CBS 115113	KM199343	KM199450	KM199544
<i>N. ellipsospora</i>	CZCC-15-0087	KU500019	KU500012	KU500015
<b><i>N. ellipsospora</i></b>	<b>COUFAO0234</b>			
<i>N. eucalypticola</i>	CBS 264.37	KM199376	KM199431	KM199551
<i>N. foedans</i>	CGMCC 3.9123	JX398987	JX399022	JX399053
<i>N. foedans</i>	CGMCC 3.9178	JX398989	JX399024	JX399055
<i>N. foedans</i>	CGMCC 3.9202	JX398988	JX399023	JX399054
<b><i>N. foedans</i></b>	<b>COUFAO0235</b>			
<b><i>N. foedans</i></b>	<b>COUFAO0238</b>			
<b><i>N. foedans</i></b>	<b>COUFAO0240</b>			
<b><i>N. foedans</i></b>	<b>COUFAO0241</b>			
<b><i>N. foedans</i></b>	<b>COUFAO0242</b>			
<b><i>N. foedans</i></b>	<b>COUFAO0243</b>			
<b><i>N. foedans</i></b>	<b>COUFAO0244</b>			
<i>N. formicarum</i>	CBS 115.83	KM199344	KM199444	KM199519
<i>N. formicarum</i>	CBS 362.72	KM199358	KM199455	KM199517
<i>N. honoluluana</i>	CBS 114495	KM199364	KM199457	KM199548
<i>N. honoluluana</i>	CBS 111535	KM199363	KM199461	KM199546
<i>N. iranensis</i>	P814	KM074045	KM074056	KM07405
<i>N. javaensis</i>	CBS 257.31	KM199357	KM199437	KM199543
<i>N. magna</i>	SSN-2013a	KF582795	KF582793	KF582791

**Tabela 6.** (Continuação)

<b>Espécie</b>	<b>Código da cultura</b>	<b>ITS</b>	<b><math>\beta</math>-tub</b>	<b>TEF1-<math>\alpha</math></b>
<i>N. mesopotamica</i>	CBS 336.86	KM199362	KM199441	KM199555
<i>N. mesopotâmica</i>	CBS 299.74	KM199361	KM199435	KM199541
<i>N. natalensis</i>	CBS 138.41	KM199377	KM19946	KM199552
<i>N. piceana</i>	CBS 394.48	KM199368	KM199453	KM199527
<i>N. piceana</i>	CBS 254.32	KM199372	KM199452	KM199529
<i>N. piceana</i>	CBS 225.30	KM199371	KM199451	KM199535
<i>N. protearum</i>	CBS 114178	LT853103	KM199463	KM199542
<i>N. rosae</i>	CBS 101057	KM199359	KM199429	KM199523
<i>N. rosae</i>	CBS 124745	KM199360	KM199430	KM199524
<i>N. samarangensis</i>	CBS 115451	KM199430	KM199447	KM199556
<i>N. saprophytica</i>	MFLUCC 12.0282	JX398982	JX399017	JX399048
<i>N. saprophytica</i>	CBS 115452	KM199345	KM199433	KM199538
<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	CBS 664.94	KM199349	KM199459	KM199547
<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	CBS 322.76	KM199366	KM19944	KM199536
<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	CBS 110.20	KM199342	KM19944	KM199540
<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	CBS 360.61	KM199346	KM199440	KM199522
<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	CBS 119.75	KM199356	KM199439	KM199531
<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	CBS 164.42	KM199367	KM199434	KM199520
<b><i>Neopestalotiopsis</i> sp.</b>	<b>COUFAO0236</b>			
<b><i>Neopestalotiopsis</i> sp.</b>	<b>COUFAO0239</b>			
<i>N. steyaertii</i>	IMI 192475	KF582796	KF582794	KF582792
<i>N. surinamensis</i>	CBS 450.74	KM199351	KM199465	KM199518
<i>N. umberspora</i>	MFLUCC12-0285	JX398984	JX399019	JX39905
<i>Pestalotiopsis trachicarpicola</i>	OP068	JQ84594	JQ845945	JQ845946

