



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CARIRI
FACULDADE DE MEDICINA - FAMED
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

DAYANNA MILCA SANTOS DE SOUZA

**ESPÉCIES DE BOTRYOSPHAERACEAE ASSOCIADAS À
PODRIDÃO EM SERIGUELA**

BARBALHA – CE

2022

DAYANNA MILCA SANTOS DE SOUZA

**ESPÉCIES DE BOTRYOSPHAERiaceae ASSOCIADAS À
PODRIDÃO EM SERIGUELA**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Cariri – UFCA, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Kamila Câmara Correia

Coorientadora: Dra. Ana Paula Oliveira Barros

BARBALHA – CE

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação.
Universidade Federal do Cariri.
Sistema de Bibliotecas

S729e Souza, Dayanna Milca Santos de.
Espécies de botryosphaeriaceae associadas à podridão em seriguela / Dayanna Milca Santos de Souza. – 2022.
52 f.: il. color.30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Cariri, Faculdade de Medicina da UFCA - FAMED, Programa Multicêntrico de Pós- graduação em Bioquímica e Biologia molecular – PMBqBM, Barbalha, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Kamila Câmara Correia.

Coorientação: Dra. Ana Paula Oliveira Barros

1. Resinose.
2. *Cophinforma*.
3. *Diplodia*.
4. *Resistência bacteriana*.
5. *Pseudofusicoccum*.
6. *Lasiodiplodia* sp I. Título.

CDD 632

Bibliotecária: Glacínésia Leal Mendonça
CRB 3/925

DAYANNA MILCA SANTOS DE SOUZA

**ESPÉCIES DE BOTRYOSPHAERIACEAE ASSOCIADAS À
PODRIDÃO EM SERIGUELA**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Cariri – UFCA, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Aprovada: 28/02/2022

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Kamila Câmara Correia (Orientadora)

Prof. Dr. Francisco Nascimento Pereira Junior (UFCA)

Dra. Eliane Mayumi Inokuti (UFC)

Profa. Dra. Alice Maria Gonçalves Santos (UFPI)

AGRADECIMENTOS

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnologia pelo apoio financeiro (Processo nº BMD-0008-01092.01.09/20).

RESUMO

A podridão peduncular é uma das principais doenças que comprometem a comercialização da seriguela. Essa doença é comumente associada a *Lasiodiplodia theobromae*, porém, estudos relatam outras espécies de Botryosphaeriaceae associados a esse sintoma em outras frutas. O objetivo dessa pesquisa foi identificar as espécies de Botryosphaeriaceae associadas a podridão de frutos em seriguela nos Estados de Pernambuco e Ceará. Foram coletados frutos de seriguelas em quintais produtivos e pequenas propriedades rurais nos dois Estados. Os frutos foram desinfestados superficialmente e colocados em câmara úmida em condições de laboratório até o aparecimento do sintoma de podridão. Os frutos com sintomas foram submetidos ao processo de isolamento. Em seguida foi realizado o teste de patogenicidade dos isolados fúngicos obtidos em frutos de seriguela maduros e sem sintomas de doenças. Os isolados patogênicos foram submetidos a extração e amplificação do DNA genômico da região ITS e dos genes EF1- α e TUB. As sequências dos 79 isolados representativos foram comparadas com sequências de referência de espécies fúngica da família Botryosphaeriaceae. Os isolados se agruparam em clados com espécies de diferentes gêneros de Botryosphaeriaceae. A maioria dos isolados pertencem ao gênero *Lasiodiplodia* e *L. iraniensis* é a espécie de Botryosphaeriaceae com maior frequência associada a podridão peduncular dos frutos de seriguela nos Estados de Pernambuco e Ceará. Associada a essa podridão também foi encontrado a espécie *Diplodia eriobotryicola*, sendo o primeiro relato no Brasil dessa espécie.

Palavras-chave: Podridão pós-colheita, *Spondia purpúrea*, *Cophinforma*, *Pseudofusicoccum*.

ABSTRACT

The peduncular rot is one of the main diseases that compromise the commercialization of seriguela. This disease is commonly associated with *Lasiodiplodia theobromae*, however, studies report other species of Botryosphaeriaceae associated with this symptom in other fruits. The objective of this research was to identify Botryosphaeriaceae species associated with fruit rot in seriguela in the states of Pernambuco and Ceará. Seriguela fruits were collected in productive backyards and small rural properties in both states. The fruits were superficially disinfected and placed in a humid chamber under laboratory conditions until the appearance of rot symptoms. The fruits with symptoms were submitted to the isolation process. Then, the pathogenicity test of the fungal isolates obtained from ripe seriguela fruits without disease symptoms was performed. The pathogenic isolates were subjected to extraction and amplification of genomic DNA from the ITS region and from the EF1- α and TUB genes. The sequences of the 79 representative isolates were compared with reference sequences from fungal species of the Botryosphaeriaceae family. The isolates were grouped in clades with species of different genera of Botryosphaeriaceae. Most of the isolates belong to the genus *Lasiodiplodia* and *L. iraniensis* is the Botryosphaeriaceae species most frequently associated with peduncular rot of seriguela fruits in the states of Pernambuco and Ceará. The species *Diplodia eriobotryicola* was also found associated with this rot, being the first report of this species in Brazil.

Keywords: Post-harvest rot, *Spondia purpúrea*, *Cophinforma*, *Pseudofusicoccum*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Frutos da seriguela com sintomas de podridão	17
Figura 2 - Frutos utilizados como testemunha no teste de patogenicidade.....	27
Figura 3- Colonia fúngica com características culturais de espécies Botryosphaeriaceae. Isolado CFC1195	29
Figura 4 - Frutos utilizados no teste de patogenicidade apresentando sintomas induzidos por espécies de Botryosphaeriaceae.....	36
Figura 5 - Árvore de máxima verossimilhança de espécies de Botryosphaeriaceae associadas a podridão em seriguela	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Isolados de Botryosphaeriaceae usados neste estudo	31
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ágar-Água
ADE	Água Destilada Esterilizada
BDA	Batata-Dextrose-Ágar
CCAB	Centro de ciências Agrárias e da Biodiversidade
CEASA/PE	Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco
CFC	Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos do Cariri
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
Fiec	Centro Internacional de Negócios da Federação das Indústrias do Ceará
ITS	Espaçador Transcrito Interno
LABCEN/CCB	Laboratório Central do Centro de Biotecnologias
LSU	Subunidade maior do ribossomo
ML	Máxima Verossimilhança
NaOCl	Hipoclorito de Sódio
NCBI	National Center of Biotechnological Information
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RPB2	RNA polimerase subunidade II
SindiAlimentos	Sindicato das Indústrias da Alimentação e Rações Balanceadas do Estado do Ceará
SNPs	Polimorfismos de Nucleotídeo Único
SST/ATT	Teor de Sólido Solúvel/Acidez Titulável
SSU	Subunidade menor do ribossomo
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
EF-1- α	Fator de Elongação da Tradução 1- α
TUB	β -tubulina
UFCA	Universidade Federal do Cariri

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1	A cultura de seriguela	14
2.2	Importância da Seriguela para o Nordeste e Região do Cariri	15
2.3	Doenças associadas à seriguela	17
2.4	Família Botryosphaeriaceae.....	19
2.5	Espécies de Botryosphaeriaceae associadas a podridão	21
2.6	Identificação molecular de espécies de Botryosphaeriaceae	22
3	OBJETIVOS.....	25
3.1	Objetivo geral	25
3.2	Objetivos específicos	25
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1	Obtenção das amostras	26
4.2	Obtenção dos isolados	26
4.3	Teste de patogenicidade.....	27
4.4	Obtenção de cultura pura e preservação dos isolados	28
4.5	Extração e amplificação do DNA genômico.....	28
4.6	Análise filogenética.....	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
6	CONCLUSÕES	43
7	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

No Brasil é possível encontrar uma ampla variedade de frutos tropicais, nativos e exóticos que oferecem muitas possibilidades de exploração econômica, especialmente para as regiões Norte e Nordeste do país (MOREIRA, 2011). Espécies do gênero *Spondias* são encontradas principalmente na região semiárida, onde seus frutos são bastante apreciados por parte da população (SOUZA, 2005), representando uma excelente opção econômica (SOARES, 2011).

O período de colheita da seriguela no Nordeste do Brasil inicia próximo ao mês de dezembro e finalizando durante o mês de fevereiro. Nesse intervalo temporal são gerados empregos informais que vai desde da colheita até a comercialização desse fruto (PINTO, 1997; SOUSA; 1998). Apesar da ausência de dados oficiais sobre a comercialização precisa desta fruta, Lederman *et al.* (2008) mencionaram que nos anos de 2000 a 2006 foi comercializada cerca de 585 toneladas na Central de Abastecimento do Estado de Pernambuco e que parte dos frutos de seriguela foram proveniente do estado do Ceará.

O Cariri cearense já foi considerado o principal produtor de *Spondia purpurea* L. (seriguela), do país, porém, são muitas as dificuldades que os produtores encontram na exploração dessa cultura na região. Entre os principais problemas identificados pelos produtores está a falta de suporte técnico e a ocorrência de doenças (LEITE, 2009).

Mesmo não sendo uma cultura explorada na forma de pomares comerciais, várias enfermidades como antracnose, verrugose, cercoporiose, entre outras já foram detectadas em seriguela (COUTINHO *et al.*, 2017; FREIRE; CARDOSO, 1997; FREIRE; SANTOS, 2001). A resinose, doença causada por espécies de Botryosphaeriaceae é uma das principais doenças dessa cultura. No Ceará, a doença foi associada a espécies do gênero *Lasiodiplodia* (FREIRE; CARDOSO, 1997; COUTINHO *et al.*, 2016). Tais espécies possuem a capacidade de provocar diversos sintomas nas plantas afetadas, incluindo principalmente seca (*die-back*), cancro em ramos, caules e raízes, podridões em estacas, folhas, frutos e sementes, além de incitar a morte de mudas e enxertos. (FREIRE *et al.*, 2004; FREIRE *et al.*, 2011).

Outra doença associada à seriguela e que compromete bastante a comercialização é a podridão peduncular. Essa doença é comum em frutas tropicais, com sintomas ocorrendo principalmente após a colheita. A podridão peduncular provoca no fruto áreas com tecido encharcado, que tem início no pedúnculo do fruto e se expande para o resto

do mesmo, gerando um aspecto mole e odor desagradável, tornando-o impróprio para o consumo e/ou comercialização. A doença é comumente associada a *Lasiodiplodia theobromae*, no entanto estudos recentes em diversas fruteiras têm relatado outras espécies da família Botryosphaeriaceae associados a essa doença (FREIRE *et al.*, 2004; MARQUES *et al.*, 2013a, b; NETTO *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 A cultura da seriguela

A seriguela (*Spondias purpurea* L.) faz parte do gênero *Spondias*, pertencente à família *Anacardiaceae*, que compreende aproximadamente 75 gêneros e 600 diferentes espécies. No território brasileiro é possível encontrar o cultivo de seis espécies de *Spondias*, que são o umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Camara), a seriguela, o cajá (*Spondias mombin* L.), o umbu-cajá (*Spondias* sp.), cajá-manga (*Spondias cytherea* Sonn) e umbuguela (*Spondias* sp.) (SANTOS; OLIVEIRA, 2008; PELL *et al.*, 2011).

Nativa das florestas tropicais semiáridas da Mesoamérica, a serigueleira é uma árvore frutífera, também conhecida como: ciriguela, ciruela mexicana, jacote e ameixa de porco. É consumida fresca e vendida em mercados locais e transformados em outros subprodutos, como polpas e compotas (AVITIA-GARCÍA, 1997; BICAS *et al.*, 2011; COCKRELL, 2000; MILLER; SCHAAL, 2005).

É cultivada em algumas regiões da América do Norte, Índia e América do Sul (AUGUSTO *et al.*, 2000; MACÍA; BARFOD, 2000). No Brasil, encontra-se distribuída pelos Estados do Nordeste, sendo cultivada também em Minas Gerais, Rio de Janeiro, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Espírito Santo (CEVA-ANTUNES *et al.*, 2006; OMENA *et al.*, 2012). De acordo com o estudo de Miller e Knouft (2006), que pesquisaram acerca da distribuição geográfica das populações selvagens e cultivadas de seriguela, as populações cultivadas são encontradas principalmente em ambiente agrícola, quintais e pequenas fazendas.

A árvore apresenta porte médio, podendo atingir cerca de sete metros. Seu fruto é uma drupa elipsoidal, com polpa aromática de sabor doce, com grande variedade de cores, destacando-se principalmente a cor vermelha e amarela, quando maduras. O comprimento do fruto varia de 2,5 a 5 centímetros. Suas folhas são intermarginais, imparipinadas e

compostas com uma bainha. Apresenta flores pequenas com cores variadas (MARISCO; PUNGARTNIK, 2015; MILLER; KNOUFT, 2006; POPENOE, 1979).

Durante a maturação, fase que inicia a pigmentação da cor amarela, apresenta os melhores valores em relação à massa, volume, comprimento e diâmetro da fruta (FREIRE *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2003a; MARTINS *et al.*, 2003b). Quando maduro possui cerca de 7% de açúcares redutores, 1% de amido, a polpa obtida apresenta o rendimento médio de 70%, 21° Brix, 0,7% de acidez titulável (expressa em ácido cítrico), seu índice de maturação (SST/ATT) é de 34 e pH 3,5 (SANTOS *et al.*, 2011). O fruto apresenta uma intensa atividade respiratória que limita sua vida útil em 140 horas após a colheita. Entretanto, essa estimativa varia de acordo com as condições do ambiente em que são cultivadas (SAMPAIO; BORA; HOLSDUCH, 2008).

Apesar da seriguela ser a espécie de *Spondias* que apresenta maior apreciação pela população, sua produção não é contabilizada nos dados oficiais dos municípios e estados produtores, pois são exploradas de forma extrativista ou em pomares domésticos. Porém, a cultura apresenta elevada importância econômica, principalmente, para a região Nordeste do Brasil, onde são utilizadas para a produção de polpas, sucos, geleias e bebidas alcoólicas e comercializadas *in natura* (KOZIOL; MACÍA, 1998; SANTOS-SEREJO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2011).

