

PATOGENICIDADE E CARACTERIZAÇÃO MORFOMOLECULAR  
DE FUNGOS BOTRIOSPHAERIACÉOS ASSOCIADOS AO  
COQUEIRO E FILOGEOGRAFIA DE *Lasiodiplodia theobromae*

**PEDRO HENRIQUE DIAS DOS SANTOS**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO - UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
ABRIL – 2017

PATOGENICIDADE E CARACTERIZAÇÃO MORFOMOLECULAR  
DE FUNGOS BOTRIOSPHAERIACEOS ASSOCIADOS AO  
COQUEIRO E FILOGEOGRAFIA DE *Lasiodiplodia theobromae*

**PEDRO HENRIQUE DIAS DOS SANTOS**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da  
Universidade Estadual do Norte  
Fluminense Darcy Ribeiro como parte das  
exigências para obtenção do título de  
Doutor em Produção Vegetal”

Orientador: Prof. Silvaldo Felipe da Silveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
ABRIL – 2017

PATOGENICIDADE E CARACTERIZAÇÃO MORFOMOLECULAR  
DE FUNGOS BOTRIOSPHAERIACEOS ASSOCIADOS AO  
COQUEIRO E FILOGEOGRAFIA DE *Lasiodiplodia theobromae*

**PEDRO HENRIQUE DIAS DOS SANTOS**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da  
Universidade Estadual do Norte  
Fluminense Darcy Ribeiro como parte das  
exigências para obtenção do título de  
Doutor em Produção Vegetal”

Aprovada em: 05/04/2017

Banca examinadora:

---

Prof. Danilo Batista Pinho (D. Sc., Fitopatologia) – UNB

---

Prof. Marcelo Vivas (D. Sc., Genética e Melhoramento de Plantas) – UENF

---

Dr. Vicente Mussi Dias (D. Sc., Produção Vegetal - Fitossanidade) – UENF

---

Prof. Silvaldo Felipe da Silveira (D. Sc., Fitopatologia) – UENF  
Orientador

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCH / UENF**

057/2017

S237 Santos, Pedro Henrique Dias dos.

Patogenicidade e caracterização morfomolecular de fungos botriosphaeriaceos associados ao coqueiro e filogeografia de *Lasiodiplodia theobromae* / Pedro Henrique Dias dos Santos – Campos dos Goytacazes, RJ, 2017.

86 f.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2017.

Orientador: Silvaldo Felipe da Silveira.

Bibliografia: f. 82 - 86.

1. Filogenia Molecular. 2. Filogeografia Molecular. 3. Micologia. 4. Epidemiologia. 5. Doença Fúngica. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD – 634.61

À minhas amadas Cris, Pilli e Bia pelo incansável apoio e amor incondicional;  
DEDICO.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por sua presença forte e constante em minha vida;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, pela oportunidade de realização do curso;

A CAPES pela concessão da bolsa de doutorado;

Ao meu orientador professor Silvaldo Felipe da Silveira, pela orientação, confiança em deixar que eu seguisse num projeto novo e me deu “carta branca” para que eu pudesse me aperfeiçoar e realizar o trabalho;

À minha amada Mãe, Cristina Dias, que sempre será o meu maior espelho e orgulho, e sempre que os momentos ruins vieram esteve lá para me ajudar a continuar e que ainda hoje se sacrifica para realizar os sonhos dos filhos e por sempre vibrar comigo nas conquistas como se fossem suas também;

À minha linda e amada irmã Paula que sempre esteve ao meu lado como uma verdadeira companheira inseparável e que por muitas vezes segurou as pontas comigo nos momentos de angústia;

À minha amada Beatriz Murizini por me mostrar o lado bom de estar com alguém e por todo o apoio insubstituível e constante nos experimentos, viagens, crises de ansiedade, lanchinhos, enfim por sua presença na minha vida;

Aos queridos Ana Margarida, Jacintho e Rachel pelo apoio e carinho;

Ao grande amigo e Professor Marcelo Vivas pela amizade, apoio, conversas e por sempre estar disposto a passar seus conhecimentos principalmente por confiar em mim até mesmo mais do que eu;

Aos amigos do laboratório, Tiago, Janieli, Gustavo e principalmente Tathianne pela convivência, amizade, parceria e cafezinhos que tomamos;

Ao amigo Danilo Pinho pelo apoio e incentivo de sempre e por ter sido um exemplo de profissional e que acabou me despertando para o ramo da filogenia;

Ao meu querido amigo Vicente Mussi pela paciência, conselhos, risadas e confiança que sempre depositou em mim;

Ao professor Messias Gonzaga Pereira, por todo o suporte e incentivo;

À minha amiga irmã, Jaqueline Souza que junto com o lindo Logan alegravam todos os meus dias;

Impossível terminar estes agradecimentos sem antes agradecer a cada profissional que contribuiu na minha formação para o desenvolvimento do trabalho ao longo destes quatro anos: Dr<sup>a</sup> Vânia Azevedo, Dr. Marcelo Simon e Dr. Peter Inglis (EMBRAPA – Cenargen) pelos ensinamentos e dicas sobre genética de populações e filogenia, Dr<sup>a</sup> Viviane Talamini (EMBRAPA – Tabuleiros Costeiros) e Dr. Eudes Carvalho (EMBRAPA – Quarentena Vegetal) pelo envio dos isolados, Professora Karla Yotoko (UFV) pela belíssima forma como me ensinou a usar a filogenia de maneira ética e correta, Dr<sup>a</sup> Marcela Boechat (LMGV – UENF) por toda a ajuda nos PCRs e principalmente a grande amiga Dr<sup>a</sup> Fernanda Santana (LMGV – UENF) por toda a paciência dicas risadas e principalmente por ter me mostrado que a biologia molecular não precisa ser um sofrimento.

A todos que de certa maneira passaram pela minha vida, deixaram marcas e fizeram com que eu me tornasse uma pessoa melhor, MUITO OBRIGADO.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
2.1. O Cultivo de coco ( <i>Cocos nucifera</i> ) .....	4
2.2. Queima-das-folhas do coqueiro [ <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Pat.) Griffon e Maub] .....	5
2.4. Caracterização molecular de fungos .....	8
2.4.1 Aplicação da PCR na identificação de fungos .....	9
2.5. Filogenética Molecular .....	9
2.5.1. Identificação de posições homólogas (Alinhamento) .....	12
2.5.2 Distâncias Genéticas e modelos de substituição nucleotídica .....	13
2.5.3 Reconstrução Filogenética.....	16
2.5.4 Confiabilidade da Árvore.....	20
2.6. Filogeografia Molecular .....	21
3. TRABALHOS .....	23
3.1 Phylogeography and Population Structure Analysis Reveals Diversity by Mutations in <i>Lasiodiplodia theobromae</i> With Distinct Sources of Selection * ....	23
3.2 IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS BOTRYOSPHAERIACEOUS ASSOCIADOS À QUEIMA-DAS-FOLHAS DO COQUEIRO E A PODRIDÃO PEDUNCULAR.....	44
4. CONCLUSÕES GERAIS.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72



## RESUMO

SANTOS, Pedro Henrique Dias dos. D. Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Abril de 2017 Patogenicidade e caracterização morfomolecular de fungos botriosphaeriaceos associados ao coqueiro e filogeografia de *Lasiodiplodia theobromae*. Orientador: Prof. Silvaldo Felipe da Silveira.

Na cocoicultura, a produtividade é diretamente relacionada ao número de folhas existentes na planta. Doenças foliares causadas por fungos causam morte prematura das folhas, e conseqüentemente, redução da área foliar e diminuição da produtividade. Para que estratégias eficientes de controle sejam estabelecidas, é necessário um maior conhecimento etiológico da doença. A queima das folhas causada por *Lasiodiplodia theobromae* é um dos principais problemas nas regiões norte e nordeste do Brasil, ocasionando necroses, queima, ressecamento e a queda prematura das folhas. Já, no norte fluminense, a doença aparenta ser secundária e de ocorrência esporádica. Estudos recentes comprovam a existência de espécies “crípticas” em *L. theobromae*, havendo indicações de que tanto por morfologia, quando por patogenicidade, os isolados de coqueiro originários do nordeste do Brasil diferenciam-se de outros descritos na mesma espécie. Devido a essas diferenças sintomatológicas, e a existência de espécies “crípticas” acredita-se haver diferenças nos isolados do norte e nordeste com

os da costa litorânea do sudeste. Estudos epidemiológicos, moleculares e morfológicos são fundamentais para a determinação das relações entre micro-organismos patogênicos e suas plantas hospedeiras. O conhecimento das formas de disseminação e tipo de patógeno (encontrado em frutos, estipe e ráquis) podem elucidar questões importantes para se definir melhores estratégias de manejo da doença. Estudos aprofundados, envolvendo marcadores genético-moleculares e classificação filogenética já são amplamente usados e aceitos como ferramentas importantes para a caracterização de fungos e o conhecimento de suas populações. Baseando-se no exposto, neste trabalho foram propostas seguintes ações de pesquisa: 1- o estudo da diversidade genética e da distribuição espacial e temporal de *L. theobromae* no Brasil e no mundo, inferidos a partir da comparação de sequências do gene Fator de alongação  $\alpha$  (TEF-1 $\alpha$ ) 2- Avaliar a patogenicidade (a coqueiro) e a virulência a plantas e em frutos, dos isolados representativos dos diferentes grupos morfo-fisiológicos; 3- Efetuar estudos de diversidade genética e filogenia de isolados patogênicos ao coqueiro provenientes de diferentes regiões do Brasil, comparando a outros isolados da mesma espécie, bem como relacionando-os os eventuais grupos a sintomatologia, danos e patogenicidade. Para tanto, coletou-se amostras de plantas e frutos apresentando sintomas característicos da doença nas principais regiões produtoras do país (Norte, Nordeste e Sudeste). Os isolados obtidos foram mantidos em cultura pura e as regiões gênicas alvo (ITS e TEF-1 $\alpha$ ) foram sequenciadas para que se realizassem os estudos filogenéticos e filogeográficos. *Lasiodiplodia theobromae* é a espécie mais abundante encontrada causando sintomas em coqueiro; *Fusicoccum fabicercianum* foi encontrado pela primeira vez causando sintomas em coqueiro; O haplótipo “H3” é o ancestral em relação aos outros haplótipos de *L. theobromae*. A principal causa de diversidade de *L. theobromae* está na forte influência das mutações ocorridas nas populações; A maior diversidade do fungo encontra-se nos estados do Nordeste e Sudeste do Brasil.

## ABSTRACT

SANTOS, Pedro Henrique Dias dos. D. Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. April, 2017 Pathogenicity and morphomolecular characterization of botryosphaeriaceous fungi associated with coconut and *Lasiodiplodia theobromae* phylogeography. Advisor: Prof. Silvaldo Felipe da Silveira.

In coconut, productivity is directly related to the number of leaves in the plant. Leaf diseases caused by fungi cause premature death of the leaves, and consequently, leaf area reduction and low productivity. For efficient control strategies to be established, an etiological knowledge of the disease is necessary. The “coconut leaves burning” (CLB) (*Lasiodiplodia theobromae*) in northern and northeastern Brazilian regions presents a serious problem, causing necrosis, burning, drying and premature fall of the leaves. Already, in the north of the state, the disease appears to be secondary and of sporadic occurrence. Studies have shown the existence of "cryptic" species in *L. theobromae*, and there are indications that coconut isolates originating in northeastern Brazil differ from morphology and pathogenicity in others described in the same species. Due to these symptomatological differences, and the existence of "cryptic" species, it is believed that there are differences in isolates of the north and northeast with those of the Southeast coast. Epidemiological, molecular and morphological

studies are fundamental for the determination of the relationships between pathogenic microorganisms and their host plants. The knowledge of the forms of dissemination and type of pathogen (found in fruits, stipe and rachis) can elucidate important questions to define better strategies of disease management. In-depth studies involving genetic molecular markers and phylogenetic classification are already widely used and accepted as important tools for characterizing fungi and knowledge of their populations. This work the following research actions were proposed: 1- the study of genetic diversity, spatial and temporal distribution of *L. theobromae* in Brazil and in the world, inferred from the elongation factor gene (TEF-1 $\alpha$ ) 2- Evaluate the pathogenicity (to coconut) and the virulence of plants and fruits of the isolates from different morphological and physiological groups; 3 - To carry out studies of genetic diversity and phylogeny of pathogenic isolates of coconut from different Brazilian regions, comparing them to other isolates of the same species, as well as relating the possible groups to symptomatology, damage and pathogenicity. For that, samples of plants and fruits with characteristic CLB symptoms were collected in the main producing regions of the country (North, Northeast and Southeast). The obtained isolates were kept in pure culture and the target gene regions (ITS and TEF-1 $\alpha$ ) were sequenced for phylogenetic and phylogeographic studies. *Lasiodiplodia theobromae* is the most abundant species found causing symptoms in coconut palm; *Fusicoccum fabicercianum* was found for the first time causing symptoms in coconut palm; The haplotype "H3" is the ancestor in relation to the other *L. theobromae* haplotypes. The main cause of diversity of *L. theobromae* is the strong influence of the mutations occurring in the populations. The most diversity of the fungus is found in the Northeastern and Southeastern states of Brazil.