Alinhamentos múltiplos para sequências nucleotídicas foram obtidos usando o algoritmo MUSCLE (EDGAR, 2004) no programa MEGA v. 6 (TAMURA et al., 2013). As filogenias de Inferência Bayesiana (BI) para os dados de sequências de ITS,  $\beta$ -tub e TEF1- $\alpha$ , foram construídas individualmente no portal CIPRES (MILLER et al., 2010) usando MrBayes v. 3.2.3 (RONQUIST et al., 2012). O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi determinado para cada região genômica usando MrModeltest v. 2.3 (POSADA; BUCKLEY, 2004) de acordo com o Akaike Information Criterion (AIC). As árvores foram visualizadas e editadas nos programas FigTree v. 1.4 ([tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree](http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree)) e Inkscape (<https://inkscape.org/pt/>).

#### 4.2.2 Caracterização morfológica e cultural

As espécies identificadas molecularmente foram caracterizadas morfológicamente quanto às características das colônias (coloração da colônia, taxa de crescimento) e morfologia dos conídios (comprimento e largura, septação e coloração de células centrais e

número de apêndices apical e basal).

Para determinar a taxa de crescimento, os isolados foram cultivados em placas de Petri de 90 mm contendo BDA (batata 2%) em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições. Discos de 5mm de diâmetro foram retirados da borda das colônias com sete dias de idade e colocados no centro de placas de Petri com o micélio em contato direto com o meio BDA. As placas foram incubadas a  $25 \pm 1$  °C com fotoperíodo de 12 h, por sete dias e o crescimento radial foi medido diariamente. Os dados obtidos foram utilizados para calcular o índice de crescimento micelial – ICM, determinando-se assim, a velocidade média de crescimento do fungo (mm.dia<sup>-1</sup>). A coloração predominante da colônia foi observada no sétimo dia de incubação.

Para determinar as dimensões, considerando comprimento e largura dos conídios, septação, coloração de células conidiais e a quantidade de apêndices, 50 conídios foram obtidos de cada espécie. As imagens foram capturadas por câmera digital (Olympus IX2-SLP) acoplada ao microscópio e as medições foram feitas com ampliação de 400x através do software Cellsenses Standard (SAMSUNG SDC-415®).

## **4.3 Resultados e Discussão**

### **4.3.1 Resultados**

#### **4.3.1.1 Obtenção dos isolados**

Foram obtidos dez isolados (COUFAL0234, COUFAL0235, COUFAL0236, COUFAL0237, COUFAL0238, COUFAL0239, COUFAL0240, COUFAL0241, COUFAL0242, COUFAL0243 e COUFAL0244) com características morfológicas semelhantes a fungos pertencentes ao complexo Pestalotioid. As culturas obtidas foram depositadas na Coleção de Fungos Fitopatogênicos da Universidade Federal de Alagoas.

#### **4.3.1.2 Teste de patogenicidade**

Todos os isolados obtidos foram patogênicos, apresentando sintomas cinco dias após as inoculações. Os sintomas observados foram de lesões necróticas na região onde foram inoculados (Figura 4 AIII). Não foram observadas lesões nas folhas do tratamento controle. Após serem avaliados os isolados foram reisolados dos tecidos doentes, cumprindo o Postulado de Koch.

#### 4.3.1.3 Análise filogenética

A análise filogenética foi realizada por Inferência Bayesiana onde foi reconstruída uma árvore com a região ITS e os genes  $\beta$ -tub e TEF1- $\alpha$  de maneira concatenada. Os modelos evolutivos foram selecionados de acordo com o Critério de Informação de Akaike (AIC), sendo GTR+I+G para ITS e TEF1- $\alpha$  e GTR+G para  $\beta$ -tub. A árvore foi enraizada com *Pestalotiopsis trachicarpicola*.

A análise das sequências permitiu o agrupamento dos isolados em um único gênero pertencente ao complexo Pestalotioid: *Neopestalotiopsis*. Os resultados mostraram que os isolados deste estudo se agruparam em três clados distintos, onde: COUFAL0235, COUFAO0238, COUFAO0240, COUFAL0241, COUFAL0242, COUFAL0243 e COUFAL0244 agruparam com a espécie *Neopestalotiopsis foedans*; o isolado COUFAL0234 se agrupou com *N. ellipsospora* e os isolados COUFAL0236 e COUFAL0239 não se agruparam com nenhuma sequência de referência, sendo possivelmente uma nova espécie de *Neopestalotiopsis*, contudo, foi aqui denominada de *Neopestalotiopsis* sp. (Figura 3).