O seu cultivo representa uma cultura alternativa e pode ser utilizada para diversificar a produção hortícola e aumentar a produtividade em regiões com solo fraco estes possuem fragilidade estrutural, baixa fertilidade e capacidade de retenção de água. No entanto, são necessários estudos sobre fisiologia da planta e tecnologia de cultivo para atingir melhores características comerciais, como suas propriedades nutricionais e sensoriais (MALDONADO-ASTUDILLO *et al.*, 2014).

2.2 Importância da Seriguela para o Nordeste e Região do Cariri

A diversidade climática do Brasil facilita o avanço da fruticultura, que contribui de forma significativa para o desenvolvimento da economia agrícola do País. Sua prática se estende a todas as regiões brasileiras, tornando-se socioeconomicamente rentável (FACHINELLO *et al.*, 2011; COUTINHO, 2016). Por meio dos polos irrigados, o Nordeste brasileiro se tornou a principal região exportadora de frutas tropicais frescas. Os principais cultivos são de mangueiras (*Mangifera indica* L.), videiras (*Vitis* spp.), bananeiras (*Musa* spp.), cajueiros (*Anacardium occidentale* L.), citros (*Citrus* spp.),

coqueiros (*Cocos nucifera* L.), goiabeiras (*Psidium guajava* L.), aceroleiras (*Malpighia glabra* DC.), meloeiros (*Cucumis melo* L.), entre outras fruteiras (LOPES; OLIVEIRA; SARMENTO, 2016).

A demanda por frutas no mundo continuou em alta nos quatro primeiros meses de 2021. Como resultado, a exportação de frutas realizada pelo Brasil foi 20% maior que o mesmo período de 2020. Com isso, obteve-se com a exportação o faturamento de US\$ 323,7 milhões, e a maioria das frutas tropicais exportadas são oriundas de cultivos localizados na região Nordeste (MAIA, 2020; VIDAL, 2021).

De acordo com o Enfoque Econômico (nº224) publicado pelo Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Ceará a produção de frutas em 2019 no estado foi de quase 1,5 bilhões de reais, que corresponde a 51,09% da produção do referido ano.

Apesar dos altos números de área cultivada com produção de frutas economicamente importantes, no Nordeste, existe o cultivo de outras frutas tropicais em baixa escala. Esses cultivos de frutos em baixa escala se enquadra no termo *Minor Crops*, conhecida no Brasil como cultura de suporte fitossanitário insuficiente, o baixo suporte fitossanitário engloba a falta ou o pouco número de agroquímicos registrados para o manejo de pragas das culturas, dificultando a produção em grande escala (SOUZA, 2019). Por esse motivo, esses cultivos não são contabilizados nas estatísticas oficiais. Normalmente são culturas típicas e endêmicas, cultivadas principalmente em quintais e pequenos pomares domésticos. No entanto, algumas delas merecem destaque como as espécies de *Spondias*, cajá; umbu e seriguela (COUTINHO, 2016).

O Instituto Frutal realizou uma pesquisa sobre a seriguela nos municípios do Cariri cearense, por considerar que essa fruta tem grande potencial econômico. Segundo os dados obtidos, um hectare plantado com 445 pés tem a capacidade de gerar aproximadamente 6 mil reais por ano (VIANA, 2010).

O Cariri cearense já foi a maior região produtora de seriguela, com produtividade média de aproximadamente 180 kg de frutos por planta por safra, correspondendo a um total de 18 a 21,6 toneladas por ha por ano (FILGUEIRAS, 2001). Nos municípios de Crato, Barbalha, Brejo Santo e Missão Velha, já ocorrem plantios informais de seriguela que abastecem todo Nordeste, com maior produção nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro (FILGUEIRAS, 2001; AMÂNCIO, 2016). Atualmente são encontradas plantas produzindo em diversos locais na região do Cariri. Porém a produção é caracterizada, em sua grande maioria, por frutos com desvios acentuados na forma característica do fruto, lesões de origens diversas e com má aparência (FIGURA 1).

Figura 1- Frutos da seriguela com sintomas de podridão.



Fonte: Elaborada pelos autores (2020)

A produção de polpa desse fruto pode se tornar bastante rentável, pois o Ceará vem aumentando a exportação de polpa de frutas. Segundo o Sindicato das Indústrias da Alimentação e Rações Balanceadas do Estado do Ceará (SindiAlimentos), com base nos dados do Centro Internacional de Negócios da Federação das Indústrias do Ceará (Fiec), a exportação das polpas de frutas no período de janeiro a agosto de 2020 chegou a US\$ 779,45 mil (FCDL, 2021).

Uma das dificuldades de ampliação da comercialização da seriguela *in natura* é sua alta perecibilidade e baixa resistência a patógenos. Com o intuito de aumentar o rendimento, 80% da sua produção é transformada em polpa. Porém, desde 2010 cerca de 50% da seriguela produzida no Ceará é descartada por apresentarem sintomas de podridão pós-colheita (VIANA, 2010).

2.3 Doenças associadas à seriguela

Mais de dez espécies de fungos já foram relatadas causando doenças na seriguela. Dentre as patologias tem-se: a antracnose provocada por *Colletotrichum gloesporioides* (Penz. Sacc.), a verrugose causada por *Sphaceloma spondiadis* Bit. & Jenkins, podridão peduncular e resinose causadas principalmente por *Lasiodiplodia* spp., a cercosporiose ocasionada por *Pseudocercospora mombin* Petr. & Cif. e, a mancha-de-alga causada por

Cephaleuros virescens Kuntze (COUTINHO *et al.*, 2017; FREIRE; CARDOSO, 1997; FREIRE; SANTOS, 2001; FARR; ROSSMAN, 2022).

Freire e Filgueira (2000) destacaram que a resinose é a doença mais importante da cultura causada pelo o fungo *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl, pertencente a família Botryosphaeriaceae. A doença é caracterizada pelo aparecimento de manchas escuras, rachadura e intumescência da casca, as quais evoluem para lesões maiores no tronco e ramos lenhosos com exsudação de uma goma. Esse fato ocorre principalmente em plantas submetidas a algum tipo de estresse (ALVES *et al.*, 2015; CARDOSO; VIANA; MARTINS, 2018).

Outra doença associada à seriguela e que compromete bastante a comercialização é a podridão peduncular, com manifestação ocorrendo no término do período climatérico. É uma doença pós-colheita comum em frutas tropicais, sendo comumente associada a fungos pertencente ao gênero *Lasiodiplodia* (FREIRE *et al.*, 2004; MARQUES *et al.*, 2013; NETTO *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2013). A podridão peduncular provoca no fruto áreas com tecido encharcado, que tem início no pedúnculo do fruto e se expande para o resto do fruto, gerando um aspecto mole e odor desagradável. Ocorre necrose abaixo da cutícula que pode atingir a polpa. Quando essa doença é causada por espécies de *Lasiodiplodia*, apresenta rachadura na casca com exposição da polpa mole e aquosa (BATISTA *et al.*, 2017; TERAQ; BATISTA; RIBEIRO, 2016). Em estudo sobre as espécies de *Lasiodiplodia* associadas a seriguela no Nordeste do Brasil, foi observado que, além *L. theobromae*, outras espécies do gênero estão associadas a cultura: *Lasiodiplodia brasiliense* M.S.B. Netto, M.W. Marques & A.J.L. Phillips, *Lasiodiplodia caatinguensis* I.B.L. Coutinho & F.C.O Freire, *Lasiodiplodia pontae* F.C.O Freire & I.B.L Coutinho, *Lasiodiplodia pseudotheobromae* A.J.L. Phillips, A. Alves & Crous (COUTINHO *et al.*, 2017).

Além do gênero *Lasiodiplodia*, os gêneros *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Pseudofusicoccum* entre outros da família Botryosphaeriaceae, estão associados à podridão peduncular em fruteiras tropicais no Brasil. Entretanto, nas regiões subtropicais e tropicais há maior distribuição do gênero *Lasiodiplodia* (COUTINHO *et al.*, 2016; MARQUES *et al.*, 2012; MARQUES *et al.*, 2013; NETTO *et al.*, 2014). Não existe relatos de outros gêneros de Botryosphaeriaceae associados a seriguela, apenas *Lasiodiplodia*.

2.4 Família Botryosphaeriaceae

De acordo com a taxonomia dos fungos, a família Botryosphaeriaceae pertence ao domínio Eucaryota, do Reino Fungi, dentro do filo Ascomycota e sua ordem é Botryosphaeriales (Dothideomycetes). Constitui um complexo de espécie morfológicamente idêntica ou parecida, mas que possuem trajetória evolutiva e aspectos genéticos distintos, com isso são denominadas de espécies crípticas (BICKFORD *et al.*, 2006; PHILLIPS *et al.*, 2013; SCHOCH *et al.*, 2006; SLIPPERS *et al.*, 2014).

Os fungos dessa família apresentam reprodução assexuada e sexuada, entretanto, essa última forma é raramente encontrada. Desse modo, sua taxonomia é baseada nas características das formas assexuadas (JACOBS; REHNER, 1998; PHILLIPS *et al.*, 2013). No estado sexual sua identificação ocorre baseada nas características dos ascos e ascóporos. Já na fase assexuada é com base nas características dos picnídios. Os aspectos morfológicos que possibilitam a caracterização das Botryosphaeriaceae incluem a largura, extensão, septação, espessura da parede e coloração dos picnidiósporos, se possuem ou não paráfises e células conidiogênicas (CROUS *et al.*, 2006; PHILLIPS *et al.*, 2013; SCHOCH *et al.*, 2006).

Em 2013, Phillips *et al.* forneceram descrições, notas e filogenias abrangentes para os 17 gêneros conhecidos até então: *Lasiodipodia* spp., *Barriopsis* spp., *Botryosphaeria* spp., *Botryobambusa* spp., *Cophinforma* spp., *Diplodia* spp., *Dothiorella* spp., *Neodeightonia* spp., *Macrophomina* spp., *Phaeobotryon* spp., *Sphaeropsis* spp., *Tiarosporella* spp., *Neoscytalidium* spp., *Neofusicoccum* spp., *Spencermartinsia* spp., *Endomelanconiopsis* spp. e *Pseudofusicoccum* spp.. Esses gêneros compreendiam cerca de 110 espécies conhecidas.

Dissanayake *et al.* (2016) publicaram em sua pesquisa intitulada “Botryosphaeriaceae: Current status of genera and species” (Botryosphaeriaceae: estado atual de gêneros e espécies) uma lista atualizada de todos os gêneros e espécies conhecidas na família Botryosphaeriaceae e incluíram novos táxons e mudanças taxonômicas. Eles consideraram que a família continha 23 gêneros. Porém, esses dados sofreram uma nova revisão recentemente. De acordo com Zhang *et al.* (2021), com base em sequenciamento de DNA e análise filogenéticas, a família Botryosphaeriaceae possui 33 gêneros. Este estudo reconheceu oito novas espécies e reduziu 58 espécies à sinonímia com táxons existentes distribuídos em nove gêneros. As análises filogenéticas desse trabalho incluíram os seguintes gêneros: *Botryosphaeria* spp., *Diplodia* spp., *Dothiorella* spp., *Lasiodiplodia* spp., *Neofusicoccum* spp., *Neoscytalidium* spp., *Phaeobotryon* spp., *Barriopsis* spp., *Sphaeropsis* spp., *Alanphillipsia* spp. e *Oblongocollomyces* spp.,

Pseudofusicoccum spp. e *Saccharata* spp. As novas espécies foram incluídas ao gênero *Botryosphaeria* (uma espécie), *Diplodia* (uma espécie), *Dothiorella* (uma espécie), *Lasiodiplodia* (uma espécie), *Neofusicoccum* (duas espécies), *Phaeobotryon* (uma espécie) e *Saccharata* (duas espécies).

Os fungos dessa família são conhecidos como patógenos, endófitos ou sapróbios. Podem ser encontrados nas mais distintas áreas geográficas, exceto nas regiões polares (PHILLIPS *et al.*, 2013). A infecção por esses fitopatógenos ocorre inicialmente pelo transporte dos esporos sexuais e assexuais, que chegam até a planta por meio de água, do vento, entre outros agentes de disseminação. A partir dos esporos há o processo de colonização do hospedeiro, que ocorre principalmente por aberturas naturais ou ferimentos nas folhas, caules ou ramos (MEHL *et al.*, 2013a; SLIPPERS; SWART *et al.*, 1987; WINGFIELD, 2007).

Quando se encontram na forma endofítica convivem de forma harmônica, apenas sob situação de estresse podem se tornar patogênicos. Assim, passam despercebidos tornando-se uma ameaça silenciosa à agricultura, pois, quando patogênicos provocam sintomas que levam a morte descendente e seca de ramos, exsudação de resinosidade, lesões necróticas, canchros e podridões. Portanto, pode acarretar na morte do hospedeiro, sendo assim importante patógeno de sementes, plantas e pós-colheita de frutos (CARDOSO *et al.*, 2006; SLIPPERS; MARQUES *et al.*, 2013a, b; NETTO *et al.*, 2014; WINGFIELD, 2007; ZHAI *et al.*, 2014).

Quando patogênicos esses fungos atacam principalmente espécies vegetais lenhosas, bem como plantas herbáceas (PHILLIPS *et al.*, 2013). Acerca do processo de virulência, apresenta variações que engloba a especificidade do fitopatógeno, o hospedeiro e o ambiente (SAKALIDIS *et al.*, 2013). Entretanto, condições que causam estresse ao hospedeiro estão associadas a patogenicidade por esse grupo, alterações climáticas, por exemplo, aumentam o risco de desenvolvimento de doenças provocadas por esses fungos (DESPREZ-LOUSTAU *et al.*, 2006; SLIPPERS; WINGFIELD, 2007; STURROCK *et al.*, 2011).