## 1. INTRODUÇÃO

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma palmeira perene originada do Sudeste Asiático e introduzida no Brasil pelos colonizadores portugueses em meados do século XVI (Costa, et al., 2005). A planta é considerada uma das espécies perenes de maior relevância do mundo, pois detém a capacidade de gerar emprego e, conseqüentemente, renda em vários países, seja através do consumo de seus frutos in natura ou pela industrialização do fruto bem como de outros órgãos desta planta (raiz, estipe, inflorescência, folhas e palmito), originando mais de 100 produtos e subprodutos de significativo valor econômico. Além disso, o coqueiro é utilizado como planta paisagística adornando espaços públicos e privados (Costa et al.,2005).

Segundo a FAO (UNCTAD, 2014), o coqueiro ocupa no mundo uma área plantada em torno de 11,8 milhões de hectares, sendo que mais de 80% da produção concentra-se em países do leste e Sudeste Asiático, sendo a produção mundial de coco de aproximadamente 61,7 milhões de toneladas. O Brasil ocupa o 4º lugar no ranking mundial de produtores de coco, contribuindo com cerca de 1.973.370 toneladas em seus 284.058 ha de área plantada (UNCTAD, 2014). Especificamente na região Sudeste, o Rio de Janeiro é o segundo maior estado produtor com uma produção de 70.010 toneladas enquanto o Espírito Santo é o maior estado produtor da região, com uma produção de 173.716t (IBGE, 2015).

Mundialmente, a produtividade do coqueiro é prejudicada por pragas e doenças cujas intensidades variam de acordo com as mudanças climáticas os tratos culturais (Frison et al., 1993; Ikin 1997; Mariau 1999; Batugal et al., 2005). Dentre as doenças do coqueiro que ocorrem frequentemente no Brasil, a “Queima-das-folhas” causada por *Lasiodiplodia theobromae* destaca-se por afetar negativamente a produção, uma vez que provoca abscisão prematura das folhas inferiores, reduzindo a área fotossintética em até 50% e deixando os cachos sem sustentação. Conseqüentemente, os frutos caem antes do ponto de colheita (Sousa Filho et al., 1979; Mariano e Silveira, 2005)

Como agravante, durante toda a fase produtiva do coqueiro, em decorrência da severidade da queima das folhas, os produtores necessitam realizar o tutoramento dos cachos nas plantas mais altas e com poucas folhas, o qual é feito com estacas de bambú ou madeira. Estas estacas são apoiadas no estipe e causam ferimentos na casca da planta, predispondo à invasão e à podridão causada pelo fungo *Ceratocystis paradoxa* (Dade) C. Moreau. Por isso, especialmente no norte fluminense, devem ser tomadas medidas visando o controle das doenças foliares e o ponto de partida é o entendimento do patossistema local. Neste trabalho, a ideia principal é de que há variabilidade genética suficiente que permita diferenciar isolados de *L. theobromae* de coqueiro das regiões litorâneas do Brasil, especialmente comparando-se aqueles obtidos em coqueirais atacados do nordeste com os do sudeste do país. Ademais, estudos comprovam a existência de espécies “crípticas” em *L. theobromae* (Alves et al, 2008), havendo indicações de que tanto por morfologia, quando por patogenicidade, os isolados de coqueiro originários do nordeste do Brasil diferenciam-se de outros descritos na mesma espécie (Subileau & Lacoste, 1993; Subileau et al., 1994). Estudos aprofundados, envolvendo marcadores genético-moleculares e classificação filogenética já são amplamente usados e aceitos como ferramentas importantes para a caracterização de fungos, sendo protagonistas de inúmeros trabalhos nessa área (Metzenberg, 1991; Magnani et al., 2005; Nozaki et al., 2006; Tiago et al., 2011; Ismail et al., 2012; Pinho et al., 2012; Pinho et al., 2014; Rodrigues et al., 2014; Rosado et al. 2015; Silva et al.,

2015). Estas técnicas foram necessárias e utilizadas para caracterizar melhor os isolados patogênicos à *C. nucifera* L. neste trabalho.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. O Cultivo de coco (*Cocos nucifera*)

À época do descobrimento, não existia coqueiros (*Cocus nucifera* L.) no Brasil. A introdução e adaptação do coqueiro aos solos arenosos costeiros do Brasil permitiu o início da produção de coco no país, ainda que de forma desajeitada e desprovida de recursos (Siqueira et al., 2002). As primeiras citações de plantios de coqueiro no Brasil datam de 1587: “ as palmeiras que dão os cocos se dão bem na Bahia, melhor que na Índia, porque metendo um coco debaixo da terra, a palmeira que dele nasce dá coco em cinco e seis anos, e na Índia não dão, estas plantas, frutos em vinte anos” (Bondar, 1955).

O coqueiro (*C. nucifera*) possui grande importância mundial, devido à geração de empregos e renda em vários países do globo, além de sua versatilidade de uso, pois os frutos podem ser consumidos in natura ou industrializados na forma de mais de 100 produtos e subprodutos. Da planta aproveitam-se todos os órgãos como a raiz, o estipe, a inflorescência e as folhas que geram diversos subprodutos ou derivados de interesse econômico, sendo também utilizado como planta paisagística (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Divide-se a espécie em três subvariedades: verde, amarela e vermelha (Siqueira et al., 2002). Castro (2007) afirma que a área de plantio da variedade coqueiro-anão verde vem crescendo nos últimos anos em função do aumento no consumo de água de coco, pois tal variedade mostra maior aceitação, bem como vantagens sob os aspectos de produtividade e precocidade. Esta variedade começa a produzir mais cedo, entre três e quatro anos, enquanto o gigante leva cerca de sete anos para o início da produção. Além disso, produz maior número de frutos/planta/ano e apresenta menor altura da planta, favorecendo a colheita.

O cultivo do coqueiro sofre interferências severas de doenças, principalmente as causadas por fungos, as quais podem comprometer o potencial de rendimento da cultura, principalmente na variedade anão-verde, devido a sua uniformidade genética, ao espaçamento utilizado (menor do que o coqueiro-gigante) e pela exploração intensiva (colheita dos frutos verdes a cada 20 dias).

## **2.2. Queima-das-folhas do coqueiro [*Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon e Maubl]**

A doença foi relatada pela primeira vez no Brasil por Souza Filho et al., em 1975, no estado de Sergipe (Souza Filho et al., 1979). O agente etiológico *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon e Maubl, é um fungo cosmopolita, polífago e oportunista, com pouca especialização patogênica e, por conseguinte, geralmente associado a processos patogênicos em plantas estressadas e submetidas a ferimentos (Tavares et al., 1994; Pereira et al., 2006). Em meados dos anos 80 era considerado um patógeno fraco ou de importância secundária (Holliday, 1980; Pereira et al., 2006; Almeida, 2010), mas atualmente apresenta-se como um dos mais sérios problemas da cultura do coqueiro em todo o Nordeste brasileiro, provocando empardecimento, ressecamento e morte prematura das folhas, e

consequentemente, redução da área foliar e baixa produtividade (Ram, 1994; Warwick, 1997; Warwick & Leal, 2003; Rosado et al., 2016).

Em cultura pura, em meio de BDA, as colônias de *L. theobromae* são acinzentadas a negras, com abundante micélio aéreo e no reverso da cultura em placa de Petri são foscas ou negras. Formam picnídios frequentemente agregados, escuros, estomáticos, ostiolados, com formato ligeiramente ovoide. Os conidióforos são curtos e simples, contendo na extremidade um único conídio. Os conídios apresentam morfologias diferentes dependendo do nível de maturidade destes. Os imaturos são sub-hialinos, unicelulares, ovoides e apresentam parede dupla, enquanto os maduros tornam-se marrom-escuro, bicelulares, com um septo transversal, medindo entre 23-29 µm de comprimento por 13-15 µm de largura com parede apresentando estrias longitudinais. Germinam em água emitindo tubo germinativo (Subileau e Lacoste, 1993; Menezes et al., 1997, Rodrigues, 2003; Mariano & Silveira, 2005; Halfeld-Vieira e Nechet, 2005).

As estruturas mais encontradas sobre as lesões da queima-das-folhas são picnídios de *L. theobromae*, sendo que no estado do Pará relata-se ocorrência de peritécios, atribuídos ao teleomorfo ascomiceto *Botryosphaeria cocogena* (Subileau et al., 1994), o qual apresenta ascostroma uniloculado, escuros e subjacentes à epiderme, ostiolados, com ascos unitunicados clavados, contendo oito ascósporos unicelulares, hialinos e fusiformes à ovoides (Subileau et al., 1994; Mariano & Silveira, 2005). No Brasil, *B. cocogena* parece ser encontrado com frequência no estado do Pará e, nas épocas chuvosas, em Sergipe (Warwick, 1997).

Quando se trata de *B. cocogena*, deve-se destacar que este nome não está validado e não é citado no index fungorum, sendo assim, a espécie aceita como teleomórfica à *L. theobromae* é considerada ainda em aberto, sendo apontada a família Botryosphaeriaceae como o anamorfo. Segundo Alves et al. (2008), o nome correto a ser aplicado ao anamorfo seria *Botryosphaeria rhodina* (Cooke) v. Arx. Por outro lado, alguns anos antes, Crous et al. (2006) restringiram o gênero *Botryosphaeria* a *B. dothidea* e *B. corticis*, onde avaliando as suas características moleculares, foi observado que diferiram dos isolados correspondentes a *L. theobromae*, cujo

teleomorfo para os autores deveria receber outra denominação genérica após estudos mais aprofundados.

O patógeno *L. theobromae* possui distribuição mundial em regiões tropicais e subtropicais (Punithalingam, 1980). Acredita-se que o fungo penetre no hospedeiro através de ferimentos e nas folhas do coqueiro pelas lesões das lixas grande e pequena causadas, respectivamente, pelos fungos *Camarotella acrocomiae* (Montagne) Hyde e Cannon e *Camarotella torrendiella* (Batista) Bezerra e Vitória (Mariano & Silveira, 2005).

Em coqueiro, a infecção ocorre principalmente nas folhas inferiores e, portanto, mais velhas. As lesões internas na ráquis progridem do ápice para a base, podendo atingir a bainha e o estipe, resultando na exsudação de goma nas necroses da base dos folíolos e, abaxialmente, em rachaduras da ráquis lesionada e bainha. A invasão sistêmica e descendente na ráquis causa morte dos tecidos foliares e resulta na seca dos folíolos e de toda a folha, na forma de “V” invertido, similarmente ao sintoma de déficit hídrico. A queima-das-folhas acarreta perda expressiva de área fotossintética ocasionando morte (seca) prematura das folhas mais velhas, e como consequência deixa os cachos sem sustentação física e fisiológica. A redução da produtividade decorre principalmente do colapso dos cachos sem suporte e queda prematura dos de frutos, que não chegam ao ponto de colheita (Souza Filho et al., 1979; Warwick & Leal, 2003). A doença é policíclica, disseminada pelo vento e pluviosidade mensal entre 25 e 80 mm, acima disso, os conídios precipitam no ar (Correia & Costa, 2005).

A severidade da queima-das-folhas está relacionada com o estado nutricional da cultura, condições climáticas e estresse hídrico, sendo estes os principais fatores responsáveis pela predisposição da cultura à surtos da doença (Ram, 1989; Warwick & Leal, 2003; Correia & Costa, 2005).

Quanto à idade da planta, na qual os primeiros sintomas da doença aparecem, há divergências entre os pesquisadores. Alguns trabalhos relatam a manifestação dos sintomas em plantas com idade acima de um ano e meio, enquanto outros, afirmam que a doença pode ocorrer em qualquer idade da planta (Souza Filho et al., 1979; Ram, 1989).

## 2.4. Caracterização molecular de fungos

As técnicas clássicas utilizadas para a caracterização fenotípica, tais como características morfológicas ou bioquímicas, principalmente auxotrofia (incapacidade de um organismo de sintetizar um composto orgânico necessário ao seu próprio crescimento), apresentam restrições nos estudos populacionais e muitas vezes de sistemática quando se objetiva a análise da variabilidade genética em microrganismos. A análise de proteínas, por meio da eletroforese de isoenzimas que detecta diferentes alelos dos genes, dada a diferença de mobilidade eletroforética, tem sido utilizada com sucesso no estudo da variabilidade genética de populações de nematoides, mas possui baixa estabilidade nos estudos com organismos menores como por exemplo os fungos (Alfenas et al., 1991; Leuchtmann et al., 1992; Leuchtmann, 1994; Zervakis et al., 1994).