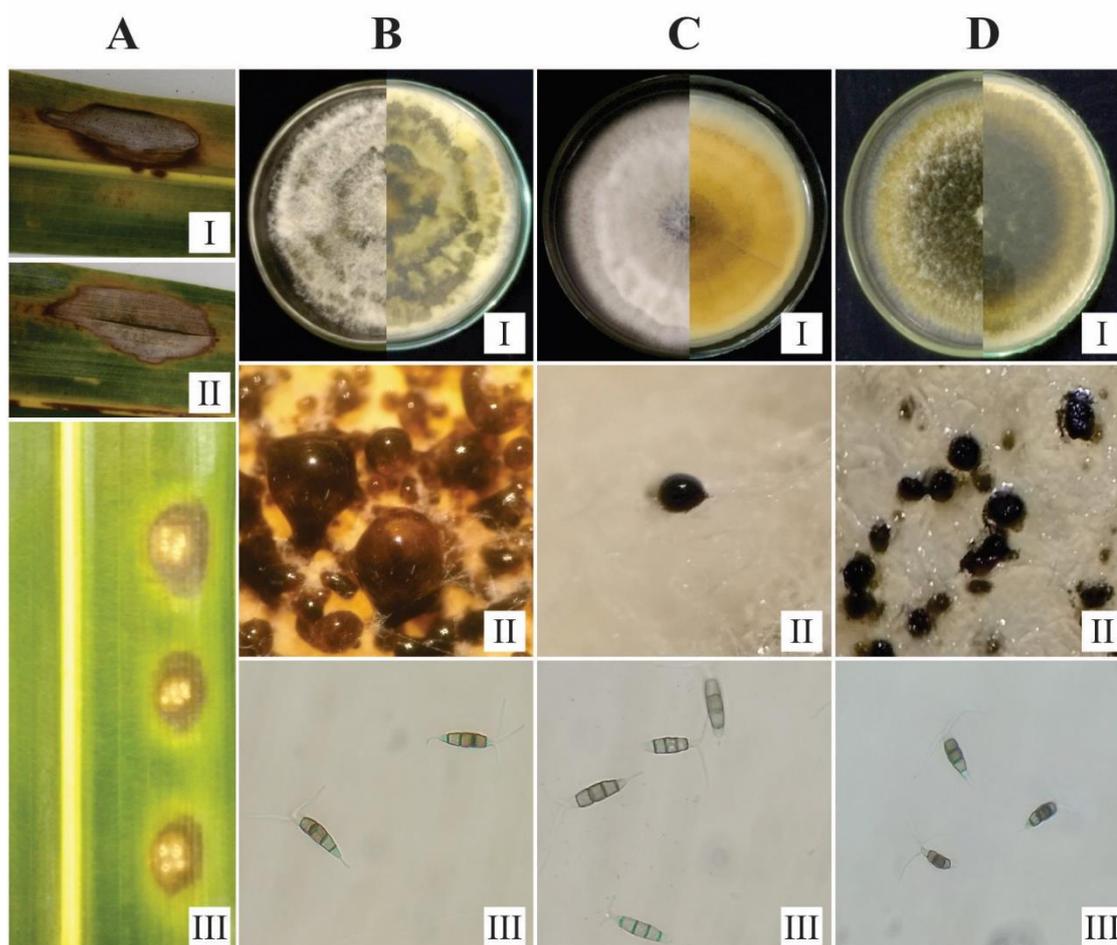


**Figura 3.** Árvore filogenética de inferência Bayesiana com base nas sequências concatenadas das regiões ITS,  $\beta$ -tub e TEF1- $\alpha$ . *Pestalotiopsis trachicarpicola* foi utilizado como outgroup. Isolados caracterizados neste estudo estão destacadas em negrito.