Desse modo, o estudo desse complexo de fungos ganhou relevância no campo agrícola, pois, acomete um grande número de plantas gerando sintomas em diferentes partes anatômica da mesma (CROUS *et al.*, 2017). Atualmente, a caracterização morfológica desses organismos é bastante discutível, visto que a família Botryosphaeriaceae apresenta espécies idênticas ou semelhantes do ponto de vista morfológico, entretanto, diferem completamente ou parcialmente no processo evolutivo

e reprodutivo. Nesse caso, a identificação por técnicas de biologia molecular, através do sequenciamento de regiões de DNA, se tornou o método mais adequado para diferenciação dessas espécies (BICKFORD *et al.*, 2006; DENMAN *et al.*, 2000; PHILLIPS *et al.*, 2013; SLIPPERS *et al.*, 2014b).

2.5 Espécies de Botryosphaeriaceae associadas a podridão

Nos últimos anos, diversos trabalhos sobre a família Botryosphaeriaceae foram publicados, relatando esses fungos em vários hospedeiros pelo mundo (BERRAF-TEBBAL *et al.*, 2020; COELHO *et al.*, 2022; JIANG *et al.*, 2020; XIAO *et al.*, 2021; ZHAO *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2021; WU *et al.*, 2021). No Brasil, os gêneros mais estudados são *Lasiodiplodia* e *Macrophomina* (CORREIA *et al.*, 2016; MACHADO *et al.*, 2014; MACHADO *et al.*, 2018; MARQUES *et al.*, 2013; NETTO *et al.*, 2014; NETTO *et al.*, 2017; ROSADO *et al.*, 2016), porém além desses gêneros, outros já foram relatados associados à podridão de frutos e raízes tuberosas no país (ABREU, 2015; BRITO *et al.*, 2020; LOPES, 2018; MARQUES *et al.*, 2012; MELLO *et al.*, 2021).

Nos estudos sobre a etiologia das podridões peduncular e de frutos, existe uma grande prevalência de espécies pertencentes à família Botryosphaereriaceae. Netto (2012) confirmou que espécies do gênero *Lasiodiplodia* estão envolvidas na podridão peduncular do mamão, principalmente a espécie *L. theobromae*, contudo essa espécie não constitui a única espécie, destacando *L. pseudotheobromae* e *L. hormozganensis* como causadores da mesma doença no hospedeiro. Quando Marques *et al.*, (2013), avaliaram uma coleção de espécies de Botryosphaeriaceae associadas ao declínio e podridão do colmo da manga no semiárido do Nordeste do Brasil, observaram que todas as espécies de *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* e *Pseudofusicoccum* coletadas neste estudo eram patogênicas em frutas de mangueira, causando sintomas de podridão.

Em um estudo sobre a patogenicidade de espécies de Botryosphaereriaceae endofíticas de plantas da Caatinga no Ceará (manga e umbu-cajá), foram identificados gêneros como: *L. theobromae*, *Pseudofusicoccum stromaticum* (Mohali, Slippers & M.J. Wingf.) Mohali, Slippers & M.J. Wingf., *N. parvum*, *N. ribis*, *Botryosphaeria mamane* D.E. Gardner, *Lasiodiplodia gonubiensis* Pavlic, Slippers & M.J. Wingf e *Pseudofusicoccum adansoniae* Pavlic, Slippers & M.J. Wingf (GONÇALVES *et al.*, 2016). Lopes (2018) identificou *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *N. ribis* (Slippers, Crous & M.J. Wingf.) Crous, Slippers &

A.J.L. Phillips e *N. umdonicola* Pavlic, Slippers & M.J. Wingf. associadas à podridão pós-colheita de abacate, enquanto Maia (2019), avaliando os fungos associados a plantas de mangues no Ceará, identificou *Lasiodiplodia parva* A.J.L. Phillips, A. Alves & Crous e *Lasiodiplodia theobromae* provocando sintomas em frutos como a manga, banana e goiaba, apresentando distintos níveis de severidade.

Além desses, outros estudos buscando identificar espécies de Botryosphaeriales causadores de podridão já foram realizados no Brasil (ABREU, 2015; COELHO *et al.* 2022; MACHADO *et al.*, 2019; MELLO *et al.* 2021), porém, poucos estudos incluíram a cultura da seriguela. Nesses estudos, apenas espécies do gênero *Lasiodiplodia* foram identificadas (AMÂNCIO 2016; COUTINHO *et al.* 2016; LIMA, 2011), não existindo, até o presente momento, um estudo detalhado para identificar as espécies de Botryosphaeriales associadas a seriguela no Brasil.

2.6 Identificação molecular de espécies de Botryosphaeriales

As primeiras espécies de Botryosphaeriales foram identificadas em 1918 e pertenciam aos gêneros *Phaeobotryon* e *Dibotryon*. Essa identificação foi realizada utilizando caracteres morfológicos. Em 2012, foi realizada uma nova revisão dos 15 gêneros existentes e as espécies conhecidas passaram a compor 29 gêneros. Porém, assim como ocorreu na identificação das primeiras espécies, essa revisão tomou como base somente as características morfológicas. Apenas em 2013 descrições detalhadas para 17 gêneros e 110 espécies, conhecidas naquela época, foram publicadas e usaram como base características morfológicas e moleculares (LIU *et al.*, 2012; PHILLIPS *et al.* 2013; ZHANG *et al.*, 2021).

O aprimoramento de equipamentos tecnológicos utilizados nos mais diversos campos de estudo, como nas ciências biológicas e agrônomicas, assim como o desenvolvimento de software, permitiu a difusão do sequenciamento do DNA para áreas que envolvem a identificação e descoberta de diferentes organismos vivos, incluindo os microrganismos (CAI *et al.*, 2011; CROUS; GROENEWALD, 2005; MADDISON *et al.*, 2012). Nesse contexto, as técnicas de biologia molecular alteraram o modo de identificação dos fungos, proporcionando uma identificação de forma mais confiável, não depende unicamente dos aspectos morfológicos (BURGESS *et al.*, 2016; CROUS *et al.*, 2016).

Com a utilização do sequenciamento de DNA, foi possível a obtenção de dados moleculares com um grande número de caracteres hereditários, possibilitando uma identificação com maior precisão, quando comparada a identificação com base apenas em dados morfológicos. Os dados gerados no sequenciamento podem ser analisados por diversos pesquisadores com o suporte da bioinformática e disponibilizados em bancos de dados de compartilhamento de informações biotecnológicas (CAI *et al.*, 2011; CROUS; GROENEWALD 2005; MADDISON *et al.*, 2012). Desse modo, ao serem analisados por pesquisadores distintos, tem-se dados menos controversos em relação a identificação de espécies fúngica. Outra questão relevante são as características morfológicas que são susceptíveis as mudanças ambientais, enquanto os dados moleculares utilizados para identificação de fungos, tem como base o sequenciamento de vários genes seguido pela análise filogenética (CAI *et al.*, 2011).

A escolha dos genes para sequenciamento consiste em uma das etapas mais importante dessa análise, pois a seleção inapropriada dos mesmos pode gerar um posicionamento filogenético inadequado e até mesmo a superestimação ou subestimação da diversidade (HYDE *et al.*, 2014; SHARMA; PINNAKA; SHENOY, 2015). As regiões gênicas indicadas para estudos taxonômicos da ordem Botryosphaerales são a região 28s do DNA ribossomal (LSU), a região 18s do DNA ribossomal (SSU), RNA polimerase subunidade II (RPB2), β -tubulina (TUB), Espaçador transcrito interno do DNA ribossomal (ITS) e o Fator de alongação da tradução 1- α (EF-1- α) (HYDE *et al.*, 2014).

Esses marcadores apresentam funções diferentes, como o ITS que é composto pelas porções ITS1, ITS2, ITS3, ITS4 e ITS5 que atuam no processo de transcrição e amplificação do DNA (COUTINHO, 2016). Os genes EF1- α e a TUB estão envolvidas na codificação de proteínas, além de serem bastante conservados nos organismos. O EF1- α participa da fase de iniciação, alongamento e tradução do DNA, enquanto a TUB participa do desenvolvimento dos microtúbulos necessários para a divisão celular (EINAX; VOIGT, 2003; GLASS; DONALDSON, 1995; O'DONNELL *et al.*, 1998; KEELING; INAGAKI, 2004).

Estudos moleculares envolvendo aspectos taxonômicos da família Botryosphaeriaceae apresenta diferentes regiões gênicas de forma combinada. A utilização de um único marcador molecular pode subestimar a diversidade, principalmente em espécies crípticas (BURGESS *et al.* 2005; PHILLIPS *et al.* 2005; SLIPPERS *et al.* 2004a, b, c). Até o momento, nenhuma região gênica isoladamente é suficiente para distinguir todas as espécies, mesmo dentro de um gênero, pois nem todos

os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) representam locais de restrição, especialmente entre algumas espécies intimamente relacionadas (HYDE *et al.*, 2014).

De acordo com alguns trabalhos, a região LSU apresenta natureza conservada e por isso é adequado para identificar muitos ascomicetos a nível genérico (CROUS *et al.* 2006; HIBBETT *et al.*, 2007; SCHOCH *et al.*, 2006). Para Liu *et al* (2012), a combinação de EF1- α e TUB é a melhor para indicar gêneros de Botryosphaeriaceae. No entanto, de acordo com PAVLIC *et al.* (2009a, b) a combinação ITS e EF1- α delimitam melhor as espécies dessa família. Essas combinações ainda não são suficientes para caracterizar todas as espécies. Em 2013, Phillips *et al.* ao avaliar os gêneros e espécies conhecidas de Botryosphaeriaceae, incluiu a análise das regiões gênicas SSU, LSU e ITS e os genes EF1- α e TUB. Novos estudos introduziram a RNA polimerase II, que se mostrou eficiente, inclusive para diferenciar espécies muito semelhantes (CRUYWAGEN *et al.*, 2017; SAKALIDIS; HARDY; BURGUESS, 2011; YANG *et al.*, 2017; SLIPPERS *et al.*, 2017).

Avaliando as espécies em Botryosphaeriales, Zhang *et al.* (2021), utilizaram apenas as sequencias de ITS, EF1- α e TUB para construção da árvore filogenética das espécies de *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Dothiorella*, *Neoscytalidium*, *Pseudofusicoccum* e *Saccharata*, enquanto para as espécies de *Lasiodiplodia* e *Neofusicoccum*, foram usadas as sequencias de ITS, EF1- α , TUB e RPB2. Muitos estudos recentes têm utilizados informações dessas 4 regiões gênicas para classificar fungos da família Botryosphaeriaceae (COELHO *et al.*, 2022; JIANG *et al.*, 2018; MACHADO *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2021; WU *et al.*, 2021). No entanto, vários grupos de pesquisadores ainda estão utilizando apenas as sequências de ITS, EF1- α e TUB (BATISTA *et al.*, 2020; BEZERRA *et al.*, 2021; JIME *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2021) e outros utilizando somente as sequências de ITS e EF1- α (ARKAM *et al.*, 2021; BERRAF-TEBBAL *et al.*, 2020; MAHAMED I *et al.*, 2020; VALENCIA *et al.*, 2019) para identificar espécies de Botryosphaeriaceae.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar a diversidade de espécies da família Botryosphaeriaceae associadas à podridão em seriguela, através das características moleculares e patogênicas.

3.2 Objetivos específicos

- Coletar seriguelas em quintais produtivos e propriedades rurais nos estados de Ceará e Pernambuco;
- Isolar espécies de Botryosphaeriaceae associadas a podridão de frutos em seriguela;
- Avaliar a patogenicidade de isolados espécies de Botryosphaeriaceae associadas a podridão de frutos em seriguela;
- Obter culturas puras e preservar isolados de espécies de Botryosphaeriaceae associadas a podridão de frutos em seriguela;
- Caracterizar por métodos moleculares os isolados das espécies de Botryosphaeriaceae associadas a podridão de frutos em seriguela nos estados de Ceará e Pernambuco.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção das amostras

Durante os meses de janeiro e fevereiro de 2020 foram coletadas seriguelas em quintais produtivos e pequenas propriedades rurais nos municípios Cearenses: Barros, Barbalha, Caririaçu, Crato, Farias Brito, Jardim, Juazeiro do Norte, Mauriti, Milagres, Nova Olinda, Porteiras, Santana do Cariri e nos municípios de Araripina, Exu, Moreilândia e Ouricuri no estado de Pernambuco. Os frutos foram levados para o Laboratório de Fitopatologia do Centro de ciências Agrárias e da Biodiversidade (CCAB) da Universidade Federal do Cariri – UFCA Campus Crato.

4.2 Obtenção dos isolados

Os frutos passaram inicialmente pelo processo de desinfestação superficial, onde foram lavados com água corrente e em seguida submergidos em hipoclorito de sódio (NaClO) a 1,5% por 1 minuto. Na sequência passaram por duas lavagens em água destilada esterilizada (ADE) por 30 segundos cada. Posteriormente, os frutos foram colocados para secar em papel filtro esterilizado para serem acondicionadas em câmara úmida.

Após a secagem, cinco frutos de cada amostra foram colocados em uma placa de Petri esterilizada com sua devida identificação. Os mesmos foram armazenados em uma bandeja limpa com álcool 70% e forrada com papel toalha. Foram adicionados 20 mL de ADE sobre o papel toalha e a bandeja colocada dentro de um saco plástico. As bandejas foram armazenadas por até 4 dias, ou até o aparecimento do sintoma de podridão.

Os frutos que apresentaram sintomas foram levados para a câmara de fluxo laminar para o processo de isolamento. Fragmentos do tecido do fruto foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), suplementados com tetraciclina (50mg x L⁻¹). As placas foram acondicionadas em estufa incubadora no escuro por 48 horas a 25 ± 3 °C . Após esse período, as placas com crescimento fúngico foram analisadas se possuíam o crescimento típico de *Botryosphaeriaceae*, sem contaminação e uniformes. Em seguida, um fragmento do isolado foi transferido para

uma nova placa com meio BDA. As culturas uniformes foram preservadas em microtubos contendo ADE para uso nos experimentos seguintes.