A possibilidade de se usar a técnica de eletroforese a fim de separar enzimas e proteínas totais extraídas de microrganismos, objetivando a identificação de fungos em nível de espécies ou mesmo subespécies, está hoje em desuso, sendo estes marcadores substituídos por outros baseados no DNA (ácido desoxirribonucléico).

Estes marcadores têm sido utilizados com sucesso para identificar espécies de fungos ou linhagens intraespecíficas e raças fisiológicas (Metzenberg, 1991; Magnani et al., 2005; Nozaki et al., 2006; Tiago et al., 2011; Ismail et al., 2012; Rodrigues et al., 2014). As técnicas baseadas nestes marcadores representam diretamente a variação genética, não estando sujeitas às influências do ambiente, nem sofrendo variações em função do estágio de desenvolvimento do organismo ou do tipo de tecido utilizado (Puterka et al., 1993).

### 2.4.1 Aplicação da PCR na identificação de fungos

A técnica de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism) associada à técnica de amplificação do DNA em cadeia (PCR) foi utilizada para demonstrar a relação filogenética entre 11 espécies do gênero *Ceratocystis*. Após a amplificação de um fragmento de 1600 pares de bases do DNA ribossomal, obteve-se uma árvore de parcimônia com 288 passos produzida a partir de parte da seqüência do DNA da subunidade maior do rRNA. *Ceratocystis fimbriata* e *C. albofundus* apresentaram valor de bootstrap de 100% e outro clado de 95% agrupou as outras nove espécies de *Ceratocystis* em subgrupos (Witthuhn et al., 1999).

Analisando as seqüências espaçadoras ITS1 e ITS2 e parte da subunidade maior do rDNA, quatro espécies anamorfas de *Chalara* foram agrupadas como monofiléticas junto ao gênero teleomorfo *Ceratocystis* (Paulin-Mahady et al., 2002).

No trabalho supracitado, os autores realizaram uma reclassificação taxonômica para essas espécies, transferindo-as para o gênero anamorfo *Thielaviopsis*, pois formam aleuroconídio típico desse gênero. A classificação anterior tinha sido questionada desde a descoberta por Paulin et al. (2002) de *Chalara* como sendo polifilético. Tal afirmação foi encontrada pela análise molecular usando seqüências de parte da subunidade menor e da subunidade maior do rDNA. Wingfield et al. (1994) analisaram a seqüência nucleotídica de uma região da subunidade 18S e duas regiões da subunidade 28S do rRNA de nove espécies

## 2.5. Filogenética Molecular

Após Charles Darwin propor o conceito de ancestralidade entre espécies, o conceito de filogenia foi proposto e é de Darwin o primeiro

diagrama publicado representando similaridade entre espécies. Assim, as filogenias podem ser definidas como a indicação das relações de ancestralidade supostas para um conjunto de espécies (Miyaki et al., 2001).

Desde os tempos de Darwin, a reconstrução da história evolutiva dos organismos e sua expressão em forma de árvore filogenética tem sido aspiração de muitos naturalistas. A proposta ideal seria a utilização de registros fósseis, porém os mesmos são fragmentados e incompletos, sendo utilizados métodos de comparação morfológica e fisiológica (Nei & Kumar, 2000).

A biologia molecular tem mudado essa situação drasticamente. Uma vez que todas as informações genéticas dos organismos estão em moléculas de ácido nucleicos, podem-se estudar as relações evolutivas utilizando-se o DNA. Tanto as sequências proteicas quanto de DNA são usadas para inferência filogenética, sendo as proteínas que abriram o caminho para essa metodologia com o sequenciamento da insulina em 1955, seguido vinte anos depois do sequenciamento de DNA de um bacteriófago, ambos por Sanger (Sanger & Coulson, 1975).

As técnicas moleculares possuem várias vantagens em relação à abordagem clássica: a primeira consiste no fato de o DNA ser formado de quatro nucleotídeos apenas, assim como proteínas consistem em 20 aminoácidos diferentes, de modo que podem ser utilizados para comparar grupos diversos de organismos; segundo, a evolução dessas moléculas segue um padrão mais ou menos regular, o que permite a utilização de modelos matemáticos para formular as mudanças e comparar organismos até pouco relacionados; e terceiro, os genomas consistem em sequências longas de nucleotídeos, que contém um número maior de informação filogenética em comparação aos caracteres morfológicos (Nei & Kumar, 2000).

Filogenia molecular refere-se ao estudo das relações evolucionárias entre os organismos pelo uso dos dados moleculares, como sequências de ácidos nucleicos e proteínas, ou outros marcadores moleculares (Lima, 2003). A lógica da inferência filogenética para caracteres moleculares e

morfológicos é idêntica, mas os dois têm propriedades, métodos e conceitos diferentes (Ridley, 2004).

Em qualquer tipo de filogenia o sistemata deve estar como preocupação primordial a homologia (Russo, 2001), ou seja, em uma análise filogenética deve-se sempre utilizar caracteres homólogos das espécies. A homologia é um caráter compartilhado por duas ou mais espécies que estava presente no ancestral comum a elas (Hennig, 1966).

O termo homologia é utilizado erroneamente como sinônimo de similaridade. Esta última pode ser quantificada, enquanto que a outra trata de um termo qualitativo (Russo, 2001). Assim, em termos moleculares, a homologia não pode ser medida, e sim deve ser hipotetizada, já que concerne a uma história evolutiva do caráter em questão (dois caracteres são homólogos se suas partes idênticas ou semelhantes possuem origem comum). Dizer que caracteres apresentam 95% de homologia não está correto, e sim 95% de similaridade (Salemi & Vandamme, 2003).

Se um ancestral comum possui um estado diferente de um caráter, então esse caráter nas espécies descendentes evoluiu independentemente, o que é considerado uma homoplasia (Ridley, 2004). Para Hennig, a homologia deve ser aceita na ausência de evidências do contrário, a “não homologia”. Como explica Schuh (2000), todas as similaridades são julgadas homólogas inicialmente, e a não homologia é detectada retrocedendo em direção ao mais recente ancestral; se a análise apoiar uma condição de sinapomorfia (conjunto dos caracteres que, surgindo ao longo da evolução, mantém-se em diversos grupos taxonômicos distintos), então é considerada uma homologia, se a condição derivada compartilhada teve origem independente, um evento de não homologia (homoplasia) foi descoberto. Vários fatores podem ser reponsáveis pelo surgimento das homoplasias. Nas evidências de DNA, podem surgir facilmente ao acaso, mas com caracteres morfológicos é pouco provável ser ao acaso. Nesse caso, a causa mais importante é a evolução convergente, quando a mesma pressão seletiva atuou em duas linhagens (Ridley, 2004).

Em biologia molecular, dois nucleotídeos em sequências diferentes são homólogos se, e somente se, as duas sequências adquiriram esse

estado diretamente de seu ancestral comum (Page & Holmes, 1998). Para a filogenia molecular, a homologia por si só não é suficiente, pois dois processos podem gerar genes homólogos: a duplicação e a divergência gênica. No caso de um evento de duplicação gênica, os genes são chamados parálogos. Se esses genes passarem a ter histórias evolutivas independentes a partir de um evento de especiação, eles são chamados ortólogos. Dessa forma, para o estudo de eventos de duplicação gênica em famílias de genes, cópias parálogas de uma única espécie devem ser escolhidas; já para reconstrução filogenética de grupos taxonômicos, os genes ortólogos devem ser preferidos (Russo, 2001).

Quando duas sequências possuem características idênticas em um sítio, ou seja, o mesmo nucleotídeo ou aminoácido, estas não são necessariamente homólogas. Se esse caráter não foi adquirido de um ancestral comum, caracteriza-se como uma homoplasia, que seria resultado de evolução convergente. As homologias podem ser muito difíceis de serem distinguidas das homoplasias, especialmente no nível molecular. Isso porque as sequências são compostas unicamente por poucos símbolos (os quatro nucleotídeos, por exemplo) em uma ordem variante ao longo da sequência (Page & Holmes, 1998).

### **2.5.1. Identificação de posições homólogas (Alinhamento)**

Ao se obter duas sequências similares, mas diferentes, a primeira tarefa é estabelecer quais regiões das duas sequências são homólogas, ou seja, correspondem à mesma região do gene, para fins de comparação (Page & Holmes, 1998). O método mais comum para essa comparação é o alinhamento de sequências, que provê um mapeamento dos resíduos de duas ou mais sequências. A maioria dos métodos de alinhamento tenta modelar os mecanismos pelos quais determinadas sequências evoluíram (Schuler, 2001). Apesar de ser presumido que sequências homólogas

descendem de um mesmo ancestral, não se tem a sequência desse ancestral; o que se observa são sequências de organismos existentes atualmente. As mudanças que por ventura ocorrem durante a divergência de um ancestral comum podem ser classificadas como substituições, deleções e inserções. Em condições ideais, onde o alinhamento reflete a história evolutiva de duas sequências, os resíduos que foram alinhados, mas não são idênticos são substituições; as regiões onde os resíduos de uma sequência correspondem a nada na outra sequência representam inserção em uma ou deleção na outra, que são representados por gaps (Schuler, 2001).

O alinhamento pode ser realizado para comparação de duas (alinhamento par a par), ou mais (alinhamento múltiplo) sequências de nucleotídeos ou aminoácidos (Mount, 2004). Independentemente da forma como o alinhamento é realizado, as abordagens computacionais caem em duas categorias: alinhamento global e alinhamento local. No alinhamento global, é feito um alinhamento da sequência inteira, utilizando todos os caracteres do começo ao fim, adicionando espaços vazios (gaps) para tornar as duas sequências com o mesmo número de caracteres. No programa BLAST (Altschul et al.,1990; Altschul et al.,1997), por exemplo, o alinhamento local localiza uma pequena região na sequência (chamada de semente), que possua o melhor alinhamento com parte de outra sequência e começa a estender esse alinhamento (Nei & Kumar, 2000; Gibas & Jambeck, 2001; Mount, 2004). Os gaps produzidos no alinhamento de sequências representam eventos evolutivos hipotéticos, e, portanto, são também utilizados como caracteres (Doyle & Davis, 2001).

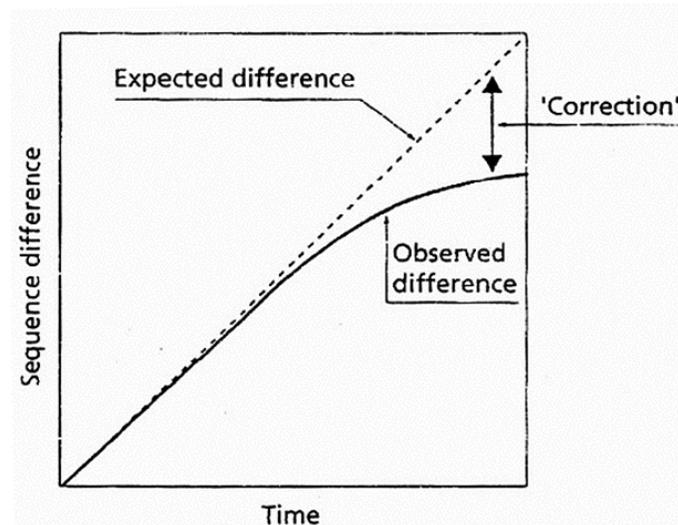
### **2.5.2 Distâncias Genéticas e modelos de substituição nucleotídica**

A principal causa da evolução está ligada às mudanças nos genes por mutação, mudanças estas que podem se espalhar na população por deriva

genética ou por seleção natural e assim se fixarem no genoma. Quatro tipos de mudanças básicas do DNA são aceitas: substituição de um nucleotídeo por outro, remoção, inserção e inversão de nucleotídeos (Page & Holmes, 1998; Nei & Kumar, 2000). As inserções, remoções e inversões podem ocorrer em um ou mais nucleotídeos como uma unidade, e se as duas primeiras ocorrem em um gene codificador de proteína, podem mudar o quadro de leitura da mesma, caracterizando mutações de quadro de leitura (Salemi & Vandamme, 2003). As substituições que trocam uma purina (adenina ou guanina) por outra ou uma pirimidina (citosina ou timina) por outra são chamadas de transições; já as substituições que trocam uma purina por uma pirimidina e vice-versa são transversões. As transições são mais frequentes que as transversões, pois requerem uma mudança menor na estrutura da base nitrogenada (Page & Holmes, 1998).