#### 4.3.1.4 Caracterização morfológica e cultural

A espécie *N. foedans* apresentou ICM de 11,0 mm/dia. Aos sete dias as colônias apresentaram bordas regulares, micélio aéreo esbranquiçado na superfície, com corpos frutíferos negros; e no reverso, coloração branca a laranja pálido (Figura 4 BI-II). As colônias de *N. ellipospora* tiveram crescimento de 10 mm/dia. Aos sete dias as colônias desse isolado apresentaram bordas regulares, com micélio aéreo esbranquiçado formando anéis concêntricos, com corpos de frutificação negros na região central da colônia; com o reverso da cultura com coloração laranja pálido (Figura 4 CI-II). Para *Neopestalotopsis* sp. o crescimento foi de 9,9 mm/dia. Após sete dias, as colônias dessa espécie apresentaram bordas regulares, com micélio formado por anéis concêntricos de coloração marrom-escuro, marrom-claro, amarelo e branco (do centro para borda), com corpos frutíferos negros mais concentrados na região central da colônia; o reverso com mesma coloração (Figura 4 DI-II).

Todas as espécies apresentaram conídios com formato fusiformes, sendo reto a ligeiramente curvado com cinco células, onde as três medianas são do tipo versicolor, ou seja, células com coloração diferente, e as células apical e basal, hialinas. O número de apêndices apicais por conídio variou de dois a quatro, raramente quatro; a maioria dos isolados apresentando conídios com três apêndices apicais e um basal (Figura 4 BIII, CIII e DIII). Para a espécie de *N. foedans*, os valores de comprimento e largura de conídios variaram de 20,02-27,82 x 5,37-7,50  $\mu\text{m}$ . Já para espécie *N. ellipospora*, os valores de comprimento e largura de conídios variaram de 19,37-26,99 x 5,24-7,97  $\mu\text{m}$  e *Neopestalotopsis* sp. apresentou conídios com comprimento variando de 22,40 a 28,80 e largura de 6,61 e 8,61  $\mu\text{m}$ .



**Figura 4.** Sintomas de *Neopestalotiopsis* em folíolos de *Cocos nucifera* oriundos de plantios comerciais (AI e AII); Detalhe das lesões após o teste de patogenicidade (AIII); Colônias em meio BDA, corpos de frutificação e conídios maduros de *N. foedans* (B), *N. ellipsozona* (C) e *Neopestalotiopsis* sp. (D). Fonte: Autor.

#### 4.3.2 Discussão

A caracterização de espécies fúngicas pertencentes ao complexo Pestalotioid (*Neopestalotiopsis*, *Pestalotiopsis* e *Pseudopestalotiopsis*) baseada apenas em dados morfológicos pode acarretar em equívocos e imprecisão no processo de identificação. De acordo com Maharachchikumbura et al. (2014), essas características podem separar apenas a nível de gênero onde, *Pestalotiopsis* distinguem-se dos demais gêneros por apresentar conídios com células medianas concolor marrom-claras, diferentemente de *Pseudopestalotiopsis* que possui células medianas concolor marrom-escuras, já o gênero *Neopestalotiopsis* apresenta conídios com células medianas versicolor. Contudo, o uso de ferramentas moleculares com a amplificação e sequenciamento das regiões genômicas ITS,  $\beta$ -tub e TEF1- $\alpha$  são fundamentais para o correto posicionamento taxonômico dos diferentes isolados/espécies pertencentes a esse complexo. MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014;

MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2016a; CHEN et al., 2018; SOLARTE et al., 2018).

No presente trabalho, foram utilizados dados morfológicos e moleculares que permitiram identificar três espécies do complexo Pestalotioid, todas pertencentes ao gênero *Neopestalotipsis* associados a mancha de pestalotia do coqueiro no Brasil: *N. foedans*, *N. ellipospora* e *Neopestalotiopsis* sp. Este é o primeiro relato dessas espécies infectando *Cocos nucifera*.