4.3 Teste de patogenicidade

A patogenicidade dos isolados fúngicos obtidos foram avaliadas em frutos de seriguela maduros e sem sintomas de doenças. Os frutos foram lavados em água corrente, desinfestados superficialmente em solução de NaClO a 1,5% por 1 minutos e lavados com água destilada esterilizada. Após a secagem, um disco de micélio (3 mm de diâmetro) de cada isolado foi removido da margem de colônia com 5 dias de crescimento em BDA e transferido na superfície do fruto. Para a testemunha, foram utilizados discos de BDA não colonizados pelo fungo (FIGURA 2).

Figura 2 - Frutos utilizados como testemunha no teste de patogenicidade



Fonte: Elaborado pelos a autores (2021)

Os frutos foram colocados sobre uma tampa de placa de Petri esterilizada e depositado em bandeja plástica (28 cm x 19 cm x 11 cm) forrada com quatro camadas de papel toalha umedecidas. As bandejas foram acondicionadas em sacos plásticos a a 25 ± 3 °C e umidade de $\cong 95\%$. A ocorrência de sintomas das doenças foi avaliada após 48 horas da inoculação. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com seis repetições por isolado e cada repetição era composta por cinco frutos. Foi considerado patogênico o isolado que induziu sintomas em comparação aos sintomas do campo, caracterizados por podridão mole, rachadura da epiderme e exsudação de líquido.

4.4 Obtenção de cultura pura e preservação dos isolados

Para a obtenção de culturas puras de hifas dos isolados patogênicos em frutos de seriguela, fragmentos de micélio retirados da margem de cultura com 3 dias de idade em BDA foram transferidas para uma placa de Petri contendo meio de cultura ágar-água (AA) a 2%. As placas foram incubadas em estufa no escuro a 25 ± 3 °C e após 24 horas foi observada a extremidade do crescimento micelial da colônia fúngica com auxílio de microscópio. Da extremidade da hifa foi retirado um pequeno fragmento e transferido para o centro de uma placa de Petri contendo meio BDA. As placas foram novamente incubadas na estufa no escuro, sendo observado diariamente o crescimento fúngico, até o crescimento total na superfície do meio de cultura.

Os isolados foram preservados pelo método Castellani para uso nos experimentos seguintes, bem como em tubos criogênicos de 2 ml contendo 1,5 ml de ADE, que foram depositados na Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos do Cariri (CFC) da Universidade Federal do Cariri (Crato, Ceará, Brasil). Foram colocados cinco discos de BDA contendo o crescimento fúngico de 5 mm de diâmetro em cada tubo.

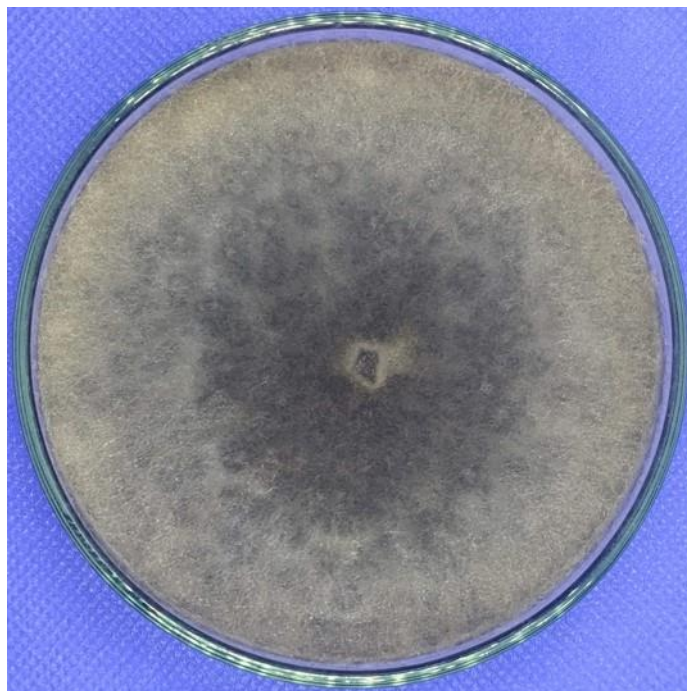
4.5 Extração e amplificação do DNA genômico

Os isolados patogênicos que apresentavam cultura semelhante a Botryosphaeriaceae (FIGURA 3) foram cultivados em placa de Petri contendo meio BDA com uma membrana de celofane na superfície por sete dias a 25 °C no escuro. Usando uma espátula esterilizada, uma pequena quantidade de micélio aéreo foi raspada da superfície da colônia e o DNA genômico foi extraído usando o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega Corporation, Madison, EUA), conforme as instruções do fabricante. As concentrações de DNA foram estimadas visualmente em gel de agarose a 1% comparando-se a intensidade da banda com um marcador de peso molecular com escala de 1 kb (Axygen Scientific Inc., Union City, EUA).

Foram amplificadas a região ITS e os genes EF1- α e TUB utilizando os pares de *primers* ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') e ITS5 (5'-TAC TTC AAG GAA CCC TTA CC-3') (WHITE *et al.*, 1993), EF1-728F (5'-CAT CGA GAA GTT CGA GAA GTT-3') e EF1-986R (CARBONE; KOHN, 1999) e Bt2a (5'-GGT AAC CAA ATC

GGT GCT GCT TTC-3') e Bt2b (5'-ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC-3') (GLASS; DONALDSON, 1995), respectivamente. Os componentes da amplificação por PCR foram os seguintes: 6.25 µL GoTaq® Green Master Mix (2X) (Promega Corporation, Madison, USA), 0.5 µL de cada *primer* (*forward e reverse*), 4.25 µL of água livre de nuclease e 1 µL of amostra de DNA totalizando um volume final de 12.5 µL. O controle negativo (sem o DNA) também foi utilizado na reação de PCR. As reações de PCR foram conduzidas no termociclador MJ BioCycler 96 (AppliedBiosystems, Foster City, EUA).

Figura 3 - Colonia fúngica com características culturais de espécies Botryosphaeriaceae. Isolado CFC1195.



Fonte: Elaborado pelos a autores (2021)

Para ITS e TUB, foram utilizadas as seguinte programação: desnaturação inicial a 95 °C por 3 min, seguida por 34 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 min, anelamento a 52 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 1 min e uma extensão final a 72 °C por 10 min. Para EF1- α , as condições de amplificação por PCR foram: desnaturação inicial a 95 °C por 4 min, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 55 °C por 45 s, extensão a 72 °C por 90 s e uma extensão final a 72 °C por 10 min.

Os produtos de amplificação de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% em Tris-acetato 1.0 x ácido EDTA (TAE), corados com GelRed™ (Biotium

Inc., Hayward, EUA) e fotografados sob luz ultravioleta (UV). Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit de purificação ExoProStar 1-step (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, EUA), seguindo as instruções do fabricante, e sequenciados em ambas as direções com os mesmos *primers* da amplificação usando um ABI PRISM 3100 - Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) na Plataforma de Sequenciamento do Laboratório Central do Centro de Biociências (LABCEN/CCB) na Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Brasil).

4.6 Análise filogenética

A análise dos cromatogramas gerados pelo sequenciamento da região ITS e dos genes EF1- α e TUB e a montagem dos contigs foram realizadas utilizando o software Staden Package[®] 209 v.2.0 (STADEN; BEAL; BONFIELD, 1998). As sequências foram alinhadas utilizando ClustalX v.1.83 (THOMPSON *et al.*, 1997) utilizando os seguintes parâmetros: parâmetros de alinhamento par a par (gap opening = 10, gap extension = 0.1) e vários parâmetros de alinhamento (gap opening = 10, gap extension = 0,2, transition weight = 0,5, delay divergente sequences = 25%). Os eventos de indels (gaps) foram consideradas na análise filogenética (YOUNG; HEALY, 2003).

Sequências nucleotídicas de isolados de referência de espécies de Botryosphaeriaceae foram obtidas do banco de dados NCBI (*National Center of Biotechnological Information*) e incluídas nas análises (Tabela 1). A filogenia para cada locus (ITS, EF-1 α e TUB) e para a matriz concatenada foi inferida pelo critério de máxima verossimilhança (ML). As análises de ML foram feitas em RAxML - HPC2 (STAMATAKIS, 2014) implementado no portal CIPRES Science Gateway (<https://www.phylo.org/portal2/home.action>). As buscas em árvore de ML foram realizadas sob o modelo GTRGAMMA com 1000 repetições.

As sequências obtidas nesse estudo serão depositadas no GenBank e os isolados obtidos serão depositados na Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos do Cariri (CFC) da Universidade Federal do Cariri (Crato, Ceará, Brasil).

Tabela 1- Isolados de Botryosphaeriaceae usados neste estudo.

Espécie	Isolado ^{a, b}	Hospedeiro	Local	Coletor	Número GenBank		
					ITS	EF1- α	β -tubulina
<i>Cophinforma atrovirens</i>	CBS 124934	<i>Pterocarpus angolensis</i>	África do Sul	JWM Mehl <i>et al.</i>	FJ888473	FJ888456	
<i>Cophinforma eucalypti</i>	MFLUCC 110425	<i>Eucalyptus sp.</i>	Tailândia	M. Doilom	JX646800	JX646865	JX646848
<i>Cophinforma eucalypti</i>	CFC1125	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Cophinforma eucalypti</i>	CBS 117444	<i>Eucalyptus urophylla</i>	Venezuela	AJL Phillips <i>et al.</i>	KF531822	KF531801	AHA34162
<i>Cophinforma tumefaciens</i>	IMI 76762	<i>Citrus limon</i>	Jamaica	P. Zhao <i>et al.</i>		UDY78039	UDY78109
<i>Diplodia alatafructa</i>	CMW22627	<i>Pterocarpus angolensis</i>	África do Sul	JWM Mehl <i>et al.</i>	FJ888460	FJ888444	
<i>Diplodia alatafructa</i>	CMW22721	<i>Pterocarpus angolensis</i>	África do Sul	JWM Mehl <i>et al.</i>	FJ888478	FJ888446	
<i>Diplodia búlgara</i>	CBS 124254	<i>Malus sylvestris</i>	Bulgária	AJL Phillips <i>et al.</i>	GQ923853	GQ923821	MT592476
<i>Diplodia búlgara</i>	CBS 124135	<i>Malus sylvestris</i>	Bulgária	AJL Phillips <i>et al.</i>	GQ923852	GQ923820	MT592474
<i>Diplodia eriobotryicola</i>	CBS140851	<i>Eriobotrya japonica</i>	Espanha	W. Zhang <i>et al.</i>	MT587342.1	MT592047.1	MG015806
<i>Diplodia eriobotryicola</i>	CFC1171	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Diplodia intermedia</i>	CBS 124134	<i>Cydonia sp.</i>	Portugal	AJL Phillips <i>et al.</i>	HM036528	GQ923851	
<i>Diplodia intermedia</i>	CBS 124462	<i>Malus sylvestris</i>	Portugal	AJL Phillips <i>et al.</i>	MH863374.1	GQ923826	MT592503.1
<i>Diplodia sapinea</i>	CBS 109725	<i>Pinus patula</i>	África do Sul	M. J. Wingfield	DQ458896	DQ458881	DQ458864
<i>Diplodia sapinea</i>	CBS 393,84	<i>Pinus nigra</i>	Países Baixos	HA van der Aa	DQ458895	DQ458880	EU754157
<i>Diplodia seriata</i>	CBS 112555	<i>Vitis vinifera</i>	Portugal	A. Alves, A Correia & A.J.L. Phillips	AY259094	AY573220	DQ458856
<i>Diplodia seriata</i>	CBS 119049	<i>Vitis sp.</i>	Itália	A. Alves, A Correia & A.J.L. Phillips	DQ458889	DQ458874	DQ458857
<i>Lasiodiplodia brasiliense</i>	CMW 35884	<i>Adansonia madagascariensis</i>	Madagascar	EM Cruywagen <i>et al.</i>	KU887094	KU886972	KU887466
<i>Lasiodiplodia brasiliense</i>	CFC1191	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	L. C. S. Amâncio <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia brasiliense</i>	CFC1179	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	L. C. S. Amâncio <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia brasiliense</i>	CMM 0415	<i>V. vinifera</i>	Brasil	KC Correia e MA Silva	KJ417852	KJ417848	ND
<i>Lasiodiplodia brasiliense</i>	CFC1155	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia brasiliense</i>	CFC1163	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia brasiliense</i>	CFC1160	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			