Quando a identificação de regiões homólogas é realizada em um alinhamento, observa-se simplesmente se as sequências são as mesmas ou não. Porém, se mais de uma substituição ocorreu em um local, o registro das substituições prévias é perdido (Page & Holmes, 1998). Dessa forma, a simples contagem do número de diferenças entre duas sequências (chamada de diferenças observadas, ou distância  $p$ ) subestima a quantidade real de mudança evolutiva. Existe uma relação entre o tempo de divergência entre duas sequências e o número de substituições acumuladas. Com o passar do tempo evolutivo, múltiplas substituições por local se acumularão, conseqüentemente as sequências se tornarão saturadas (Salemi & Vandamme, 2003), ou seja, a maioria dos sítios que estão mudando já mudou anteriormente (Page & Holmes, 1998).

Uma vez que as diferenças observadas subestimam as quantidades reais de mudanças evolutivas, vários métodos para converter essas diferenças em medidas de distâncias evolutivas reais foram desenvolvidos, normalmente chamados de métodos de correção de distância ou ainda modelos de substituição nucleotídica (Page & Holmes, 1998; Salemi & Vandamme, 2003). O objetivo desses modelos é corrigir as distâncias observadas pela estimativa da quantidade de mudanças evolutivas, conforme ilustrado pela Figura 1.



**Figura 1.** Gráfico de distâncias observadas e esperadas proposto por Page e Holmes (1998)

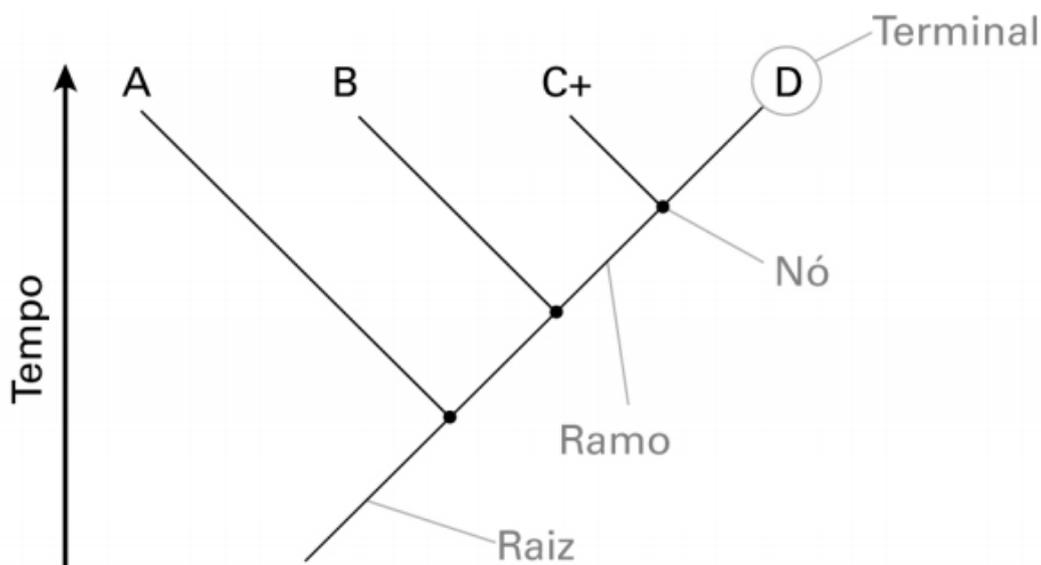
Ao longo do tempo, pesquisadores vêm propondo diversos modelos, com várias suposições sobre a natureza do processo de evolução molecular. Em sua grande maioria, existe uma inter-relação dos modelos propostos, diferindo somente em quantos parâmetros incluem; alguns métodos, por exemplo, permitem variações nas frequências nucleotídicas, enquanto outros permitem que diferentes tipos de substituição ocorram com probabilidades diferentes (Page & Holmes, 1998).

A escolha do modelo que melhor reflete um conjunto de dados específico é um problema muito relevante. A escolha imprópria do modelo pode resultar em resultados errôneos e com pouca significância evolutiva (Page & Holmes, 1998). Atualmente existem programas disponíveis na internet que são usados para escolha do modelo que mais se adéqua aos dados a serem trabalhados. Eles trabalham baseados em cálculos de máxima verossimilhança (Schneider, 2007).

### 2.5.3 Reconstrução Filogenética

Reconstruir filogeneticamente as interrelações de um grupo de organismos, significa estimar as relações de ancestralidade deste grupo. Uma árvore filogenética nada mais é do que a história evolutiva dos organismos presentes nela, e sua topologia pode ser definida como uma representação gráfica unindo as OTU's (operational taxonomic units) através de ramos e nós. OTU's são os organismos incluídos na análise, e podem ser qualquer nível taxonômico do qual se deseja inferir a história filogenética; os ramos são linhas que ligam os nós, e os nós são pontos na árvore, que podem ser internos, representando o ancestral comum, ou terminais (Figura 2), que são os organismos estudados (Miyaki et al., 2001; Hall, 2011).

Uma árvore não enraizada posiciona os organismos em relação um ao outro, sem indicar a direção dos processos evolutivos, ou seja, não há indicação de qual dos OTU's representa o ancestral comum de todos. Para indicar a direção da evolução em uma árvore, é preciso ter uma raiz que conduza ao ancestral comum de todos os táxons (Salemi & Vandamme, 2003). Os grupos externos (outgroups) dão esse sentido do tempo na análise de um grupo, sendo a raiz da árvore correspondente ao ancestral comum de todos os membros do grupo interno (ingroup) (Miyaki et al., 2001).



**Figura 2 Representação** de uma árvore filogenética Fonte: Noções básicas de sistemática filogenética – USP 2012

Os métodos de distância são baseados na ideia de que se tem conhecimento da distância evolutiva atual entre todos os membros de um conjunto de sequências, que pode ser calculada a partir dos modelos de substituição nucleotídica (Page & Holmes, 1998). Após a construção da matriz de distâncias com base em um dos modelos de substituição, um algoritmo de reconstrução da árvore é escolhido. Este pode ser UPGMA (agrupamento de pares não ponderados, baseado na média aritmética), Quadrados Mínimos, Evolução Mínima e Agrupamento de Vizinhos (Neighbor-joining) (Schneider, 2007). Entre eles, o método Evolução Mínima é o mais conhecido; nele, é procurada a árvore com a menor soma total de ramos. Entretanto, esse método é muito demorado, já que todas as possíveis árvores teriam que ser construídas, e a soma total dos ramos estimada, para que a árvore com soma mínima fosse encontrada (Russo, 2001). Um algoritmo heurístico foi proposto para solucionar o problema do tempo computacional, conhecido como Agrupamento de Vizinhos (NJ – Neighbor-joining), que atualmente é o método de construção de topologia mais utilizado (Lima, 2003). Neste método, a construção da árvore começa com uma topologia em forma de estrela. Inicialmente conectam-se os dois táxons mais estreitamente relacionados (vizinhos), que passam a ser

considerados como único táxon, e o processo se repete até que todos os táxons estejam conectados (Schneider, 2007).

Enquanto os métodos de distância reduzem a variação entre cada duas sequências a uma única medida de distância entre elas e trabalham com essas distâncias na estimativa da árvore final, os métodos baseados em caracteres discretos analisam cada sítio separadamente e constroem a árvore final diretamente a partir dos próprios caracteres (Cabral, 2011). Dessa forma, os métodos baseados em caracteres discretos evitam a perda de informação que ocorre quando as sequências são convertidas em distâncias. Três métodos são mais conhecidos: Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança, e a Inferência Bayesiana, que somente nos últimos dez anos, com o aprimoramento dos recursos computacionais, passou a ter seu uso popularizado em filogenia.

O método de Máxima Parcimônia se baseia no princípio da parcimônia ou economia máxima de Guilherme de Occam, que presume que quando duas hipóteses originam explicações igualmente válidas para um problema, a mais simples deve ser a escolhida (Salemi & Vandamme, 2003). Em termos filogenéticos significa que a árvore que de fato representa a filogenia do grupo é aquela que pressupõe o menor número de mudanças para explicar toda a variação observada na matriz de caracteres (Schneider, 2007). Em primeiro lugar, os sítios informativos precisam ser selecionados, porque nem toda a variabilidade das sequências é útil para o método. Os que variam pelo menos duas vezes em no mínimo duas sequencias são informativos; aqueles que variam em apenas em uma única sequência ou que não variam não possuem informação filogenética; por isso, são chamados de sítios filogeneticamente não informativos (Page & Holmes, 1998). Em seguida, o número de substituições em cada sítio informativo é inferido, e o total para cada uma das árvores possíveis é calculado. A árvore que requer o menor número de mudanças é selecionada como a mais parcimoniosa (Miyaki et al., 2001).

No método de Máxima Verossimilhança (ML = Maximum Likelihood), o princípio básico consiste em estimar a probabilidade, com base em um determinado modelo, de um conjunto de dados estar representando um

processo que realmente ocorreu. Para filogenia molecular, o método irá calcular a probabilidade de que aquelas sequências em estudo tenham sido geradas seguindo um modelo evolutivo (Pereira et al., 2001). Para calcular a verossimilhança (L) de uma árvore comumente considera-se a hipótese de que os sítios e as linhagens evoluem de forma independente. Então a árvore com maior verossimilhança é escolhida como a árvore de máxima verossimilhança (Silva, 2008).

Em estatística, o processo de inferência Bayesiana (BI = Bayesian Inference) envolve testes de hipóteses e estimativa de parâmetros; os métodos clássicos definem probabilidade em função de análises das frequências dos acontecimentos em relação a um universo de resultados possíveis (Silva, 2008). Os métodos bayesianos já não tratam as probabilidades da mesma forma, pois levam em consideração conceitos e conhecimentos a priori no cálculo das mesmas. Isso significa que também são consideradas informações já conhecidas antes da realização do experimento (Schneider, 2007; Hall, 2011). A análise Bayesiana para filogenética é semelhante à Máxima Verossimilhança, pois o usuário postula um modelo de evolução e o programa procura pelas melhores árvores que são consistentes com o modelo e com os dados (alinhamento); difere, no entanto, pois enquanto ML procura por árvores que maximizam a probabilidade de dados observados, a BI procura pela árvore que maximiza a probabilidade de uma árvore, dados o modelo de evolução e os dados (Salemi & Vandamme, 2003; Hall, 2011). O cálculo da probabilidade de uma árvore ocorrer é feito através da combinação da verossimilhança da árvore com a probabilidade a priori da mesma, normalizada pela probabilidade dos dados terem ocorrido. O resultado é uma distribuição de probabilidade posterior que permite a escolha da árvore com maior chance de estar correta. Porém, esse cálculo envolve somatórios de todas as árvores e integrações entre todas as possíveis combinações de tamanhos de ramos e valores dos parâmetros do modelo de substituição para cada árvore, o que gera uma situação impossível de ser calculada analiticamente. Para isso, o método de amostragem Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC) pode ser utilizado para amostrar árvores da distribuição de probabilidades

posteriores (Salemi & Vandamme, 2003). Após várias gerações, o processo alcança um estado estacionário, onde um conjunto de árvores possui valores de verossimilhança semelhantes, o que significa que as diferentes árvores convergiram a uma com topologia semelhante, e que o processo pode ser finalizado.

O método a ser escolhido depende dos objetivos a serem alcançados e do tamanho e complexidade do conjunto de dados. Em termos práticos, também depende da velocidade da máquina onde serão realizadas as análises e da facilidade de implementar determinado método.

#### **2.5.4 Confiabilidade da Árvore**

Nos estudos onde se estimam relações filogenéticas, surge a preocupação de como avaliar a confiabilidade da árvore, ou mais especificamente, qual a confiança nos grupamentos formados por cada um dos nós da árvore. Na maioria das vezes, a confiabilidade se refere à topologia, ou ordem dos ramos, de uma árvore, e não ao comprimento dos ramos. A confiabilidade é medida como a probabilidade de os membros de um dado clado serem sempre membros daquele clado (Hall, 2011). Para essa avaliação existem os testes de confiança, dos quais o bootstrap é o mais utilizado. A parte inicial do teste consiste em gerar diversos conjuntos de pseudo-dados, ou réplicas, de tamanho igual ao original através de sorteios com reposição nos dados originais. A segunda etapa, gera árvores a partir dos pseudo-dados. E na etapa seguinte, é feita uma comparação dos grupamentos dos cladogramas das árvores dos pseudo-dados e, calculado quantas vezes cada ramo da árvore original se repetiu nas geradas pelos pseudo-dados. A quantidade de réplicas é indicada pelo usuário, e os valores são expressos em porcentagem e indicados nos ramos internos (Desalle et al., 2002). Se a topologia muda muito conforme a reamostragem

dos dados, o valor do bootstrap será menor, e, portanto, menor a confiabilidade daquele clado (Russo, 2001).