O gênero *Neopestalotiopsis* possui cerca de 25 espécies descritas ou reclassificadas que já foram relatadas em mais de 40 hospedeiros, causando doenças em diferentes culturas de importância no mundo, como, *Vitis vinifera* (China e França), *Psidium guajava* (Colômbia) e *Cocos nucifera*, (Indonésia e Tailândia) (FARR; ROSSMAN, 2019; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2016a; JAYWARDENA et al. 2016; SOLARTE et al., 2018; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014; HYDE et al., 2016). No Brasil, foi observado em árvore de mata atlântica (*Virmia guianensis*), em palma óleo (*Elaeis guineenses*), em jambeiro (*Syzygins samaranguense*), em acácia negra (*Acacia mearnsii*) e goiabeira (*Psidium guajava*) (SILVÉRIO et al., 2016; QUADROS et al., 2015; LEITE et al., 2017; DUIN et al., 2017; SOUZA, 2017).

A espécie *N. foedans*, desde que foi relatada pela primeira vez em 1881 e identificada como *Pestalotia foedans* Sacc. & Ellis (SACCARDO, 1882), já foi encontrada em cerca de 40 hospedeiros, sendo em muitos deles como endofítica e em espécies botânicas típicas dos países asiáticos (FARR, D. F.; ROSMAN, A.Y., 2019). Mais tarde, foi reclassificada como *Neopestalotiopsis foedans* (Sacc. & Ellis) Maharachch., K.D. Hyde & Crous, sendo relatado em *Calliandra haematocephala*, *Neodypsis decaryi* e *Rhizophora mangle*, culturas características da China, em *Thuja occidentalis*, um pinheiro ornamental da região de New Jersey-USA, e em material coletado em frutos de goiaba (*Psidium guajava*), na Colômbia (MAHARACHCHICUMBURA et al., 2014; SOLARTE et al., 2018).

A espécie *N. ellipospora*, foi inicialmente descrita como *Pestalotiopsis ellipospora* Maharachch. & K.D. Hyde, isolada de uma planta conhecida como baga de natal (*Ardisia crenata*), sendo posteriormente reclassificado como *Neopestalotiopsis ellipospora* (Maharachch. & K.D. Hyde) Maharachch., K.D. Hyde & Crous (MAHARACHCHICUMBURA et al., 2012; 2014). Desde seu primeiro relato, a espécie foi encontrada em *Acanthopanax divaricatus*, na Korea, em *A. crenata*, na China e em batata-doce (*Ipomoea batatas*), também na China (YUN.; AHN; KIM, 2015; CHEN et al., 2018; MAHARACHCHICUMBURA et al., 2016b).

A espécie aqui identificada como *Neopestalotiopsis* sp. não se agrupou com nenhuma sequência de referência na árvore filogenética. Outros autores como Maharachchikumbura et al. (2014) denominaram de *Neopestalotiopsis* sp., sete clados com espécies ainda não identificadas, oriundas de diferentes hospedeiros, como videira, crotalária e coqueiro (China, França, Índia e Indonésia). Solarte et al. (2018) também identificou como *Neopestalotiopsis* sp., 8 isolados obtidos de folhas e frutos da goiabeira com sintomas de sarna, na Colômbia. No Brasil, Medeiros (2015) e Souza (2017) identificaram como *Neopestalotiopsis* sp. os isolados coletados em ingazeiro e goiabeira, respectivamente. Porém, nenhuma dessas sequências apresentam características genéticas iguais as dos isolados identificados no presente estudo.

No coqueiro, muitas espécies pertencentes ao complexo Pestalotioid já foram relatadas em países do continente asiático, como: *Pestalotiopsis meneziana* (China), *P. palmarum* (Índia), *Neopestalotiopsis* sp., *N. piceana*, *N. javaensis* (Indonésia) e *N. cocoes* (Tailândia) (MAHACHCHIKUMBURA et al., 2014; NIU et al., 2015; HYDE et al., 2016). Nesses países a doença é conhecida como ferrugem do coqueiro e possui a mesma sintomatologia da doença mancha de pestalotia do coqueiro (como é conhecida no Brasil) sendo possível que se trate da mesma doença. Além disso, outra evidência é que as duas doenças são causadas por membros do complexo Pestalotioid.