<i>Lasiodiplodia brasiliense</i>	CFC1175	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia brasiliense</i>	CFC1154	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia brasiliense</i>	CFC1176	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia bruguierae</i>	CMW41470	<i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	África do Sul	JA Osorio <i>et al.</i>	KP860832	KP860677	KP860755
<i>Lasiodiplodia bruguierae</i>	CMW42480	<i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	África do Sul	JA Osorio <i>et al.</i>	KP860834	KP860679	KP860757
<i>L. caatinguensis</i>	IBL381	<i>Spondias purpurea</i>	Brasil	I. B. L. Coutinho & J. S. Lima	KT154757	KT154751	KT154764
<i>Lasiodiplodia caatinguensis</i>	IBL366		Brasil	I. B. L. Coutinho & CS Lima	KT154760.1	KT008006.1	KT154767.1
<i>Lasiodiplodia euphorbicola</i>	CMW 33350	<i>A. digitata</i>	Botswana	EM Cruywagen <i>et al</i>	KU887149	KU887026	KU887455
<i>Lasiodiplodia euphorbicola</i>	CFC1195	<i>Spondias purpurea</i>	Brasil	L. C. S. Amâncio <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia euphorbicola</i>	CMW 36231	<i>A. digitata</i>	Zimbabwe	EM Cruywagen <i>et al</i>	KU887187	KU887063	KU887494
<i>Lasiodiplodia euphorbicola</i>	CMM 3609	<i>J. curcas</i>	Brasil	A.R. Machado & O.L. Pereira	KF234543	KF226689	KF254926
<i>Lasiodiplodia euphorbicola</i>	CFC1184	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	L. C. S. Amâncio <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia euphorbicola</i>	CFC1189	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	L. C. S. Amâncio <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia euphorbicola</i>	CFC1186	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	L. C. S. Amâncio <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia euphorbicola</i>	CFC1190	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	L. C. S. Amâncio <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia euphorbicola</i>	CFC1180	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	L. C. S. Amâncio <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia euphorbicola</i>	CFC1192	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	L. C. S. Amâncio <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia euphorbicola</i>	CFC1200	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	L. C. S. Amâncio <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia euphorbicola</i>	CFC1196	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	L. C. S. Amâncio <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia euphorbicola</i>	CFC1185	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	L. C. S. Amâncio <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia euphorbicola</i>	CFC1193	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	L. C. S. Amâncio <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia euphorbicola</i>	CFC1132	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia euphorbicola</i>	CFC1187	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	L. C. S. Amâncio <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia euphorbicola</i>	CFC1135	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia euphorbicola</i>	CFC1133	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia euphorbicola</i>	CFC1136	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia euphorbicola</i>	CFC1134	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	IRAN 1520C	<i>Salvadora persica</i>	Iran	A. Javadi	GU945346	GU945334	KP872415
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1127	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1169	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1173	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			

<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1157	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1151	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1144	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1142	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1138	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1130	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1128	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1170	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1159	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1156	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1156	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1202	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1166	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1162	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1131	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1164	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1168	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1145	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1174	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1148	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1161	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1137	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1158	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1146	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1177	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1126	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1139	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1165	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	IRAN1502C	<i>Juglans sp.</i>	Iran	A. Javadi	GU945347	GU945335	KU887517
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1150	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1152	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1153	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFC1172	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia jatrophiicola</i>	CMM 3610	<i>J. curcas</i>	Brasil	A.R. Machado & O.L. Pereira	KF234544	KF226690	KF254927
<i>Lasiodiplodia jatrophiicola</i>	CFC1188	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	L. C. S. Amâncio <i>et al.</i>			

<i>Lasiodiplodia jatrophiicola</i>	CFC1182	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	L. C. S. Amâncio <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia jatrophiicola</i>	CFC1183	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	L. C. S. Amâncio <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia jatrophiicola</i>	CFC1198	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	L. C. S. Amâncio <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia jatrophiicola</i>	CFC1197	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	L. C. S. Amâncio <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia jatrophiicola</i>	CFC1199	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	L. C. S. Amâncio <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia jatrophiicola</i>	CMW36237	<i>A. digitata</i>	Mozambique	EM Cruywagen <i>et al.</i>	KU887121	KU886998	KU887499
<i>Lasiodiplodia macroconidia</i>	GuoLD01752		Laos	S. Lin & Y. Zhang	KY783438	KY848597	KY848530
<i>Lasiodiplodia macroconidia</i>	CFC1178	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia parva</i>	CBS 456.78	<i>Cassava-field soil</i>	Colombia	O. Rangel	EF622083	EF622063	KP872419
<i>Lasiodiplodia parva</i>	CBS 494.78	<i>Cassava-field soil</i>	Colombia	O. Rangel	EF622084	EF622064	EU673114
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	CBS 116459	<i>Gmelina arborea</i>	Costa Rica	J. Carranza-Velásquez	EF622077	EF622057	EU673111
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	CGMCC318047	<i>Pteridium aquilinum var. aquilinum</i>	China	ZP Dou; W. He & Y. Zhang,	KX499876.1	KX499914.1	KX499989.1
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	CFC1194	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	L. C. S. Amâncio <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	CFC1201	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	L. C. S. Amâncio <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	CFC1181	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	L. C. S. Amâncio <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia sterculiae</i>	CBS 342.78	<i>Sterculia oblonga</i>	Alemanha	T. Yang	KX464140	KX464634	KX464908
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CBS 111530	<i>Unknown</i>	Unknown	Unknown	AY622074	AY622054	KP872426
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CFC1149	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CFC1141	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CBS 164.96	<i>Fruit on coral reef coast</i>	New Guinea	A. Aptroot	AY640255	AY640258	EU673110
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CFC1140	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CFC1129	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Lasiodiplodia viticola</i>	UCD 2553AR	<i>V. vinifera</i>	USA	K. Striegler & G.M. Leavitt	HQ288227	HQ288269	HQ288306
<i>Lasiodiplodia viticola</i>	UCD 2604MO	<i>V. vinifera</i>	USA	K. Striegler & G.M. Leavitt	HQ288228	HQ288270	HQ288307
<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	CBS 117448	<i>Eucalyptus hybrid</i>	Venezuela	A.J.L. Phillips	AY693974	AY693975	EU673094
<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	CFC1147	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			

<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	CDA1365	<i>A. crassiflora</i>	Brasil	A.R. Machado <i>et al.</i>	KY994639	KX528585	
<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	CFC1203	<i>Spondia purpurea</i>	Brasil	D. M. S. Souza <i>et al.</i>			
<i>Pseudofusicoccum adansoniae</i>	WAC12689	<i>Mangifera indica</i>	Austrália	T.I. Burgess <i>et al.</i>	EF585534	EF585567	
<i>Pseudofusicoccum adansoniae</i>	MUCC525	<i>Mangifera indica</i>	Austrália	T.I. Burgess <i>et al.</i>	EF585527	EF585573.1	

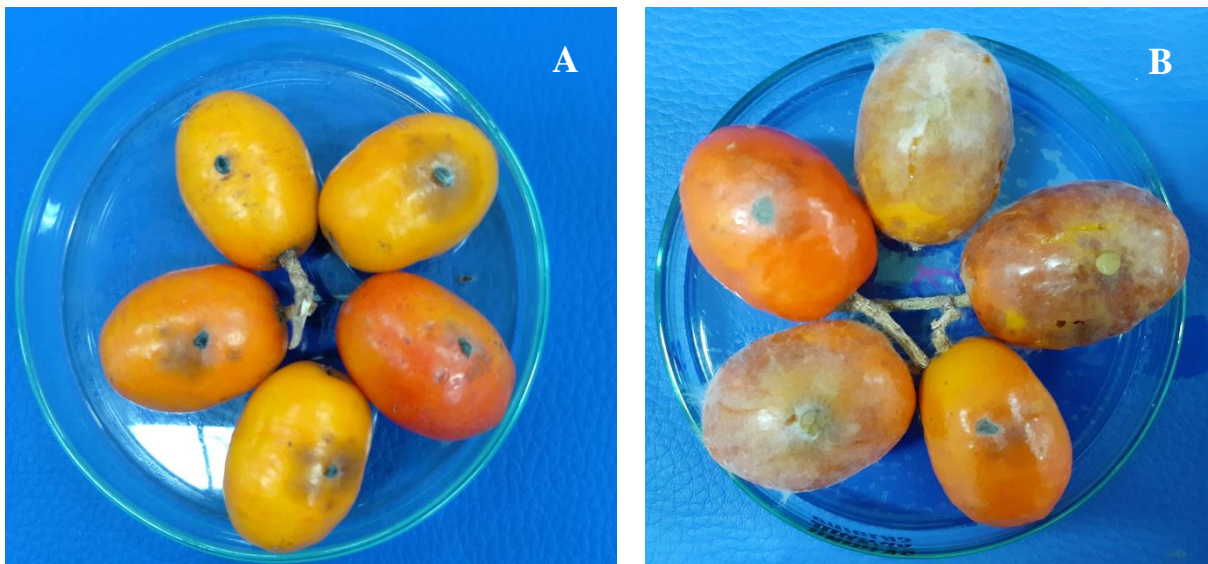
^a CBS Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands; CMW Forestry and Agricultural Biotechnology Institute, University of Pretoria, South Africa; WAC Department of Agriculture Western Australia Plant Pathogen Collection, University of Western Australia, Perth, Australia; CMM Culture Collection of Phytopathogenic Fungi "Prof. Maria Menezes", Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil; STE-U Culture Collection of the Department of Plant Pathology, University of Stellenbosch, Stellenbosch, South Africa; UCD Phaff Yeast Culture Collection, Department of Food Science and Technology, University of California, Davis, USA; BOT A. M. Ismail, Plant Pathology Research Institute, Giza, Egypt; IRAN Culture Collection of the Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran

^b Sequencias em negrito foram obtidas nesse estudo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 300 isolados fúngicos, nos quais 174 mostraram ser patogênicos a seriguela, provocando sintomas 48 horas após a inoculação. Os frutos apresentaram podridão mole de coloração marrom ao redor do ponto de inoculação (FIGURA 4A). Alguns frutos apresentaram rachadura da epiderme e exsudação de líquido. Foi possível observar os sinais do patógeno em alguns frutos (FIGURA 4B). Os sintomas observados nas seriguelas são comumente ocasionados por espécies da família Botryosphaeriaceae associadas a podridão pós-colheita em frutos tropicais. Marques *et al.* (2013a, b) observaram que as espécies de *Lasiodiplodia* associadas a manga, provocavam lesões necróticas marrom-escuras com formato aproximadamente circular ao redor dos locais de inoculação. No entanto, as lesões provocadas por *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* e *Pseudofusicoccum* eram de formato irregular, variando de pretas a marrons. Lesões semelhantes foram provocadas em mamão por espécies de *Lasiodiplodia*, as quais apresentaram diferentes níveis de virulência (NETTO *et al.*, 2014).

Figura 4 - Frutos utilizados no teste de patogenicidade apresentando sintomas induzidos por espécies de Botryosphaeriaceae.



Fonte: Elaborado pelos autores (2021)

Foi possível observar variação no tamanho das lesões provocadas pelos diferentes isolados testados. Tal fato já foi observado no estudo sobre a caracterização cultural e patogênica de isolados de *L. theobramae* em planta de cajaraneira. Essa variação pode ser

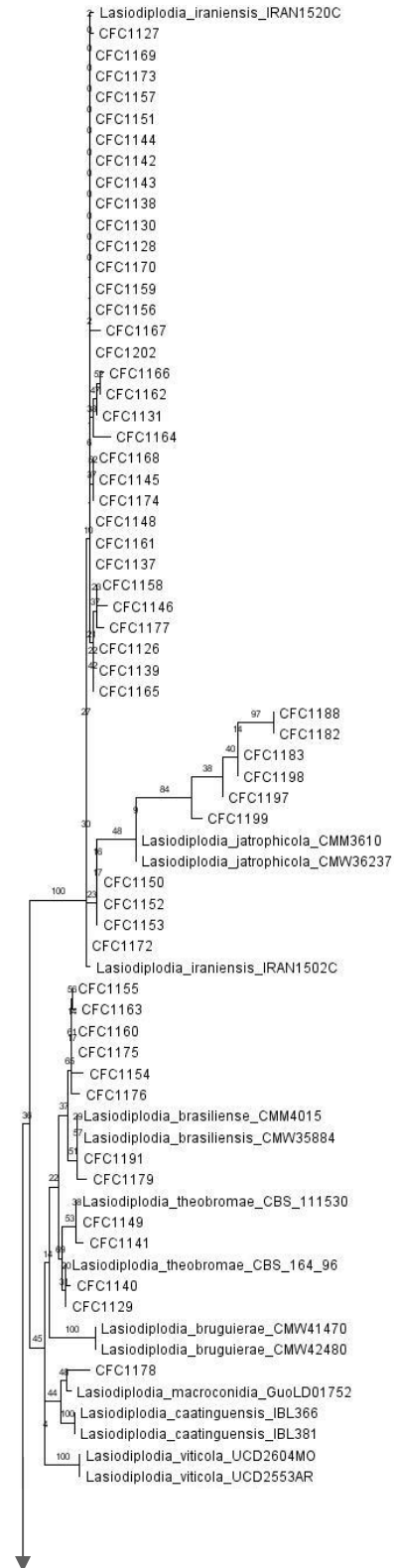
ocasionada por diversos fatores, como a diferença edafoclimáticas das regiões em que os isolados são obtidos, bem como composição genética e o outro aspecto é que as *Spondias* são nativas de regiões semiáridas, apresentando resistência aos patógenos identificados nesse estudo (RAM, 1993; PEREIRA; SILVA; RIBEIRO, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2008; MELO, 2010; LIMA *et al.*, 2013). Apesar da grande variedade nos tamanhos das lesões, a agressividade dos isolados não foi avaliada nesse estudo devido à grande variação nos tamanhos dos frutos, fato que comprometeria a confiabilidade dos resultados.