A análise Bayesiana possui uma vantagem na análise desses dados, pois ao invés de fazer bootstrap com pseudo-dados, permite a contagem direta da fração de vezes que um clado ocorre entre as árvores amostradas, que indica o valor de confiabilidade do grupamento (Hall, 2011).

## **2.6. Filogeografia Molecular**

A filogeografia pode ser definida como um campo de estudo onde o objetivo é elucidar os princípios e processos que governam as distribuições geográficas de linhagens genealógicas, especialmente aquelas dentro e entre espécies muito próximas entre si (Avice, 2000). Esta ciência constitui a genealogia de população e genes, que revelam como o padrão da distribuição presente tem sido moldado por eventos geológicos ou outros fatores (Huang et al., 2004).

Considerada uma ciência multidisciplinar, a filogeografia integra a genética molecular, genética de populações, etologia, demografia, filogenia, paleontologia e geologia (Avice, 2000).

A filogeografia vem fazendo parte de alguns trabalhos, seja para fornecer suporte para decisões conservacionistas, seja para confirmar a divisão de gênero das espécies, verificar as relações filogenéticas e reconstruir a história dos possíveis eventos de dispersão, ou para inferir rotas de colonização das espécies.

O termo haplótipo é definido como sendo um dos vários possíveis padrões de sequência de um segmento de DNA, que difere de outros padrões alternativos por meio de mutações na sua sequência. Em estudos de filogeografia, o haplótipo é a unidade básica de análise. Templeton et al. (1992) apresentaram uma explicação detalhada para a construção de redes de haplótipos usando o método da parcimônia como um modelo local finito da evolução do DNA. Este método além de estimar a rede de haplótipos,

permite também estimar o número máximo de conexões parcimoniosas entre pares de sequência com 95% de probabilidade para todos os acoplamentos dos haplótipos dentro da rede.

É esperado que haplótipos ancestrais e haplótipos descendentes estejam presentes em uma mesma rede, visto que seria extremamente improvável que todos os indivíduos do haplótipo ancestral tenham sofrido a mesma mutação. Na formação da rede, os haplótipos de origem mais recente devem ser encontrados nas extremidades, enquanto os haplótipos ancestrais serão encontrados no interior da rede. De acordo com a distribuição geográfica, é esperado que haplótipos ancestrais se apresentem geograficamente melhor distribuídos, enquanto haplótipos recentes tenham distribuição mais restrita, visto que não teriam tido tempo suficiente para maior dispersão.

Em uma rede de haplótipos são observadas conexões entre os haplótipos, cada uma representando uma única conexão parcimoniosa, correspondendo a evento único de mutação que diferencia dois haplótipos. Nem todos haplótipos serão necessariamente amostrados em determinada investigação. Na rede, os haplótipos não amostrados e haplótipos já extintos são representados por nodos e são deduzidos entre dois pares de sequências diferentes mais próximos da rede que diferem entre si por dois ou mais eventos de mutação (Templeton et al. 1992).

### 3. TRABALHOS

#### **3.1 Phylogeography and Population Structure Analysis Reveals Diversity by Mutations in *Lasiodiplodia theobromae* With Distinct Sources of Selection \***

P.H.D. Santos<sup>1</sup>, B.M. Carvalho, K.P. Aguiar, F.A.S. Aredes, T.P.S. Poltronieri, J.M.S. Vivas, V. Mussi Dias, G.A. Bezerra, D.B. Pinho, M.G. Pereira and S.F. Silveira

##### ABSTRACT

*Lasiodiplodia theobromae* is a plant pathogen with a worldwide distribution in tropical and subtropical regions, with low host specificity, causing stem cankers, dieback diseases, and fruit rot in several species of plants. In coconut, this pathogen is reported as the etiological agent of "coconut leaf blight"(CLB) disease, causing several losses in fruit production. The CLB is an important disease for this crop in Brazil, and considering that the host species is exotic in Americas, the hypothesis that the pathogen in coconut has recently adapted to this host, from several genetic and geographic origins of other hosts could be accepted. In our study, we used a phylogeographic approach through the molecular characterization of the translation elongation factor 1- $\alpha$  (TEF1- $\alpha$ ) to elucidate the pathogen distribution in Brazil and other countries, in addition, search information about diversity sources of this pathogen in coconut palm tree at Brazilian northern, northeast and southeast. We found that *L. theobromae* diversity is within populations (Locations), and populations that are located closest to the center of the tropical zone have more variability as Central Africa, Brazilian Southeast and Northeast. The widespread distribution could be in part related with long-distance

\*Parte da tese de doutorado publicada na revista Genetics and Molecular Research V.16 2017.

dispersal via global trade of plants and plant products and the entrance route of *L. theobromae* in Brazil probably occurred from Africa route and not occurred once. In Brazil, the diversity of this pathogen in coconut tree could be linked to two agents of selection: host high diversity (in Northeast) and distinct management measures adopted in Southeast. These distinct sources of selection could be one of the reasons that we found distinct reactions to "coconut leaf blight" chemical control in these regions.

## INTRODUCTION

The fungus *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon e Maubl. is a pathogen with a worldwide distribution in tropical and subtropical regions, with low host specificity, causing many diseases in several species of plants (Lima et al. 2013; Muniz et al. 2014). According to Systematic Mycology and Microbiology Laboratory Fungus-Host Distributions Database, there are around 638 literature records distributed in 71 locations around the world and 360 hosts (Farr and Rossman, 2015) associated with this pathogen.

In coconut crop, this pathogen is reported as the etiological agent of "coconut leaf blight" disease (Souza Filho et al. 1979), affecting the fruit production, causing premature lower leaves abscission, decreasing by 50% photosynthetic area, leaving bunches without support and consequently, the fruits fall before harvest time (Correia and Costa 2005; Monteiro et al. 2013).

There are disagreements regarding the fungicides indicated for "coconut leaf blight" chemical control in the Northeast (Benzimidazoles) and Southeast (Triazoles) of Brazil. (Ram, 1995; Monteiro et al. 2013). We believed that in Southeast the disease is more aggressive due to isolates adaptation to the climate, host or chemical management, which could select more resistant isolates. Alves et al., (2008) reported the existence of "cryptic" species in *L. theobromae* and there are indications that coconut isolates from northeastern differ from others described in the same species (Subileau et al. 1994), both by morphology and pathogenically.

Phylogeographic studies have been intensively used to investigate the genetic diversity of plants and animals populations but fungi investigations are still scarce. This type of studies deals with the principles and processes that govern the geographic distributions of genealogical lineages, especially those within and among closely related species (Avisé 2000). A phylogeographic approach generally aims to understand genetic diversity in connection with dispersal history (Avisé 2000). The potential for the use of molecular phylogeography in the investigation of native or introduced species is enormous, mostly because it provides information about genetic diversity not only in the spatial dimension but also in the temporal dimension (Avisé 2000). Molecular phylogeography techniques have been more frequently used in the areas of ecology, conservation genetics and biogeography.

The utilization of molecular phylogeographic approaches to uncover patterns of genetic diversity in fungi species of agricultural importance is not widespread, which reinforces the need for such studies. In the last

decade, some studies use this approach to reveal patterns of genetic diversity in the plant pathogens *Phakopsora pachyrhizi* (Freire et al. 2008), *Erysiphe necator* (Brewer and Milgroom 2010), *Fusarium sp.* (Summerell et al. 2010), but for *L. theobromae*, still now, is a lack around phylogeographic studies.

In the present study, we used a phylogeographic approach through the molecular characterization of the translation elongation factor 1-a (TEF1- $\alpha$ ) to address the following questions: (I) How was the spread of *L. theobromae* in continents with a higher incidence of this pathogen? (II) What are the genealogical relationships among *L. theobromae* found in Brazil (Southeast, Northeast and North) with isolates present in other countries? (III) What are the agents of variation found in coconuts isolates from Brazil and why are distinct responses to chemical managements at Southeastern and Northeastern regions?

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Sample collection and isolation**

We collect samples of coconut trees with "coconut leaf blight" symptoms and categorized according to the place of origin for isolation in pure culture. The samples were conducted in the Southeast, Northeast and Northern states of Brazil. Samples of healthy plants will also be subjected to isolation, in order to obtain possible endophytes isolates. Some isolates from other hosts are collected for the collection.

Fungal isolation was done as described by Ismail (2012). We obtained the pure cultures by hyphal tip excision from the colony margins on PDA and subsequent incubation at 25 °C in the dark. All pure cultures obtained were deposited in the plant disease clinic collection of the Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

### **DNA extraction, amplification of target sequences and sequencing**

The pure cultures mycelium was macerated inside tubes containing pellets of 1.4 mm (of diameter) and 600  $\mu$ l de Nuclei Lysis Solution, the tubes were placed into a cell disruptor (Loccus L-Beader 3) at 3700 rpm for 40 seconds for three times, the other DNA extraction steps were done as reported by Pinho et al. (2013).

Target sequences of the translation elongation factor 1-a (TEF1- $\alpha$ ) was amplified using primers EF1-728F (5' -CATCGAGAAGTTCGAGAA-3') and EF2 (5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3') (Jacobs et al. 2004). Polymerase chain reaction (PCR) was performed with 50 ng of DNA, 1x PCR buffer, 1,5U of Taq polymerase, 0.06  $\mu$ M of primers (3 pmol/reaction), 0.2 mM of each dNTP, 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub> and final volume of 50  $\mu$ l. Amplification was performed in a thermocycler (Veriti® model), with initial denaturation at 94°C for 2 minutes; 35 cycles of 30 seconds at 94°C, 1 minute at 55°C, 1 minute at 72°C; followed by a final extension step of 3 minutes at 72°C. PCR Amplification products were visualized and quantified on agarose gel 1% with a mass marker (Kasvi DNA Ladder RTU model K9-100 L).

The amplified products were purified using a commercial purification system Agencourt AMPure XP (Magnetic Stand-96 Ambion), following the manufacturer's recommendations. The sequencing was performed by ACTGene Análises Moleculares Ltda (Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil).

### Data analyses

The nucleotide sequences were edited with the DNA Dragon software(Hepperle 2011)(Hepperle 2011). All sequences were checked manually and nucleotides with ambiguous positions were clarified using both primer direction sequences.

The isolates identification was performed by multigene analysis (ITS and TEF1- $\alpha$ ) to select only the isolates belonged to the *L. theobromae* species (data not shown). The analysis was performed as reported by Rosado et al. (2016a), and the nucleotide substitution models were selected according to the Akaike Information Criterion (AIC). The model SYM+I of evolution was used for ITS and HKY+I+G was used for TEF1- $\alpha$ .

We selected 18 isolates that were allocated at *L. theobromae* clade, and other sequences of *L. theobromae* were selected from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) which was clustered in groups based on location, totalizing 104 isolates (Table 1).

**Table 1.** GenBank accession numbers of DNA sequences of *Lasiodiplodia theobromae* used in the analyses

Location	Isolate <sup>b</sup>	Host	TEF1- $\alpha$ <sup>a</sup>
Central Africa	CMW28311	<i>Terminalia ivorensis</i>	GQ469898
Central Africa	CMW36127	<i>Adansonia digitata</i>	KU886993
Central Africa	CMW28571	<i>Terminalia ivorensis</i>	GQ469897
Central Africa	LASPTGR42B	<i>Grevillea robusta</i>	FJ904889
Central Africa	LASPTAI41	<i>Grevillea robusta</i>	FJ904888
Central Africa	LASPTAI38	<i>Grevillea robusta</i>	FJ904887
Central Africa	LASPTAI17	<i>Grevillea robusta</i>	FJ904886
Central Africa	GrS1-1	<i>Grevillea robusta</i>	FJ904863
Central Africa	CBS 190.73	<i>Persea americana</i>	EF622048
Central Africa	CMW 10130	<i>Vitex doniana</i>	AY236900
Central Africa	G3/20/Grevillea	<i>Grevillea robusta</i>	GU130539
Central Africa	1/3/1/Grevillea	<i>Grevillea robusta</i>	GQ999856
Central Africa	CMW18420	<i>Casuarina equisetifolia</i>	DQ103564
Central Africa	CMW33290	<i>Adansonia digitata</i>	KU886956
South Africa	CBS 112874	<i>Vitis vinifera</i>	EF622055
South Africa	STE-U 4419	<i>Vitis vinifera</i>	AY343368
South Africa	STE-U 5051	<i>Vitis vinifera</i>	AY343369
South Africa	CMW18422	<i>Pinus patula</i>	DQ103562
South Africa	CMW18425	<i>Pinus patula</i>	DQ103561