No Brasil, A mancha de pestalotia do coqueiro foi inicialmente relatada por Anjos; Charchar; Ramos (2000), no Distrito Federal, onde os sintomas foram caracterizados como manchas irregulares de tamanhos variados nas folhas, com coloração castanho escuro no centro das lesões que são circundadas por um halo amarelo. Além disso, identificaram *Pestalotiopsis guepinii* como agente etiológico da doença. Posteriormente, a doença foi observada por Cardoso et al. (2003), no estado Paraíba, onde o agente causal foi identificado como *Pestalotiopsis* sp. mas, segundo os autores, as características morfológicas do isolado eram similares as da espécie *P. guepinii*.

No entanto, a identificação desses isolados baseou-se apenas em dados morfológicos, o que pode ter gerado erros na identificação. Além disso, são utilizados atualmente análises moleculares e morfológicas, que têm propiciado novas alterações taxonômicas dentro do que hoje conhecemos como complexo Pestalotioid (NAG RAJ, 1993; JEEWON et al., 2003; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014). Complexo este, proposto por Maharachchikumbura et al. (2014), que ao combinar dados morfológicos e moleculares, contribuíram para uma grande revisão dos táxons tipo de *Pestalotiopsis* e estabeleceram dois novos gêneros, *Neopestalotiopsis* e *Pseudopestalotiopsis*. Mesmo com a existência de

similaridade morfológica entre espécies dos gêneros, essa separação de espécies só foi possível por meio de sequenciamento de DNA, através da combinação de regiões multilocus. (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2016; CHEN et al., 2018; SOLARTE et al., 2018).

Em relação as análises morfológicas as espécies *N. foedans* e *N. ellipospora* apresentaram características compatíveis com as descritas para as espécies (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2012; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2016b; SOLARTE et al., 2018). As colônias, mesmo com variações de coloração e crescimento, se mantiveram dentro dos padrões sugeridos para o gênero *Neopestalotiopsis* (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014; JAYAWARDENA et al., 2014; SOLARTE et al., 2018). Jeewon et al. (2003), Tejesvi et al. (2007) e Maharachchikumbura et al. (2011) sugerem que as características morfológicas da colônia são variáveis e não padronizadas.

*Neopestalotiopsis* sp. apresentou comprimento e largura de conídios dentro dos limites descritos para o gênero, porém as características das colônias não são compatíveis com os descritos para o gênero (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014; 2016; JAYAWARDENA et al., 2014; SOLARTE et al., 2018), sugerindo que pode se tratar de uma coloração rara dentro de *Neopestalotiopsis*. Situação semelhante foi observada para a espécie *Pestalotiopsis rosea*, que apresentou coloração da colônia avermelhada (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2012).

Como podemos observar, as espécies *N. foedans* e *N. ellipospora*, não são muito comuns fora do continente asiático, pois a maioria dos hospedeiros onde foram relatadas são desse continente. Com exceção dos hospedeiros *T. occidentalis*, nos Estados Unidos (MAHARACHCHICUMBURA et al., 2014), e em frutos da goiabeira, na Colômbia (SOLARTE et al., 2018), ambos identificados como *N. foedans*. Isso nos sugere que esses táxons tenham sua origem geográfica naquele continente, ou então, os levantamentos e amostragens voltadas para fungos deste complexo, ainda não são tão eficientes em outros continentes.

As espécies do complexo Pestalotioid são importantes como fitopatógenos (MAHARACHCHIKUMBURA et al. 2012). Muitas espécies foram nomeadas de acordo com sua associação com o hospedeiro e apenas um pequeno número de caracteres está disponível para distingui-los de forma confiável (MAHARACHCHIKUMBURA et al. 2011; MAHARACHCHIKUMBURA et al. 2013). Portanto, a identificação correta dos fungos fitopatogênicos do complexo Pestalotioid é relevante para os fitopatologistas e agricultores, uma vez que, traz novos conhecimentos sobre a epidemiologia e interação fungo-planta, além de representar importante ferramenta no controle eficaz dos fitopatógenos.

Nossas descobertas representam uma importante contribuição para a etiologia e epidemiologia da mancha de pestalotia do coqueiro no Brasil, pois nós fornecemos evidências para a diversidade de espécies associados a doença, além disso, nosso estudo facilita o desenvolvimento de futuras pesquisas epidemiológicas em coqueiro e oferece informações relevantes para o desenvolvimento de estratégias para os programas de manejo de doenças. Por fim, outras espécies podem está associadas a mancha de pestalotia do coqueiro, para isso é necessário uma amostragem maior.