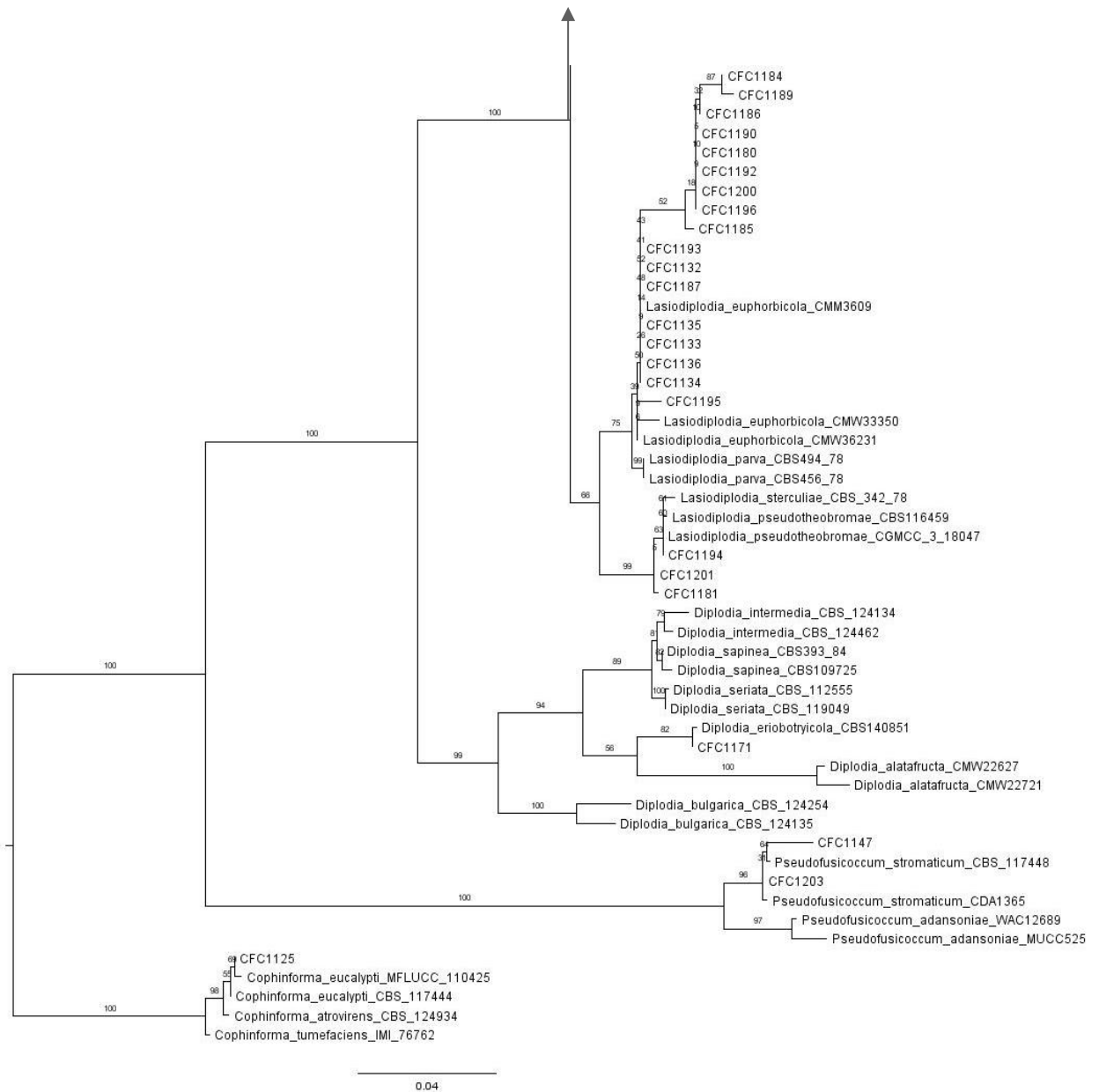
As sequências da região ITS e dos genes EF1- α e TUB dos 174 isolados patogênicos foram comparados com sequências de referência da família Botryosphaeriaceae, apenas 79 isolados faziam parte da família em estudo. As árvores construídas com as sequências da região ITS e com as sequências dos genes EF1- α e TUB individualmente (dados não mostrados) foram altamente congruentes com a árvore construída com as sequências concatenadas pelo método de Máxima Verossimilhança.

Os isolados obtidos de seriguela se agruparam em clados com espécies de diferentes gêneros de Botryosphaeriaceae (FIGURA 5). Um isolado (CFC-1171) agrupou dentro clado do gênero *Diplodia*, dois isolados (CFC-1147 e CFC-1203) agruparam no clado do gênero *Pseudofusicoccum* e o isolado CFC-1125 agrupou dentro clado de *Cophinforma*. A maioria dos isolados (94,9%) agruparam com as espécies do gênero *Lasiodiplodia*.

O isolado CFC-1171 se agrupou com o isolado tipo da espécie *Diplodia eriobotryicola* González-Domínguez, Armengol & A. Alves (FIGURA 5). Esta espécie foi descrita em 2016 na Espanha associada a nêspera (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.), sendo esta a primeira e única descrição até o presente estudo (FARR; ROSSMAN, 2022). Têm como características colônia inicialmente branca, tornando-se cinza a partir do centro, micélio aéreo ligeiramente fofo, tornando-se denso e algodinoso com o passar do tempo. A colônia torna-se cinza clara a cinza escuro em direção às bordas, preto-oliva reverso e com margens regulares. O crescimento ocorre na faixa de temperatura 5 e 35 °C, com crescimento otimizado a 25 °C (GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ *et al.*, 2016).

Figura 5: Árvore de máxima verossimilhança de espécies de Botryosphaeriaceae associadas a podridão em seriguela.





Os dois isolados que se agruparam no clado de *Pseudofusicoccum*, pertencem a espécie *P. stromaticum* (FIGURA 5). O gênero foi proposto em 2006 para abrigar a espécies *Fusicoccum stromaticum* Mohali, Chinelos & M.J. Wingf que tinha conídios envoltos em uma bainha mucosa persistente, que se diferenciava de *Fusicoccum aesculi* Corda e outros gêneros semelhantes a *Fusicoccum*. A espécie foi relatada associada à *Eucalyptus* sp. na Venezuela (CROUS *et al.*, 2006). No Brasil, *P. stromaticum* já foi relatado em *Anacardium* spp., *Annona* spp. e manga (FARR; ROSSMAN, 2022).

O isolado CFC-1125 pertence a espécie *Cophinforma tumefaciens* (Hedges) F. Liu, Crous & L. Cai (FIGURA 5). O gênero foi criado em 2012 por Liu *et al.* (2012) quando eles forneceram um tratamento sistemático de Botryosphaeriales com base na morfologia e filogenia. O gênero chegou a ter quatro espécies reconhecidas (MYCOBANK,

2022), no entanto, as espécies foram revisadas e sinonimizadas à *C. tumefaciens*. Conforme Zhao *et al.* (2021), *Cophinforma atrovirens* (Mehl & Slippers) A. Alves & A.J.L. Phillips e *Cophinforma eucalypti* Doilom, J.K. Liu & K.D. Hyde são filogeneticamente idênticos a *C. tumefaciens*, e com este último nome é mais antigo, se manteve por ter prioridade.

Os demais isolados (75) se agruparam com seis espécies conhecidas de *Lasiodiplodia* (FIGURA 5). A maioria (42) pertence a espécie *L. iraniensis*, enquanto apenas um isolado se agrupou com *Lasiodiplodia macroconidia* Y. Zhang *et al.* & S. Lin. Dezesete isolados se agruparam com o isolado tipo de *L. euphorbicola*, oito isolados agruparam com isolados de *L. brasiliensis*, enquanto quatro isolados se agruparam no clado de *L. theobromae* e os isolados CFC-1181, CFC-1194 e CFC-1201 se agruparam no clado de *L. pseudotheobromae*. Estes resultados comprovam que os fungos do gênero *Lasiodiplodia* são os principais agentes causadores da podridão de fruto na seriguela. Dialogando com os resultados de Freire e Filgueira (2000), estes afirmam que a *Lasiodiplodia. theobromae* tem sido considerado o fungo mais comum associado a essa doença, no entanto, no presente estudo foi possível observar que a *L. iraniensis* é a espécie mais prevalente, sendo encontrada em sete municípios.

A maior diversidade de espécies foi observada em Crato-CE. Apesar das espécies de *Lasiodiplodia* serem as mais frequentes associadas a podridão de frutos, as espécies *C. tumefaciens* e *P. stromaticum* também foram isolados de frutos coletados nessa região. Os municípios com menor diversidade foram Barro, Jardim e Milagres, pois apenas uma espécie foi identificada em cada. Mauriti apresentou a segunda maior diversidade de espécies de Botryosphaeriaceae. Nesse município foram coletados isolados das espécies *L. brasiliensis*, *L. euphorbiicola*, *L. iraniensis* e *L. pseudotheobromae*. Nos demais municípios apenas duas espécies estão causando podridão dos frutos em seriguela. No entanto, no município de Santana do Cariri, essas espécies pertencem a gêneros de Botryosphaeriaceae distintos: *Diplodia* e *Lasiodiplodia*.

Neste estudo, nove espécies diferentes de Botryosphaeriaceae distribuídos em quatro gêneros foram identificados e caracterizados de seriguela no Nordeste do Brasil, com base em dados de sequência de DNA (ITS, EF1- α e TUB).

A maioria das espécies de *Lasiodiplodia* encontradas já foram relatadas associadas a podridão de frutos em culturas de elevada importância econômica no Brasil (COUTINHO *et al.*, 2017; MARQUES *et al.*, 2013; NETTO *et al.*, 2014). Em seriguela, apenas *L. brasiliensis*, *L. caatinguensis*, *L. pontae*, *L. theobromae* e *L. pseudotheobromae* estavam relatadas até o presente estudo (FARR; ROSSMAN, 2022).

A *L. macroconidia* foi relatada associada à *Aquilaria crassna* Pierre em Laos e até o momento não tinha sido identificada em nenhum outro local ou planta (FARR; ROSSMAN, 2022; WANG *et al.*, 2019). A *L. euphorbicola* foi identificada no Brasil associada a pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) em 2014 (MACHADO; PINHO; PEREIRA, 2014) e atualmente encontra-se relato associada a diversas culturas e entre elas as fruteiras *Anacardium humile* St. Hilaire, *Annona squamosa*, mamoeiro, *Cocos nucifera* L., *Vitis vinifera* L. Fora do Brasil, essa espécie foi relatada apenas em Benin, Botswana, Cameroon, Madagascar, Namibia, Senegal, Togo e Zimbabwe associada a *Adansonia digitata* L. (FARR; ROSSMAN, 2022). A *L. euphorbicola* foi a segunda espécie mais frequente associada a podridão do fruto da seriguela, no entanto foi encontrada apenas nos municípios de Crato e Mauriti, no estado do Ceará.

A *L. iraniensis*, espécie mais frequente nesse estudo, já foi relatada em todos os continentes (FARR; ROSSMAN, 2022). Identificada e descrita no Iran associada a manga (ABDOLLAHZADEH *et al.*, 2010), foi identificada no Brasil causando doença em caju, *Annona* spp., *Citrus* sp. *Eucalyptus* sp., pinhão manso, mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e palma forrageira (*Nopalea cochenillifera* (L.) Mill.) (FARR; ROSSMAN, 2022). Apesar dos isolados CFC-1182, CFC-1183, CFC-1188, CFC-1197, CFC-1198 e CFC-1199 formarem um subclado próximo a *Lasiodiplodia jatrophiicola* A.R. Machado & O.L. Pereira, em 2015 essa espécie foi considerada sinonímia de *L. iraniensis* devido à não separação dos isolados tipos na reconstrução filogenética das espécies do gênero. Na ocasião, foram utilizadas sequências do gene EF1- α dos isolados tipos de cada espécie conhecida de *Lasiodiplodia* (LINALDEDDU *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2016).

Apesar do gênero *Pseudofusicoccum* ter nove espécies conhecidas (MYCOBANK, 2022; ZANG *et al.*, 2021), apenas duas espécies foram relatadas ocorrendo no Brasil: *Pseudofusicoccum kimberleyense* Pavlic, T.I. Burgess & M.J. Wingf. e *P. stromaticum*. A primeira foi relatada apenas em *Carya illinoensis* (Wangenh.) K.Koch, enquanto que *P. stromaticum* é mais comum, possuindo relato em manga e fruteiras das famílias *Annona* e *Anacardium*, sendo essa última a família da seriguela (FARR; ROSSMAN, 2022).

Diplodia é um gênero de distribuição global, ocorrendo em todos os continentes. Em bancos de dados e de fungos existe registro de mais de 1000 nomes associados a esse gênero (MYCOBANK, 2022). No entanto, Zang *et al.* (2021) reconheceram apenas 25 espécies com base em seus dados de sequência de DNA. No Brasil mais de 20 espécies de *Diplodia* já foram relatadas causando doenças mais de 50 hospedeiros (FARR; ROSSMAN, 2022). Porém, de acordo com a nova revisão do gênero (ZANG *et al.*, 2021), nenhuma espécie relatada

anteriormente no País é considerada válida, sendo a *D. eriobotryicola* a única espécie válida encontrada no Brasil atualmente.

Por ser um gênero criado recentemente (LIU *et al.*, 2012), até o momento *Cophinforma* foi relatado apenas na África do Sul, Brasil, China, Havaí, Tailândia e Venezuela (FARR; ROSSMAN, 2022). No Brasil, *C. atrovirens* foi relatada em caju e *Cophinforma mamane* (D.E. Gardner) A.J.L. Phillips & A. Alves relatada em manga e *Vitis* spp. No entanto, as espécies conhecidas anteriormente do gênero (*C. atrovirens*, *C. eucalypti* e *C. mamane*) são atualmente consideradas sinônimas e reconhecidas pelo nome *C. tumefaciens* (ZHAO *et al.*, 2021). Com isso, no Brasil fungos do gênero *Cophinforma* estão restritos a hospedeiros da família Anacardiaceae.

Este é o primeiro relato de *C. tumefaciens*, *D. eriobotryicola*, *L. euphorbicola*, *L. iraniensis*, *L. macroconidia* e *P. stromaticum* associados a seriguela, bem como o primeiro relato das espécies *L. macroconidia* e *D. eriobotryicola* no Brasil. O presente estudo traz novas contribuições para a comunidade científica, aumentando o conhecimento sobre a diversidade de agentes etiológicos associados a podridão de frutos nos estados cearenses e pernambucanos, bem como informações sobre a distribuição geográfica das espécies de Botryosphaeriaceae.

6 CONCLUSÕES

- a) Diversas espécies de Botryosphaeriaceae estão associadas a podridão dos frutos de seriguela nos estados do Ceará e Pernambuco;
- b) Este é o primeiro relatado de *Diplodia eriobotryicola*, *Cophinforma tumefaciens*, *Pseudofusicoccum stromaticcum* e *Lasiodiplodia macroconidia* causando podridão dos frutos de seriguela no Brasil;
- d) *Lasiodiplodia iraniensis* é a espécie de Botryosphaeriaceae com maior frequência associada a podridão dos frutos de seriguela.
- e) O município de Crato no estado do Ceará apresenta maior diversidade de Botryosphaeriaceae associadas a podridão dos frutos de seriguela, entre os municípios testados.