Africa/Asia	BOT-5	<i>Mangifera indica</i>	JN814403
Africa/Asia	BOT-9	<i>Mangifera indica</i>	JN814419
Africa/Asia	BOT4	<i>Mangifera indica</i>	JN814422
Africa/Asia	BOT-7	<i>Mangifera indica</i>	JN814423
Africa/Asia	BOT-6	<i>Mangifera indica</i>	JN814426
Africa/Asia	BOT-23	<i>Mangifera indica</i>	JN814427
East Asia	JMB-122	<i>Prunus persica</i>	HQ660490
East Asia	ML	<i>Zea mays</i>	KT985635
East Asia	CRI-LP3	<i>Ipomoea batatas</i>	KU870369
East Asia	CRI-LP2	<i>Ipomoea batatas</i>	KU870368.1
East Asia	HD1332	<i>Albizia falcataria</i>	KU712503.1
East Asia	BL1331	<i>Albizia falcataria</i>	KU712500
East Asia	CERC3825	<i>Rosa rugosa</i>	KR816842
East Asia	CMW24702	<i>Eucalyptus sp.</i>	HQ332210
East Asia	CMW24701	<i>Eucalyptus sp.</i>	HQ332209
East Asia	CERC1985	<i>Pinus balfouriana</i>	KP822998
East Asia	CERC1989	<i>Eucalyptus sp.</i>	KP823000
Southwestern Asia	IRNHM-KB642	<i>Citrus sp.</i>	KU737511
Southwestern Asia	IRNHM-KB64	<i>Citrus sp.</i>	KU737510
Southwestern Asia	IRAN 1233C	<i>Mangifera indica</i>	GU973860
Southwestern Asia	IRAN 1496C	<i>Mangifera indica</i>	GU973861
Southwestern Asia	IRAN 1499C	<i>Mangifera indica</i>	GU973862
Southwestern Asia	CJA198	<i>Mangifera indica</i>	GU973863
Southwestern Asia	CJA199	<i>Mangifera indica</i>	GU973864
Southwestern Asia	CJA279	<i>Mangifera indica</i>	GU973865
Southwestern Asia	B0151	<i>Pinus kesiya</i>	KM006467
Southwestern Asia	B0281	<i>Manilkara zapota</i>	KM006473
Southwestern Asia	B0451	<i>Syzygium samarangense</i>	KM006485
Southwestern Asia	APAO-01	<i>Anacardium occidentale</i>	LC146471
Brazil Northeast	<b>CF/UENF417</b>	<i>Cocos nucifera</i>	<b>KY223714</b>
Brazil Northeast	CDA472	<i>Cocos nucifera</i>	KP308467
Brazil Northeast	COAD1790	<i>Cocos nucifera</i>	KP308468
Brazil Northeast	CDA465	<i>Cocos nucifera</i>	KP308465
Brazil Northeast	CDA467	<i>Cocos nucifera</i>	KP308473
Brazil Northeast	CDA469	<i>Cocos nucifera</i>	KP308466
Brazil Northeast	<b>CF/UENF431</b>	<i>Cocos nucifera</i>	<b>KY223714</b>
Brazil Northeast	<b>CF/UENF432</b>	<i>Cocos nucifera</i>	<b>KY223715</b>
Brazil Northeast	<b>CF/UENF435</b>	<i>Cocos nucifera</i>	<b>KY223716</b>
Brazil Northeast	<b>CF/UENF437</b>	<i>Cocos nucifera</i>	<b>KY223718</b>
Brazil Northeast	<b>CF/UENF430</b>	<i>Cocos nucifera</i>	<b>KY223713</b>
Brazil Northeast	<b>CF/UENF436</b>	<i>Cocos nucifera</i>	<b>KY223705</b>

Brazil Northeast	<b>CF/UENF438</b>	<i>Cocos nucifera</i>	<b>KY223717</b>
Brazil Northeast	CMM 0384	<i>Vitis vinifera</i>	KJ417876
Brazil Northeast	CMM 0820	<i>Vitis vinifera</i>	KJ417877
Brazil Northeast	CMM 0455	<i>Vitis vinifera</i>	KJ417878
Brazil Northeast	CMM 0307	<i>Vitis vinifera</i>	KJ417879
Brazil Northeast	CMM 0310	<i>Vitis vinifera</i>	KJ417880
Brazil Northeast	CMM1517	<i>Manga</i>	JX464054
Brazil Northeast	CMM4050	<i>Manga</i>	JX464024
Brazil Northeast	IBL340	<i>Spondias purpurea</i>	KT247472
Brazil Northeast	IBL375	<i>Talisia esculenta</i>	KT247473
Brazil Northeast	IBL404	<i>Anacardium occidentale</i>	KT247470
Brazil Northeast	IBL405	<i>Anacardium occidentale</i>	KT247471
Brazil North	<b>CF/UENF425</b>	<i>Elaeis guineensis</i>	<b>KY223705</b>
Brazil North	<b>CF/UENF426</b>	<i>Cocos nucifera</i>	<b>KY223706</b>
Brazil Southeast	<b>CF/UENF429</b>	<i>Capparis flexuosa</i>	<b>KY223712</b>
Brazil Southeast	<b>CF/UENF419</b>	<i>Cocos nucifera</i>	<b>KY223719</b>
Brazil Southeast	<b>CF/UENF420</b>	<i>Cocos nucifera</i>	<b>KY223720</b>
Brazil Southeast	<b>CF/UENF421</b>	<i>Cocos nucifera</i>	<b>KY223708</b>
Brazil Southeast	<b>CF/UENF423</b>	<i>Cocos nucifera</i>	<b>KY223710</b>
Brazil Southeast	COAD1788	<i>Cocos nucifera</i>	KP308476
Brazil Southeast	COAD1789	<i>Cocos nucifera</i>	KP308474
Brazil Southeast	CDA444	<i>Cocos nucifera</i>	KP308477
Brazil Southeast	CDA425	<i>Cocos nucifera</i>	KP308475
Brazil Southeast	CDA450	<i>Cocos nucifera</i>	KP308478
Brazil Southeast	CDA455	<i>Cocos nucifera</i>	KP308463
Brazil Southeast	<b>CF/UENF427</b>	<i>Persea americana</i>	<b>KY223707</b>
Brazil Southeast	<b>CF/UENF428</b>	<i>Cocos nucifera</i>	<b>KY223711</b>
Brazil Southeast	<b>CF/UENF422</b>	<i>Cocos nucifera</i>	<b>KY223709</b>
Brazil Southeast	CMM3831	<i>Jatropha curcas</i>	KF226717
Brazil Southeast	CMM3654	<i>Jatropha curcas</i>	KF226716
Brazil Southeast	CMM3612	<i>Jatropha curcas</i>	KF226692
Brazil Southeast	CMM3647	<i>Jatropha curcas</i>	KF226704
Oceania	MUCC709	<i>Lysiphyllum cunninghamii</i>	GU199393
Oceania	CBS 289.56	<i>Sail-cloth</i>	EF622050
Oceania	CBS 164.96	<i>Fruit along coral reef coast</i>	AY640258
South America	CMW22924	<i>Schizolobium parahyba</i>	KF886732
South America	CMW9271	<i>Schizolobium parahyba</i>	KF886731
South America	LA-SJ1	<i>Vitis vinifera</i>	KM401973

South America	LA-SV1	<i>Vitis vinifera</i>	KM401972
South America	LA-SOL1	<i>Vitis vinifera</i>	KM401971
South America	LAREP3	<i>Mangifera indica</i>	KU507453
South America	LAREP2	<i>Mangifera indica</i>	KU507452
South America	LAHUAL3	<i>Mangifera indica</i>	KU507450
South America	LASOM3	<i>Mangifera indica</i>	KU507444

<sup>a</sup>TEF1- $\alpha$  = translation elongation factor 1- $\alpha$ . <sup>b</sup>Isolates obtained in this study are highlighted in bold. CF/UENF = Coleção Clínica Fitossanitária at the Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF.

All the sequences obtained were added and aligned in Muscle<sup>®</sup> program (Edgar 2004) implemented in MEGA software v.6 (Tamura et al. 2013). The alignment was double-checked in Gblocks (Castresana 2000), making large data sets feasible, and facilitates the reproduction of the final alignment by other researchers.

To identify individual haplotypes and their frequencies, we used the DnaSP v.5.10.01 software (Librado and Rozas 2009). DnaSP also estimated the haplotype and nucleotide diversity (Nei 1987).

The genealogical relationships among haplotypes were generated by a Median- Joining Network (MJ) method in the Network 4.6.0.0 software (Bandelt et al. 1999). This program applies statistical parsimony by the algorithm developed by Templeton et al. (1992). The haplotype network estimation considers each of the bases (A, T, G and C) as a character to identify individual haplotypes and their frequencies. The maximum number of parsimonious connections between the sequences was estimated at 95% of probability for all haplotypes connections within the network. Haplotypes were presented as circles, which are color-coded. Circle sizes are proportional to the frequency of isolates in each haplotype.

The genetic structure was estimated for each sampled locality (genetic diversity within and between locations) and the analysis of molecular variance (AMOVA) was performed in ARLEQUIN v.3.1 software (Excoffier et al. 2005). The AMOVA estimates the genetic structure using information from the haplotypes allelic content as well as their frequencies (Excoffier et al. 2005).

To relate the haplotypes phylogeographic relationships, we plotted in the geographical world and Brazil maps the frequency of each haplotypes obtained, using the Inkscape software v.0.91.

## RESULTS AND DISCUSSION

The haplotype “H3” was the most frequent in locations under study, totalizing 47 isolates in 104 obtained sequences (Table 2). This haplotype was present in eight of ten locations studied. Haplotypes “H1” and “H5” appeared in nine and four locations respectively. We observed eight *singletons* haplotypes, i.e., they were identified only once, and therefore, were exclusive from the location. It is important to highlight that the host origin of isolates does not contribute in the haplotypes grouping as reported to Mohali et al. (2005).

It is common that ancestral haplotypes were the most frequent and found covering the majority of studied areas (Templeton et al. 1992; Freire et al. 2008). The high frequencies observed to haplotype “H3”, is an indicative that this haplotype is ancestral in relation with the others haplotypes identified in this study. This fact is reinforced by the type species (CBS 164.96) presence in this haplotype.

In general, we observed diversity for most locations in study, this fact could be connected to the widespread of the pathogen around the world (Mohali et al., 2006; Marsberg et al., 2016).

In Brazil, all locations showed more than one haplotype and the majority were *singletons* (Table 2). In North of Brazil, we observed the presence of two *singletons* haplotypes, resulting in low diversity. On the other hand, Brazilian Southeast and Northeast showed six haplotypes each, indicating diversity for these regions.

**Table 2.** Distribution of the 14 *Lasiodiplodia theobromae* haplotypes between 104 analyzed TEF-1 $\alpha$  sequences.

Haplotypes	Total	Central Africa	South Africa	Africa/ Asia	Brazil North	Brazil Southeast	Brazil Northeast	South America	Southwestern Asia	East Asia	Oceania
H1	18	3	1	1	1	6	3	1	1	1	
H2	1				1						
H3	47	4		5		7	9	7	8	6	1
H4	4					1	1	1	1		
H5	16		2			2	9			3	
H6	1					1					
H7	1					1					
H8	6	1	2						2		1
H9	5	4						1			
H10	1						1				
H11	1						1				
H12	1	1									
H13	1	1									
H14	1									1	
Total	104	14	5	6	2	18	24	10	12	11	2

The analysis of molecular variance, based on  $F_{ST}$ , showed that most of the observed variance was within populations (91.66%), indicating a greater variability occurring within populations than among them. (Table 3).

The results of molecular variance, together with those of Al-Sadi et al. (2013) indicate as a possible cause for this variability within populations is the frequent movement of pathogen inoculum across geographical locations. Moreover, this variability is consistent with the high number of singletons uncovered during sequence analysis (Perneel et al. 2006).

**Table 3.** Analysis of molecular variance (AMOVA), among *Lasiodiplodia theobromae* isolates sequences on different geographic locations.

Source	d.f.	Sum of Squares	Variance components	Variation (%)	Fst
Among Populations	9	5.89	0.03126	8.34	0.083*
Within Populations	94	32.295	0.34356	91.66	
Total	103	38.183	0.3749		

\* Significant at the 0.05 level of probability

Most of the populations shared the haplotype "H3" (Table 2), which support low differences found among populations (Table 3). The known low host specificity of *L. theobromae* could in part induce to low genetic structure between populations and this could be explained by the fact that the fungus can colonize many hosts in a determinate area (Fournier and Giraud 2008; Begoude Boyogueno et al. 2012; Al-Sadi et al. 2013; Marsberg et al. 2016).