#### **4.4 Conclusões**

- Este é o primeiro relato do gênero *Neopestalotiopsis* causando mancha de pestalotia do coqueiro no Brasil.

- Este é o primeiro relato das espécies *N. foedans*, *N. ellipospora* e *Neospestaltiopsis* sp. associadas a mancha de pestalotia do coqueiro.

## REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5ed. Academic Press. 2005. 922p.

ANJOS, J.R.N.; CHACHAR, M. J. A.; RAMOS, V. H. V. Mancha foliar causada por *Pestalotiopsis guepinii*. em coqueiro no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 121-215, 2000.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**. v.215, p.403-410, 1990.

CARDOSO, G. D. et al. Etiologia e progresso da mancha de pestalotia do coqueiro (*Cocos nucifera* L.), em São Gonçalo, Paraíba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, n.2, p.335-336, 2003.

CHEN, Y. et al. *Pestalotiopsis*-Like Species Causing Gray Blight Disease on *Camellia sinensis* in China. **Plant Disease**, v.102, n.1, p.98-106, 2018.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.

DUIN, I. M. et al. Etiologia e possíveis fontes de inóculo para a ocorrência da podridão de miniestacas de acácia-negra. **Summa Phytopathologica**, v.43, n.4, p.297-302, 2017.

EDGAR R.C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **BMC Bioinformatics**, v.5, p.1–19, 2004.

FAOSTAT. (2016). Food and Agriculture Organization of the United Nations. **World Production**. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/342/default.aspx>. Acesso em: 10 dez. 2018.

FARR, D. F.; ROSSMAN, A.Y. Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Disponível em: <https://nt.ars-grin.gov/fungalatabases>. Acesso em: 07 jan. 2019.

FONTES, H. R.; WANDERLEY, M. **Situação atual e perspectivas para a cultura do coqueiro no Brasil**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. 16 p. (Documentos, 94).

HOPKINS, K. E.; MCQUILKEN, M. P. Characteristic of *Pestalotiopsis* associated with hardy ornamental plants in the UK. **European Journal of Plant Pathology**. v.106, p.77–85, 2000.

HYDE, K. D. et al. One stop shop: backbone trees for important phytopathogenic genera: I. **Fungal Diversity**, v. 67, p. 21–125, 2014.

HYDE, K. D. et al. Fungal diversity notes 367–490: taxonomic and phylogenetic contributions to fungal taxa. **Fungal Diversity**, v.80, p.1-270, 2016.

IBGE. (2017). **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Disponível em: <http://www2.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?z=t&o=1&i=P&c=1618>. Acesso em: 11 dez. 2018.

ISMAIL, S. I. et al. First Report of *Neopestalotiopsis saprophytica* Causing Leaf Spot of Oil Palm (*Elaeis guineensis*) in Malaysia. **Plant Disease**. v.101, n.10, p. 1821, 2017.

JAYAWARDENA, R. S. et al. Identification and characterization of *Pestalotiopsis*-likefungi related to grapevine diseases in China. **Fungal Biology**, v.119, n. 5, p. 348–361, 2014.

JAYAWARDENA, R. S. et al. *Neopestalotiopsis vitis* sp. nov., causing grapevine leaf spot in China. **Phytotaxa**, v.258, p.63-74, 2016.

JEEWON, R. et al. Phylogenetic significance of morphological characters in the taxonomy of *Pestalotiopsis* species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.27, p.372-383, 2003.

JESUS-JUNIOR, L. A. et al. Análise da produção do coco no Brasil, Nordeste e Sergipe. **Proceeding of ISTI**, v.3, n.1, p. 317-324, 2015.