7 REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHZADEH, J. et al. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 25, n. 1, p. 1-10, 2010.
- ABREU, V. P. **Botryosphaeriales endofíticos e fitopatogênicos causadores de podridões pós-colheita em frutos de goiaba**. 2015. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.
- ALVES, E. S. *et al.* **Efeito das condições edafoclimáticas na ocorrência da resinose do cajueiro**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2015. 28 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 100).
- AMÂNCIO, L. C. S. **Diversidade de espécies de *Lasiodiplodia* associadas à seriguela**. 2016. Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal do Cariri, Crato, 2016.
- ARKAM, M. *et al.* Diversity of Botryosphaeriaceae causing grapevine trunk diseases and their spatial distribution under different climatic conditions in Algeria. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 161, n. 4, p. 933–952, 2021.
- AUGUSTO, F. *et al.* Screening of Brazilian fruit aromas using solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of chromatography A**, Amsterdam, v. 873, n. 1, p. 117-127, 2000.
- AVITIA-GARCÍA, E. Estructura floral y anatomia del aborto de ovulos y semillas en ciruela mexicana (*Spondias purpurea* L.). **Horticultura Mexicana**, Hermosillo, v. 5, n. 3, p. 282-288, 1997.
- BATISTA, D. C. *et al.* Importância, sintomatologia, epidemiologia e manejo da podridão-peduncular e morte-descendente na cultura da mangueira. Petrolina: **Embrapa Semiárido**, 2017. 6 p. (Embrapa Semiárido. Circular Técnica, 118).
- BATISTA, E.; LOPES, A.; ALVES, A. Botryosphaeriaceae species on forest trees in Portugal: diversity, distribution and pathogenicity. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 158, n. 3, p. 693–720, 2020.
- BERRAF-TEBBAL, A. *et al.* *Lasiodiplodia mitidjana* sp. nov. and other Botryosphaeriaceae species causing branch canker and dieback of *Citrus sinensis* in Algeria. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 15, n. 5, p. 1–18, 2020.
- BEZERRA, J. D. P. *et al.* Genetic diversity and pathogenicity of botryosphaeriaceae species associated with symptomatic citrus plants in Europe. **Plants**, Basel, v. 10, n. 3, p. 1–31, 2021.
- BICAS, J. L. *et al.* Constituintes voláteis de frutas exóticas do Brasil. **Food Research International**, Essex, v. 44, n. 7, p. 1843-1855, 2011.
- BICKFORD, D., *et al.* Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, Dordrecht, v. 22, n.3, p.148-155, 2006.

BRITO, A. C. Q. *et al.* Diversity and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with black root rot and stem cutting dry rot in *Manihot esculenta* in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 157, n. 3, p. 583–598, 2020.

BURGESS, T.I. *et al.* Tree invasions and biosecurity: eco-evolutionary dynamics of hitchhiking fungi. **AoB Plants**, Oxford, v. 8, 2016.

CAI, L. *et al.* The evolution of species concepts and species recognition criteria in plant pathogenic fungi. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 50, n. 1, p. 121-133, 2011.

CARDOSO, J. E. *et al.* Evaluation of resistance in dwarf cashew to gummosis in north-eastern Brazil. **Crop protection**, Oxford, v. 25, n. 8, p. 855-859, 2006.

CARDOSO, J. E. *et al.*, **Doenças causadas por fungos da família Botryosphaeriaceae em cajueiro**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2018. 17 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Circular Técnica, 47).

CARDOSO, J. E. *et al.*, Evaluation of resistance in dwarf cashew to gummosis in north-eastern Brazil. **Crop Protection**, Oxford, v. 25, p. 855-859, 2006.

CARDOSO, José Emilson; VIANA, Francisco Marto Pinto; MARTINS, Marlon Vagner Valentim. Doenças causadas por fungos da família Botryosphaeriaceae em cajueiro. **Embrapa Agroindústria Tropical-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2018.

Ceará amplia exportação de polpa de frutas em 2021; EUA e Alemanha entre os destinos. **FCDL CE (Federação das Câmaras de Dirigentes Lojistas do Ceará)**. 2021. Disponível em: < <https://aciasamcdl.org.br/ceara-amplia-exportacao-de-polpa-de-frutas-em-2021-eua-e-alemanha-entre-os-destinos/>>. Acesso em: 25 de out. 2021.

CEVA-ANTUNES, P. M. N. *et al.* Analysis of volatile composition of siriguela (*Spondias purpurea* L.) by solid phase microextraction (SPME). **LWT-Food Science and Technology**, v. 39, n. 4, p. 437-443, 2006.

COCKRELL, M. B. **Jocote (*Spondias purpúrea* L.), anona (*Annona cherimola* Mill) y cas (*Psidium friedrichsthalianum* (Berg.) Niedz.: Tres frutas campesinas de América**. San José: EUNA, 2000.

COELHO, I. L. *et al.* *Lasiodiplodia* species diversity associated with coconut leaf blight and stem-end rot in Northeastern Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 162, n. 1, p. 45–61, 2022.

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**, London, v. 65, n. 1, 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**, London, v. 66, n. 1, p. 90–104, 2017.

COUTINHO, I. B. L. **Caracterização Molecular e Controle de Fungos da Família Botryosphaeriaceae em Fruteiras Tropicais**. 2016. Tese (Doutorado em Agronomia/fitotecnia), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

- CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z. Hosts, species and genotypes: opinions versus data. **Australasian Plant Pathology**. Canberra, v. 34, p. 463–470, 2005.
- CROUS, P. W. *et al.* Botryosphaeriaceae: sistemática, patologia e genética. **Fungal Biology**, London, v. 121, n. 4, p. 305-465, 2017.
- CROUS, P. W. *et al.* Global food and fibre security threatened by current inefficiencies in fungal identification. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 371, n. 1709, p. 20160024, 2016.
- CROUS, P. W. *et al.* Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Studies in Mycology**, Utrechth, v. 55, p. 235-253, 2006.
- CROUS, P. W. *et al.* Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Studies in Mycology**, Utrechth, v. 55, p. 235-253, 2006.
- CRUYWAGEN, E. M. *et al.* Phylogenetic species recognition and hybridisation in Lasiodiplodia: a case study on species from baobabs. **Fungal biology**, London, v. 121, n. 4, p. 420-436, 2017.
- 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**, Utrechth, v. 45, p. 129-140, 2000.
- DESPREZ-LOUSTAU, M-L *et al.* Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. **Annals of forest science**, Les Ulis, v. 63, n. 6, p. 597-612, 2006.
- DISSANAYAKE, A. J. *et al.* Botryosphaeriaceae: Current status of genera and species. **Mycosphere**, Guizhou, v. 7, n. 7, p. 1001-1073, 2016.
- EINAX, E.; VOIGT, K. Oligonucleotide primers for the universal amplification of Btubulin genes facilitate phylogenetic analyses in the regnum Fungi. **Organisms Diversity & Evolution**, Jena, n. 3, p.185–194, 2003.
- FACHINELLO, J. C. *et al.* Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. SPE1, p. 109-120, 2011.
- FARR, D.F.; ROSSMAN, A.Y. **Fungal Databases** - Fungus-Host Distributions U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA, 2021. Disponível em: < <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases>>. Acesso em: 01 jan. 2022.
- FILGUEIRAS, H.A.C. Geração de técnicas de conservação pós-colheita para valorização do cultivo de cajá e ciriguela no Estado do Ceará. **Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical**, 2001.
- FREIRE, F.; CARDOSO, J. E. Diseases of Spondias-Spondias cytherea, Spondias mombin L., Spondias purpurea L., Spondias tuberosa A. Cam. and Spondias spp. in Brazil. **Agrotropica (Brazil)**, 1997.
- FREIRE, E. C. B S. *et al.* Avaliação da qualidade do cajá (*Spondias purpurea*, L.) em diferentes estádios de maturação. **Revista Verde de Agroecologia e desenvolvimento sustentável**, Pombal, v. 6, n. 2, p. 27-40, 2011.

- FREIRE, F. C. O. *et al.* **Novos hospedeiros do fungo *Lasiodiplodia theobromae* no Estado do Ceará.** Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2004. 6p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 91).
- FREIRE, F. C.O.; FILGUEIRAS, H. A. C. **Mancha-de-oidio em frutos de ciriguela: uma ocorrência inédita no Brasil.** Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2000. 2p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Pesquisa em andamento, 76).
- GLASS, N.L.; DONALDSON, G.C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p.1323–30, 1995.
- GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ *et al.* Characterization of Botryosphaeriaceae species associated with diseased loquat (*Eriobotrya japonica*) in Spain. **Plant Pathology**, London, v. 66, n. 1, p. 1394-1406, 2016
- GONÇALVES, F. J. T. *et al.* Patogenicidade de espécies de Botryosphaeriaceae endofíticas de plantas da Caatinga do estado do Ceará em manga e umbu-cajá. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 42, p. 77-89, 2016.
- HIBBETT, D. S. *et al.* A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological research**, London, v. 111, n. 5, p. 509-547, 2007.
- HYDE, K. D. *et al.* One stop shop: backbone trees for important phytopathogenic genera: I (2014). **Fungal Diversity**, Kunming, v. 67, n. 1, p. 21-125, 2014.
- JACOBS, K. A.; REHNER, S. A. Comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of Botryosphaeria and related taxa. **Mycologia**, Madison, v. 90, n. 4, p. 601-610, 1998.
- JAMI, F. *et al.* New Botryosphaeriales on native red milkwood (*Mimusops caffra*). **Australasian Plant Pathology**, Canberra, v. 47, n. 5, p. 475–484, 2018.
- JIANG, N. *et al.* *Lasiodiplodia cinnamomi* sp. nov. from *Cinnamomum camphora* in China. **Mycotaxon**, New York, v. 133, n. 2, p. 249–259, 2020.
- JIANG, N. *et al.* *Lasiodiplodia cinnamomi* sp. nov. from *Cinnamomum camphora* in China. **Mycotaxon**, New York, v. 133, n. 2, p. 249–259, 2018.
- KEELING, P.J.; INAGAKI, Y. A class of eukaryotic GTPase with a punctate distribution suggesting multiple functional replacements of translation elongation factor-1 alpha. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 101, p.15380-15385, 2004.
- KOZIOŁ, M. J.; MACÍÁ, M. J. Chemical composition, nutritional evaluation and economic prospects of *Spondias purpurea* (Anacardiaceae). **Economic Botanic**, St. Louis, v. 52, n. 4, p. 373-380, 1998.
- LEITE, A. R. Produção de ceriguela na região do Cariri. Relatório Técnico. **Instituto Frutal**, Juazeiro do Norte-CE, p. 1-133, 2009.

LEDERMAN, I. E. et al. Potencialidade das espécies de Spondias no desenvolvimento da fruticultura brasileira. **Spondias no Brasil: Umbú, Cajá e Espécies Afins**. Recife, Editora Universitária da UFRPE, p. 15-22, 2008.

LIMA, J. S. **Diversidade cultural, morfológica e patogênica de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* associados a frutíferas tropicais**. 2011. Dissertação (Mestrado em Agronomia e Fitotecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

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.

LINALDEDDU, B. T Diversity of *Botryosphaeriaceae* species associated with grapevine and other woody hosts in Italy, Algeria and Tunisia, with descriptions of *Lasiodiplodia exigua* and *Lasiodiplodia mediterranea* sp. nov. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v. 71, p. 201–214, 2015.

LIU, J-K *et al.* Towards a natural classification of Botryosphaeriales. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 57, n. 1, p. 149-210, 2012.

LOPES, M. P. B. **Fungos associados à podridão pós-colheita pertencentes à Família Botryosphaeriaceae em abacate**. 2018. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) - Faculdade de Agronomia da Unesp Campus de Botucatu, Botucatu, 2018.

LOPES, P. R.C.; OLIVEIRA, I.V DE M.; SARMENTO, D. H. A. Introdução e produção de fruteiras de clima temperado em regiões tropicais. *In*: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 24., 2016, São Luis. Fruticultura: fruteiras nativas e sustentabilidade. **Anais [...]** São Luis, MA: SBF, 2016.

MACHADO, A. R. *et al.* Botryosphaeriaceae species causing dieback on Annonaceae in Brazil. **Plant Pathology**, London, v. 68, n. 7, p. 1394–1406, 2019.

MACHADO, A. R. *et al.*, Bayesian analyses of five gene regions reveal a new phylogenetic species of *Macrophomina* associated with charcoal rot on oilseed crops in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 153, p. 89-100, 2018.

MACHADO, A. R. *et al.*, Botryosphaeriaceae species causing dieback on Annonaceae in Brazil. **Plant Pathology**, London, v. 68, p. 1394-1406, 2019.

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**, Kunming, v. 67, p. 231–247, 2014

MACÍA, M. J.; BARFOD, A. S. S. Economic botany of *Spondias purpurea* (Anacardiaceae) in Ecuador. **Economic Botanic**, St. Louis, v. 54, n. 4, p. 449-458, 2000.

MADDISON, D. R. *et al.* Ramping up biodiversity discovery via online quantum contributions. **Trends in Ecology & Evolution**, Dordrecht, v. 27, n. 2, p. 72-77, 2012.

MAHAMED, A. E. *et al.* Diversity, distribution and host association of Botryosphaeriaceae species causing oak decline across different forest ecosystems in Algeria. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 158, n. 3, p. 745–765, 2020.