The high difference found within populations (Table 3) can be attributed to population gene flow, increasing the diversity within populations (Templeton 1998; Mohali et al. 2005). A high gene flow prevents local adaptation, reducing the fixation of alleles that are favored under local conditions, hindering the process of speciation. On the other hand, gene flow generates new polymorphisms in the population and increases the effective size of the local population and their ability to withstand random changes in gene frequencies, opposing the genetic drift and generating new combinations of genes, in which natural selection can act (Balloux et al. 2002). These facts can be considerate for the structure of these populations, explaining its higher diversity within them.

The results could be also influenced by the sample size but some authors reported that the sample size does not directly affect the genetic diversity observed (Kasuga et al. 2003; WANG et al. 2006). Freire et al. (2008) working with 99 isolates of *Phakopsora pachyrhizi* and Jorge et al. (2015) working with 436 isolates reported the similar genetic diversity and population structure for the Asian soybean rust in their study. This fact reinforces the idea that the sample size does not directly affect the genetic diversity as the comment above.

As one of our objectives refers to the study of the *L. theobromae* evolutionary history and dispersion in world and Brazil. Increasing the total number of sequences by location would be uninformative since the

probability that the network obtained by this work have significant alterations would be very small. In fact, maybe we could observe new haplotypes, and more haplotype by location, but the conclusions in relation to the history and dispersion would be the same or similar.

Nucleotide diversity estimates the probability that two randomly chosen homologous nucleotides will be distinct, bearing in mind the number of mutations between haplotypes, and is equivalent to the level of polymorphism within population (Nei 1987). Haplotype diversity is defined as the probability that two individuals randomly were chosen have distinct haplotypes. This variable is equivalent to genetic diversity, having as the difference, the replacing of the genotypic frequency for haplotype frequency (Nei and Li 1979).

**Table 3.** Haplotype diversity ( $H$ ), nucleotide diversity ( $\pi$ ) and its Standards Deviation (SD) of *Lasiodiplodia theobromae* in 10 locations around the world.

Location	N*	S	K	$H$ (SD)	$\pi$ (SD)
East Asia	11	10	4	0.67 (0.123)	0.00871 (0.0047)
Southwestern Asia	12	7	5	0.67 (0.141)	0.006 (0.0019)
South Africa	5	4	3	0.8 (0.164)	0.008 (0.0016)
Central Africa	14	25	6	0.835 (0.062)	0.02 (0.0092)
Brazil Northeast	24	15	6	0.728 (0.058)	0.0083 (0.0027)
Brazil Southeast	18	24	6	0.76 (0.07)	0.011 (0.0055)
Brazil North	2	2	2	1 (0.5)	0.0074 (0.0024)
South America	9	6	4	0.694 (0.147)	0.0048 (0.0021)
Oceania	3	5	3	1 (0.272)	0.012 (0.004)
África/Ásia	6	2	2	0.33 (0.22)	0.0023 (0.0015)
Total	104	30	14	0.74 (0.035)	0.0077 (0.0012)

\*N = number of individuals; S = number of polymorphic sites and K = number of haplotypes

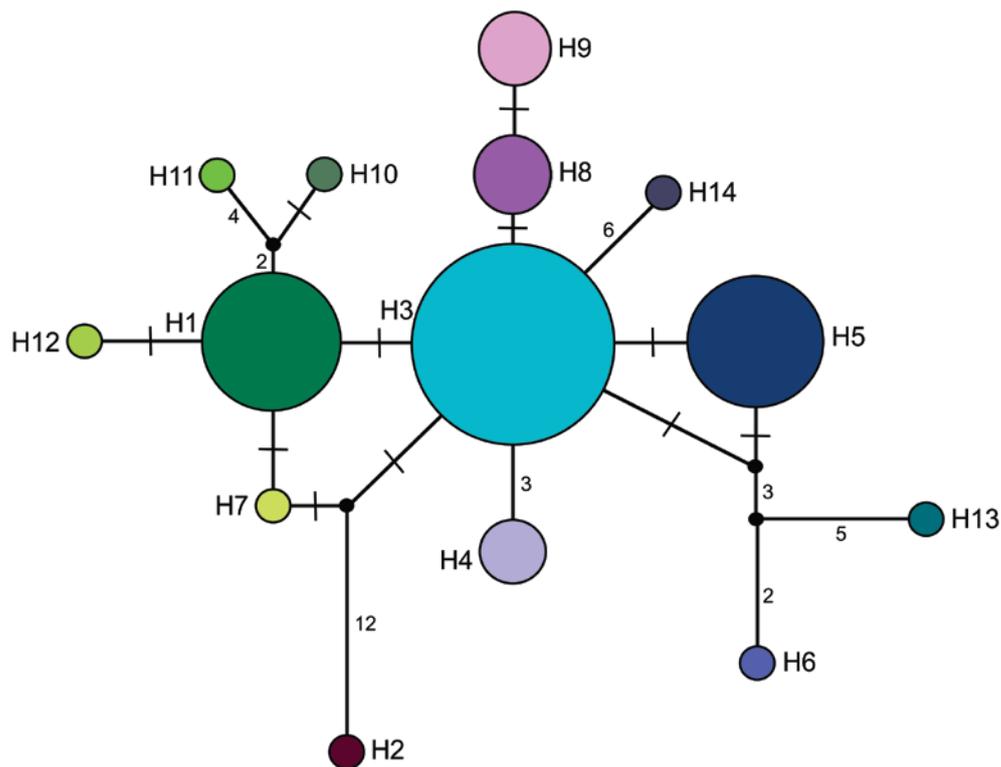
On this aspect, we noted a moderate pattern between populations; in general, populations that are located closest to the center of the tropical zone presented more variability (Central Africa, Brazilian Southeast and Northeast) (Tables 2 and 4). This evidence, still now, has not yet been reported in any study with this pathogen, giving originality to this work, contributing to the understanding of the preferential ecological conditions of this pathogen. The haplotype diversity ranged from 0.33 to 1. The lower value (0.33), attributed to Egypt region, which belongs as much to Africa as to Asia, could be in part associated with the environmental conditions and host scarcity to the pathogen establishment. On the other hand, the value 1 was observed in populations wherein all haplotypes were distinct, i.e., high genetic diversity within the locality.

The North region in Brazil showed high values of diversity presenting only two haplotypes. In other words, these haplotypes are highly distinct between them. We found high diversity values to Southeast and Northeast,

but in this case, these regions presented more haplotypes than the North region (Table 4).

For nucleotide diversity, locations that exhibited substantially the same haplotype frequency not necessarily have the same value, since the estimate also takes into account the amount of mutation between these haplotypes. For example, East Asia (11 haplotypes) and Southwestern Asia (12 haplotypes) had the same proportion of haplotype and thus has the same value of haplotype diversity (0.67) (Table 4). However, Southwestern Asia had nucleotide diversity around 0.006, while East Asia with 0.00871 (Table 4).

As seen in Figure 1, between the haplotypes identified in East Asia (Table 2) had three mutation events for each haplotype, since the haplotypes identified in Southwestern Asia differed in four mutation events, explaining this difference in nucleotide diversity.



**Figure 1.** Median-joining haplotype network based *TEF-1 $\alpha$*  gene for *Lasiodiplodia theobromae*. Haplotypes are distinguished by colors and the circles sizes indicate haplotypes frequencies. The branch numbers indicate the total of mutation events and the connection bars between two neighbors haplotypes represent a single mutation event.

We obtained a single network containing all 14 haplotypes for the TEF-1 $\alpha$  gene (Figure 1). The estimation procedure detected four nodes (represented by black smaller circles) in which none of the 104 sequences could be allocated. According to Templeton (1998), these nodes represent intermediate haplotypes, which are inferred between two nearest neighbors haplotypes in a network, which differ by two or more mutation events. These nodes refer to extinct or not sampled haplotypes.

It is expected that ancestral haplotypes occupy the center of the network, and descendants or derived haplotypes are found in network tips. The network obtained, pointed as the more central, the haplotype "H3" (Figure 1). This haplotype in the network also was the most frequent, as noted in Table 2, reinforcing the evidence of its ancestry.

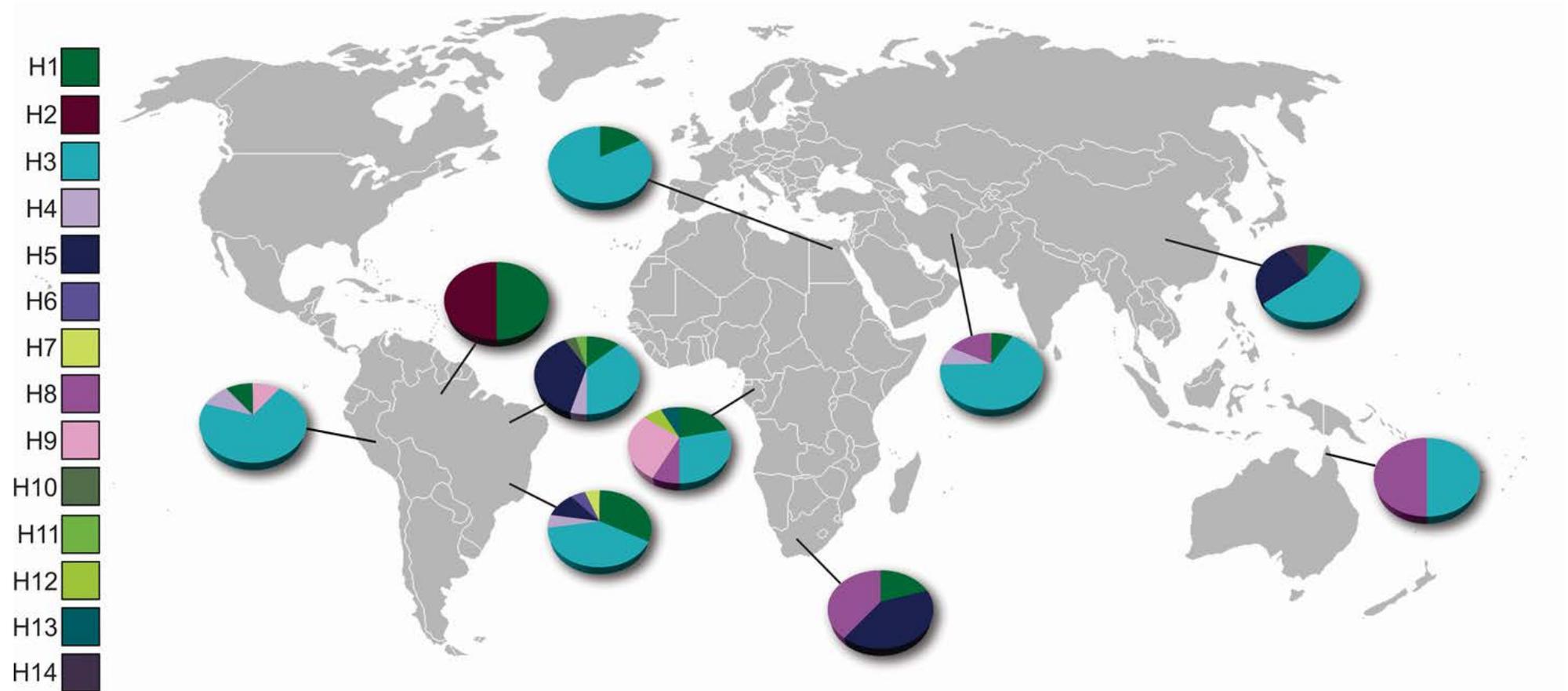
The haplotype "H3", showed ramifications for haplotypes that occupied the network tips (Figure 1). Templeton et al. (1992) and Freire et al. (2008) reported the presence of ramifications as something expected in networks, because these haplotypes undergo for several mutations at different times, generating several descendants haplotypes. Haplotypes that occupied the network tips are recent, and this evidence is reinforced by most of them presents as *singletons* (Templeton et al. 1992).

The ancestral haplotype "H3" was present in most of the sampled locations (Figure 2). The two other more frequent haplotypes ("H1" and "H5") were founded in many sampled locations. We believe that the haplotype "H3" could be similar to the first specimen described as *Botryodiplodia theobromae* (Patouillard and Lagerheim 1892) in Ecuador, and the one found years later for Griffon and Maublanc (1909) in central Africa renaming the fungus to *Lasiosiplodia theobromae*.

According to the coalescence theory (Templeton et al. 1992; Avise 2000), it is expected that ancestral haplotype to be present in most of the geographical locations while recent haplotypes have a more restricted distribution. Thus, the distribution observed in Figure 2 strengthens the evidence mentioned above, the haplotype "H3" would probably the ancestral haplotype, and haplotypes with more restricted distribution would descendants.

We believed that this widespread distribution could be in part relations with anthropogenic long-distance dispersal via global trade of plants and plant products, started in the period of trade Navigations, where many products and plants were brought to these regions. Furthermore, the low host specificity contributed positively to the pathogen establishment in distinct locations.