LEITE, I. C. H. L. et al. Caracterização morfológica e filogenética de *Neopestalotiopsis* e *Pseudopestalotiopsis* causando doenças em jambo no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 50, 2017, Uberlândia, **Anais...** Brasília-DF: SBF, 2017.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N. et al. *Pestalotiopsis*-morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. **Fungal Diversity**, v.50, n.1, p.167-187, 2011.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N. et al. A multi-locus backbone tree for *Pestalotiopsis*, with a polyphasic characterization of 14 new species. **Fungal Diversity**, v.56, p. 95-129, 2012.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N. et al. *Pestalotiopsis anacardiacearum* sp. nov. (Amphisphaeriaceae) has an intricate relationship with *Penicillaria jocosatrix* the mango tip borer. **Phytotaxa**, v.99, p.49-57, 2013.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N. et al. *Pestalotiopsis* revisited. **Studies in Mycology**, v. 79, p. 121– 186, 2014.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N. et al. Characterization of *Neopestalotiopsis*, *Pestalotiopsis* and *Truncatella* species associated with grapevine trunk diseases in France. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 55, n. 3, p. 380-390, 2016a.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N. et al. First report of sweet potato leaf spot caused by *Neopestalotiopsis ellipsospora* in Guizhou province, China. **Journal of Plant Pathology**, v.98, n.3, p.677-697, 2016b.

MEDEIROS, P. S. Caracterização de fungos associados à vegetação de Mata Atlântica do Estado do Rio de Janeiro e alguns fungos endofíticos “dark septate” provenientes de Roraima, RR. 2015. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro: Seropédica-RJ, 2015, 161p.

MILLER, M.; PFEIFFER, W; SCHWARTZ, T. *Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees*. **Gatew. Comput. Environ**, p.1–8, 2010.

NAG RAJ, T. R. **Coelomycetous anamorphs with appendage bearing conidia**. Waterloo: Mycologue publications, 1993.

NIU, X.-Q. et al. First Report of *Pestalotiopsis menezesiana* Causing Leaf Blight of Coconut in Hainan, China. **Plant Disease**. v.99, n.4, p.554, 2015.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.7, p.103–116, 1997.

POSADA, D.; BUCKLEY, T. R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. **Systematic Biology**, v.53, p.793-808, 2004.

QUADROS, A. F. F. et al. Diversidade genética de fungos da família Amphisphaeriaceae na palma de óleo. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 19.; SEMINÁRIO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, 3., 2015, Belém-PA. **Anais...** Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2015.

REHNER, S. A. Primers for elongation factor 1-alpha (EF1-alpha). <https://web.archive.org/web/20080514151555/http://ocid.nacse.org/research/deephyphae/EF1primer.pdf>, 2001.

RONQUIST, F. et al. MrBayes v. 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**. v.61, p.539-542, 2012.

SACCARDO, P. A. Fungi boreali-americi. **Michelia**. v.2, n.8, p.564-582, 1882.

SILVA, J. M. et al. Evaluation of dwarf coconut (*Cocos nucifera* L.) germplasm to the damage intensity caused by foliar diseases. **Australian Journal Crop Science**. v.11, n. 10, p.1374-1380, 2017.

SILVÉRIO, M. L. et al. A new epifoliar species of *Neopestalotiopsis* from Brazil. **Agrotropica**, v.28, n.2, p.151-158, 2016.

SOLARTE, F. et al. Diversity of *Neopestalotiopsis* and *Pestalotiopsis* spp., Causal Agents of Guava Scab in Colombia. **Plant Disease**. v.102, p.49-59, 2018.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, p.2725-2729, 2013.

TEJESVI, M. V. et al. Genetic diversity and antifungal activity of species of *Pestalotiopsis* isolated as endophytes from medicinal plants. **Fungal Diversity**, v.24, p.37-54, 2007.

SOUZA, L. N. Complexo Pestalotioid associado a doenças em mangueiras e goiabeiras: abordagem filogenética e patogênica. 2017. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, São Paulo, 2017.

URBEZ-TORRES, J. R. et al. Characterization of fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Arkansas and Missouri. **Fungal Diversity**, v.52, n.1, p.169-189, 2012.

WHITE T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: **PCR - Protocols and Applications: A Laboratory Manual**, Academic Press, p.315–322, 1990.

YUN, Y. H.; AHN, G. R.; KIM, S. H. First Report and Characterization of *Pestalotiopsis ellipospora* Causing Canker on *Acanthopanax divaricatus*. **Mycobiology**, v.43, n.3, p.366-370, 2015.