- MAIA, A. C. L. Resultados da Pesquisa Municipal Agrícola 2019. **ENFOQUE ECONÔMICO**. Nº224. 2020. Disponível em: < https://www.ipece.ce.gov.br/wp-content/uploads/sites/45/2020/10/Enfoque_EconomicoN224_08102020.pdf >. Acesso em: 11 nov. 2021.
- MAIA, L. K. R. **Identificação de fungos associados a plantas de mangues no estado do Ceará**. 2019. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.
- MALDONADO-ASTUDILLO, Y. I. *et al.* Postharvest physiology and technology of *Spondias purpurea* L. and *S. mombin* L. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 174, p. 193-206, 2014.
- MARISCO, G.; PUNGARTNIK, C. *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae): traditional uses, chemical composition and biological activities. **Scientia Amazonia**, Manaus, v. 4, n. 2, p. 10-18, 2015.
- MARQUES, M. W. *et al.*, First report of mango dieback caused by *Pseudofusicoccum stromaticum* in Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 96, p.144–145, 2012.
- MARQUES, M.W. *et al.* *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* and *Pseudofusicoccum* species associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 61, p.195- 208, 2013b.
- MARQUES, M.W. *et al.* Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, Kunming, v.61, p.181–193, 2013a.
- MARTINS, L. P. *et al.* Fisiologia do dano pelo frio em ciriguela (*Spondias purpurea* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, p. 23-26, 2003a.
- MARTINS, L. P. *et al.* Desenvolvimento de frutos de ciriguela (*Spondias purpurea* L.). **Revista Brasileira de fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, p. 11-14, 2003b.
- MEHL, J. W. M. *et al.* Cankers and Other Diseases Caused by the Botryosphaeriaceae. *In: Infectious forest diseases*, Gonthier, P.; Nicolotti, G. (Eds.). Boston: CAB, 2013, p. 298-317.
- MELLO, J. F. *et al.* Identification and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with root and stem rot of sweet potato in Brazil. **Plant Pathology**, London, v. 70, n. 7, p. 1601–1615, 2021.
- MELO, J.G.M. **Diversidade genética de *Lasiodiplodia theobromae* associado ao cajueiro**. 2010. 60 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2010.
- MILLER, A. J.; KNOUFT, J. H. GIS-based characterization of the geographic distributions of wild and cultivated populations of the Mesoamerican fruit tree *Spondias purpurea* (Anacardiaceae). **American Journal of Botany**, New York, v. 93, n. 12, p. 1757-1767, 2006.
- MILLER, A.; SCHAAL, B. Domesticação de uma árvore frutífera cultivada na Mesoamérica, *Spondias purpurea*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 102, n. 36, p. 12801-12806, 2005.

- MOREIRA, A. C. C. G. **Caracterização de frutos de genótipo de cajá- umbuzeiras: teor de fitoquímicos bioativos e potencial antioxidante**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2011.
- MYCOBANK. **Mycobank database**. Disponível em: <http://mycobank.org>. Acesso em: 3 de jan 2022.
- 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**, London, v.121, p. 437-451, 2017.
- NETTO, M. S. B. **Espécies de *Lasiodiplodia* associadas à podridão peduncular em mamão no Nordeste do Brasil**. 2012. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) -Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.
- NETTO, M. S.B *et al.* Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-endrot in Brazil, **Fungal Diversity**, Kunming, v. 67, n. 1, p. 127-141, 2014.
- O'DONNELL, K. *et al.* Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Washington, v.95, p. 2044–2049, 1998.
- OMENA, C. M. B. *et al.* Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol extract of peel, Pulp and seeds of exotic Brazilian fruits: antioxidante, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities in fruits. **Food Research International**, Essex, v. 49, n. 1, p. 334-344, 2012.
- OLIVEIRA, M. Z. A. de *et al.* Fungo *Lasiodiplodia theobromae*: um problema para agricultura baiana. **Bahia Agricola**, v. 9, n.2, p. 24-29, mar. 2013.
- OLIVEIRA, T.A.S. *et al.* Efeito do estágio de maturação, tipo de inóculo e local de inoculação na severidade da podridão peduncular em manga. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa, v.33, n.6, p.409-414, 2008.
- PAVLIC, D. *et al.* Multiple gene genealogies and phenotypic data reveal cryptic species of the Botryosphaeriaceae: a case study on the *Neofusicoccum parvum*/*N. ribis* complex. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Boston, v. 51, n. 2, p. 259-268, 2009^a.
- PAVLIC, D. *et al.* Molecular and phenotypic characterization of three phylogenetic species discovered within the *Neofusicoccum parvum*/*N. ribis* complex. **Mycologia**, Madison, v. 101, n. 5, p. 636-647, 2009^b.
- PELL, S. K *et al.* Anacardiaceae. *In*: **Kubitzki, K. (Ed.). The families and genera of vascular plants**. v. 10, Berlin: Springer-Verlag, 2011. p. 7-50.
- PEREIRA, A.L.; SILVA, G. S.; RIBEIRO, V. Q. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, p. 572-578, 2006.

- PHILLIPS, A. *et al.* Two New Species of Botryosphaeria with Brown, 1-Septate Ascospores and Dothiorella Anamorphs, **Mycologia**, Madison, v. 97, n. 2, p. 513-529, 2005.
- PHILLIPS, A. J. L. *et al.* The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 76, p. 51-167, 2013.
- PINTO, A. C. Q. Seriguela, fruta exótica com crescente valor no mercado. **Informativo da Sociedade Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal**, v. 16, n. 3, p. 23-24, 1997.
- POPENOE, J. The genus spondias in Florida. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v.92, p. 277-279, 1979.
- RAM, C. Características culturais, esporulação e violência do “strain” do Botryodiplodia theobromae, agente causal da queima-das-folhas do coqueiro (Cocos nucifera). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.18, p.143-146, 1993.
- ROSADO, A.W. C. *et al.* Phylogeny, identification and pathogenicity of Lasiodiplodia associated with postharvest stem-end of coconut in Brazil, **Plant Disease**, St. Paul, v. 100, n. 3, p. 561-568, 2016.
- SAKALIDIS, M. L. *et al.* The challenge of understanding the origin, pathways and extent of fungal invasions: global populations of the Neofusicoccum parvum–N. ribis species complex. **Diversity and Distributions**, Oxford, v. 19, n. 8, p. 873-883, 2013.
- SAKALIDIS, M. L.; HARDY, G. E. St J. H.; BURGESS, T. I. Use of the Genealogical Sorting Index (GSI) to delineate species boundaries in the Neofusicoccum parvum–Neofusicoccum ribis species complex. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Boston, v. 60, n. 3, p. 333-344, 2011.
- SAMPAIO, S. A.; BORA, P. S.; HOLSCHUH, H. J. Postharvest respiration and maturation of some lesser-known exotic fruits from Brazil–ciriguela (*Spondias purpurea* L.), **Revista Ceres**, Viçosa, v. 55, n. 2, p. 141-145, 2008.
- SANTOS, A. F. *et al.* **As doenças da pupunheira (Bactris gasipaes Kunth): antracnose e podridão da medula**. Colombo, 2001. 3p. (Embrapa Florestas-Comunicado Técnico, 63).
- SANTOS, C. A. F.; OLIVEIRA, V. R. Inter-relações genéticas entre espécies do gênero Spondias com base em marcadores AFLP, **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 731-735, 2008.
- SANTOS, T. C. *et al.* Determinação da atividade de CMCase e FPase da estipe fúngica Rhizopus sp. através da bioconversão do resíduo de seriguela (*Spondias purpúrea* L.). **UNOPAR Científica- Ciências biológicas e da saúde**, Londrina, v. 13, n. 3, 2011.
- SANTOS-SEREJO, J. A. *et al.* (Eds.). **Fruticultura Tropical: espécies regionais e exóticas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009.
- SCHOCH, C. L. *et al.* A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. **Mycologia**, Madison, v. 98, n. 6, p. 1041-1052, 2006.

- SHARMA, G.; PINNAKA, A. K.; SHENOY, B. D. Resolving the *Colletotrichum siamense* species complex using ApMat marker. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 71, n. 1, p. 247-264, 2015.
- SILVA, G. A. *et al.* Gênero Spondias: aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 10, n. 1, 2014.
- SLIPPERS B, F. G. *et al.* Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. **Mycologia**, Madison, v. 96, 83 –101, 2004 a.
- SLIPPERS B, F. G. *et al.* Multiple gene sequences delimit *Botryosphaeria australis* sp. nov. from *B. lutea*. **Mycologia**, Madison, v. 96, 1028 – 1039, 2004 c.
- SLIPPERS B, F. G. *et al.* Speciation and distribution of *Botryosphaeria* spp. on native and introduced Eucalyptustrees. **Studies in Mycology**, Utrechth, v. 50, 343 – 358, 2004 b.
- SLIPPERS, B. *et al.* Confronting the constraints of morphological taxonomy in the Botryosphaeriales. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, Leiden, v. 33, p. 155, 2014.
- SLIPPERS, B. *et al.* Diversity in the Botryosphaeriales: looking back, looking forward. **Fungal biology**, London, v. 121, n. 4, p. 307-321, 2017.
- SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. **Fungal biology reviews**, London, v. 21, n. 2-3, p. 90-106, 2007.
- SOARES, A. A. J. **Avaliação Físico-Química e Bromatológica da Polpa de Spondias purpurea L(ciriguela) na Região do Semiárido Central Paraibano**. 2011. 64 f. Dissertação (Mestre em ciências florestais) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural. Patos, 2011.
- SOUZA, F. X.de. **Crescimento e Desenvolvimento de Clones enxertados de Cajazeira na Chapada do Apodi, Ceará**, Fortaleza: Tese de Doutorado - Universidade Federal do Ceará, 80 f, 2005.
- SOUZA, Elisangeles Baptista de. Culturas com Suporte Fitossanitário Insuficiente–CSFI: Normativa e situação atual. In: **Anais do Congresso Brasileiro de Fitossanidade**. 2019.
- SOUZA, F. X de. Spondias agroindustriais e os seus métodos de propagação (frutas tropicais: cajá, ciriguela, cajarana, umbu, umbu-cajá e umbuguela). **Embrapa Agroindústria Tropical- Documentos (INFOTECA-E)**, 1998.
- STADEN, R.; BEAL, K. F.; BONFIELD, J. K. The staden package, 1998. In: Misener, S.; Krawetz, S. A. (ed.). **Bioinformatics Methods and Protocols**. Totowa: Humana Press, 1998. p. 115-130.
- STAMATAKIS, A. **RAxML version 8**: a tool for phylogenetic analysis and postanalysis of large Phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30, p. 1312-1313, 2014.

STURROCK, R. N. *et al.* Climate change and forest diseases. **Plant pathology**, London, v. 60, n. 1, p. 133-149, 2011.

SWART, P. S. *et al.* Factors associated with *Sphaeropsis sapinea* infection of pine trees in South África DAVIES. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 19, n. 4, p. 505-510, 1987.

TERAO, D.; BATISTA, D.C.; RIBEIRO, I. J. A. Doenças da mangueira. *In*: AMORIM, L. *et al.* (Eds.). **Manual de Fitopatologia**. 5. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2016. v. 2, p. 523-533.

THOMPSON, J. D. *et al.* The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 1997.

VALENCIA, A. L. *et al.* Characterization and pathogenicity of botryosphaeriaceae species obtained from avocado trees with branch canker and dieback and from avocado fruit with stem end rot in Chile. **Plant Disease**, St. Paul, v. 103, n. 5, p. 996–1005, 2019.

VIANA, K. Pesquisa quer qualificar seriguela. **Diário do Nordeste**, 2010. Disponível em: <<https://diariodonordeste.verdesmares.com.br/regiao/pesquisa-quer-qualificar-seriguela-1.708753>>. Acesso em: 02 jan. 2022.

VIDAL, M. F. **Produção comercial de frutas na área de atuação do BNB**. Caderno Sensorial ETENE. n.168, 2021.

WANG *et al.* *Lasiodiplodia* spp. associated with *Aquilaria crassna* in Laos. **Mycological Progress**. v. 18, n. 2, p. 683–701, 2019.

WANG, Y. *et al.* Multigene phylogenetics and morphology reveal five novel *Lasiodiplodia* species associated with blueberries. **Life**, v. 11, n. 7, p. 1–16, 2021.

WHITE, Bruce Alan (Ed.). **PCR protocols: current methods and applications**. Springer Science & Business Media, 1993.

WU, N. *et al.* Morpho-phylogenetic evidence reveals *Lasiodiplodia Chiangraiensis* sp. nov. (Botryosphaeriaceae) associated with woody hosts in northern Thailand. **Phytotaxa**, Auckland, v. 508, n. 2, p. 142–154, 2021.

XIAO, X. E. *et al.* Species of Botryosphaeriaceae associated with citrus branch diseases in China. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, Leiden, p. 106–135, 2021.

YANG, T. *et al.* Families, genera, and species of Botryosphaeriales. **Fungal biology**, London, v. 121, n. 4, p. 322-346, 2017.

YOUNG, N. D.; HEALY, J. GapCoder automates the use of indel characters in phylogenetic analysis. **BMC Bioinformatics**, Chicago, v. 4, n. 1, p. 6, 2003.

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**, St. Paul, v. 98, n. 6, p. 716-726, 2014.

ZHANG, W. *et al.* Avaliando espécies em Botryosphaeriales. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, Leiden, v. 46, n. 1, p. 63-115, 2021.

ZHAO, L. *et al.* Stem blight of blueberry caused by *Lasiodiplodia vaccinii* sp. nov. in China. **Plant Disease**, St. Paul, v. 103, n. 8, p. 2041–2050, 2019.

ZHAO, P. *et al.* Fungi of quarantine concern for China I: *Dothideomycetes*. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, Leiden, n.47, 2021.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CARIRI

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que a dissertação intitulada “Espécies de Botryosphaeriaceae Associadas à Podridão em Seriguela”, apresentada como Trabalho de Conclusão de Mestrado (Dissertação), escrito sob minha orientação, está em versão final, de acordo com as solicitações realizadas pela banca examinadora.

Informo também que procedi à revisão final do texto, constatando que atende às especificações das normas da ABNT para apresentação de trabalhos acadêmicos da UFCA, no que diz respeito ao conteúdo e à formatação.

Crato-CE, 03 de junho de 2026.

Documento assinado digitalmente
gov.br KAMILA CAMARA CORREIA
Data: 03/06/2026 08:12:33-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Kamila Câmara Correia
Orientadora