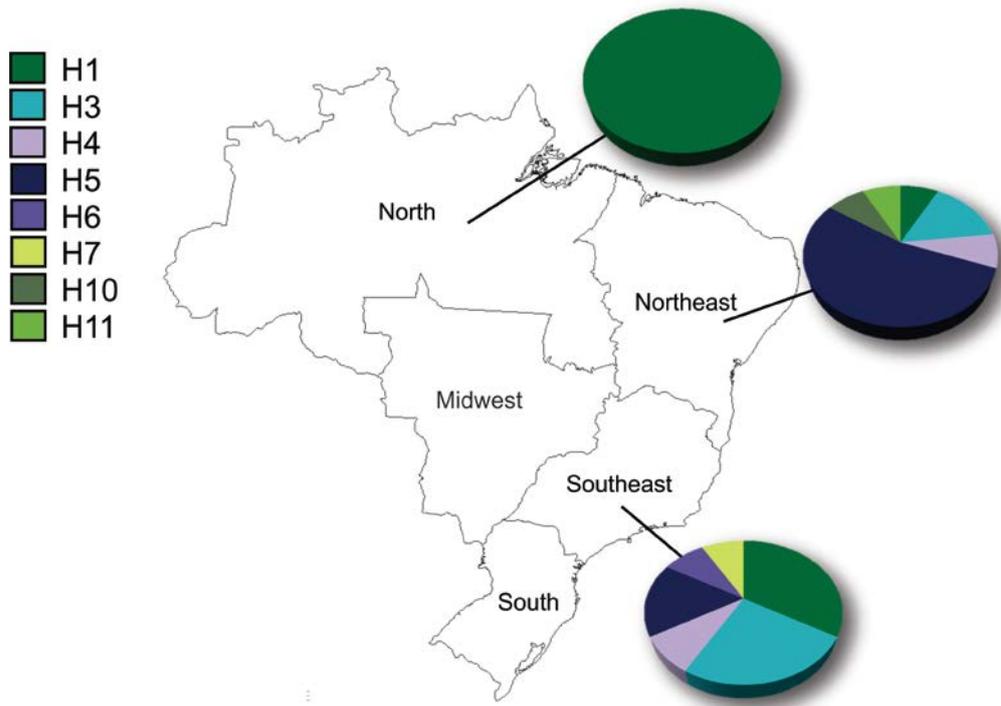
In Brazilian Southeast and Northeast we notice the same pattern, but as previously mentioned, these locations, as well as Central Africa showed high haplotypes variability. This current diversity has most likely resulted from these regions have been for many years the main route for the navigations traffic, which included plant material. The local weather conditions probably contributed to the higher haplotypes variability since their occurrence is higher in tropical and subtropical regions (Burgess and Wingfield 2002).



**Figure 2.** Geographic distribution of the 14 haplotypes for the TEF-1 $\alpha$  gene of *Lasiodiplodia theobromae*. Areas of pie charts represent composite haplotype frequency. Haplotype colors and codes are as in the network shown in Figure 1

The pathogen entrance in Brazil could be by the bordering countries (South America) as well as Africa, due to the extensive products exchange between these continents. We did not observe the ancestral haplotype “H3” in northern Brazil (Figure 2) (nearest to South America countries) and this fact led us to believe that the physical barriers of neighboring countries could have prevented or delayed the entry of this pathogen. Haplotypes "H3" and "H1" were shared by the northeastern and southeastern regions of Brazil, as well as the central region of Africa, leading us to believe that this might be the most likely entrance route of *L. theobromae* at the country and this event not occurred once.

Figure 3 showed a map of Brazil with *L. theobromae* haplotypes, formed only by the isolates found in coconut (Table 1). The same high haplotypes variability was observed in relation to Southeast and Northeast locations, indicating that the host origin does not have influence in haplotypes grouping as reported above.



**Figure 3.** Geographic distribution of the Brazilian coconut *Lasiodiplodia theobromae* haplotypes for the TEF-1 $\alpha$  gene. Areas of pie charts represent composite haplotype frequency.

The North region showed only one coconut haplotype (“H1”) indicating that this haplotype is more recent in this region than others studied (Figure 3). This could be in part associated with the endophytic behavior associated with the pathogen (Mohali et al. 2005; Alves et al. 2008). The other fact could be that the disease often occurs when some stress is detected by the plant, mainly hydric stress (Correia and Costa 2005; Jami et al. 2015;

Coutinho et al. 2016; Marsberg et al. 2017). We believe that as Brazilian North is a region with favorable conditions for water supplementation, "coconut leaf blight" occurs occasionally and the fungus remains endophytically inside the host. Thus, the need for pathogen specialization decreases, contributing to its low variability.

We found six haplotypes for Brazilian Northeast, where the haplotype "H5" showed the highest frequency, followed by the ancestral haplotype "H3" (Figure 3). This location has two *singletons* haplotypes that only occur there, and probably arise recently at this region. As we mentioned above, this location has some haplotype variability and in this case, using only coconut pathogens, this could be linked by the fact that in Northeast the most of coconuts tree cultivated are from Giant variety (Fontes and Wanderley 2006; Monteiro et al. 2013), with has high diversity in populations (Ribeiro et al. 1999; Perera et al. 2000). In this case, the pathogen has to adapt to the host variability, which acts as a source of selection, increasing the fungi variability. In this scenario, we believe that the host high variability could influence the fungi variability.

In Southeast, as in Northeast, we found six haplotypes where two of them only occurs in this region ("H6" and "H7"). The ancestral haplotype ("H3") has the highest frequency (Figure 3). In Southeast most of the coconuts tree cultivated are from Green Dwarf variety (Monteiro et al. 2013) and according to Santos (2016) this variety has low diversity.

The low host diversity would result in low diversity for *L. theobromae* haplotypes, which were not found in our work. It is known that in Southeast regions the chemical management adopted are distinct than the measures adopted in Northeast (Monteiro et al. 2013). We believed that these distinct measures in Southeast could be the source of selection of this pathogen at this region.

*Lasiodiplodia theobromae* has predominantly asexual mode of reproduction and this contributes to low haplotype diversity (Mohali et al. 2005; Marsberg et al. 2017). In our work, we find some diversity between haplotypes and two hypothesis could be formed to explain these results: (i) the sexual phase even uncommon could occur in many hosts or (ii) the mutation rate could in part contribute to the fungal diversity, since the large number of individuals generated by mutations could increase the mutation rate, fixing the mutants in populations by distinct agents of selection.

When we found populations with high recently selection pressure it could generate a linkage disequilibrium state and the recombination could randomize the alleles in gametes, returning to the equilibrium (Hartl and Grant 2007). As the sexual phase are uncommon and hardly occurs in Southeast and Northeast regions, we believe that the recombination would be unfeasible. The mutation hypothesis looks more acceptable for the high diversity in Brazilian Southeast and Northeast.

We believe that these distinct sources of selection could be one of the reasons that we found distinct reactions to "coconut leaf blight" chemical control at these regions under study.

## CONCLUSIONS

Haplotype “H3” is the ancestral in relation with the others haplotypes identified;

The *L. theobromae* diversity is within populations (Locations) and this is linked to the high influence of mutations in populations;

Populations that are located closest to the center of the tropical zone have more variability as Central Africa, Brazilian Southeast and Northeast;

The widespread distribution could be in part relations with long-distance dispersal via global trade of plants and plant products, started in the period of trade Navigations and the entrance route of *L. theobromae* in Brazil probably occurs by the Africa route and not occurred once;

In Brazil, the diversity of *L. theobromae* in coconut tree could be linked to two sources of selection: host high diversity (in Northeast); distinct chemical management measures adopted (in Southeast) and these distinct sources of selection could be one of the reasons that we found distinct reactions to "coconut leaf blight" chemical control in these regions.

## REFERENCES

- Abdollahzadeh J, Javadi A, Goltapeh EM, et al (2010) Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia Mol Phylogeny Evol Fungi* 25:1–10. doi: 10.3767/003158510X524150
- Al-Sadi AM, Al-Wehaibi AN, Al-Shariqi RM, et al (2013) Population Genetic Analysis Reveals Diversity in *Lasiodiplodia* Species Infecting Date Palm, Citrus, and Mango in Oman and the UAE. *Plant Dis* 97:1363–1369. doi: 10.1094/PDIS-03-13-0245-RE
- Alves a, Crous PW, Correia a, Phillips a JL (2008) Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Divers* 28:1–13.
- Avice JC (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press
- Balloux F, Lugon-Moulin N, Article R, et al (2002) The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Mol Ecol* 11:155–165. doi: doi:10.1046/j.0962-1083.2001.01436.x
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37–48. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036
- Begoude Boyogueno AD, Slippers B, Perez G, et al (2012) High gene flow and outcrossing within populations of two cryptic fungal pathogens on a native and non-native host in Cameroon. *Fungal Biol* 116:343–353. doi: 10.1016/j.funbio.2011.12.001
- Brewer MT, Milgroom MG (2010) Phylogeography and population structure of the grape powdery mildew fungus, *Erysiphe necator*, from diverse *Vitis* species. *BMC Evol Biol* 10:268. doi: 10.1186/1471-2148-10-268
- Burgess T, Wingfield MJ (2002) Quarantine is important in restricting the spread of exotic seed-borne tree pathogens in the southern hemisphere. *Int For Rev* 4:56–65.
- Burgess TI, Barber P a, Mohali S, et al (2006) Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia* 98:423–435. doi: 10.3852/mycologia.98.3.423

- Castresana J (2000) Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis. *Mol Biol Evol* 17:540–552. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334
- Correia MS, Costa JLS (2005) Dispersão anemófila do fungo *Lasiodiplodia theobromae* em plantações de coqueiro. *Fitopatol Bras* 30:150–154. doi: 10.1590/S0100-41582005000200008
- Coutinho IBL, Freire FCO, Lima CS, et al (2016) Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. *Plant Pathol.* doi: 10.1111/ppa.12565
- Crous PW, Slippers B, Wingfield MJ, et al (2006) Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Stud Mycol* 55:235–253. doi: 10.3114/sim.55.1.235
- Dias MD, Pozza EA, Abreu MS de, Miranda EO (2005) Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de *Coffea arabica* L. *Ciência e Agrotecnologia* 29:545–552. doi: 10.1590/S1413-70542005000300006
- Edgar RC (2004) MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32:1792–1797. doi: 10.1093/nar/gkh340
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1:47–50. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x
- Farr, D F; Rossman A (2015) Systematic Mycology and Microbiology Laboratory Fungus-Host Distributions Database. <http://nt.ars-grin.gov/fungalDATABASES/>. Accessed 21 Sep 2016
- Ferreira EB, Cavalcanti PP, Nogueira DA (2014) ExpDes: An R Package for ANOVA and Experimental Designs. *Appl Math* 5:2952–2958.
- Fontes HR, Wanderley M (2006) Situação Atual e Perspectivas para a Cultura do Coqueiro no Brasil.
- Fournier E, Giraud T (2008) Sympatric genetic differentiation of a generalist pathogenic fungus, *Botrytis cinerea*, on two different host plants, grapevine and bramble. *J Evol Biol* 21:122–132. doi: 10.1111/j.1420-9101.2007.01462.x
- Freire M, Oliveira L (2008) Evolutionary history of *Phakopsora pachyrhizi* (the Asian soybean rust) in Brazil based on nucleotide sequences of the internal transcribed spacer region of. ... *Mol Biol* 931:920–931. doi: 10.1590/s1415-47572008005000026
- Freire MGM, Souza CLM, Portal TP, et al (2013) Effect of Castor Bean Oil on Post Harvest Fungal Pathogen of Coconut: *Lasiodiplodia theobromae*. *J Plant Physiol Pathol* 1:1–7. doi: 10.4172/2329-955X.1000108
- Griffon, E.; Maublanc A (1909) Sur une maladie du cacaoyer. *Bull la Société Mycol Fr* 25:51–58.
- Hartl DL, Grant A (2007) Principles of Population Genetics. 4th Edition.
- Hepperle D (2011) DNA Dragon 1.4.1 - DNA Sequence Contig Assembler Software.
- Ismail AM, Cirvilleri G, Polizzi G, et al (2012) *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica*) in Egypt. *Australas Plant Pathol* 41:649–660. doi: 10.1007/s13313-012-0163-1
- Jacobs K, Bergdahl DR, Wingfield MJ, et al (2004) *Leptographium wingfieldii* introduced into North America and found associated with exotic *Tomicus piniperda* and native bark beetles. *Mycol Res* 108:411–418. doi: 10.1017/S0953756204009748
- Jami F, Slippers B, Wingfield MJ, et al (2015) Temporal and spatial variation of

- Botryosphaeriaceae associated with *Acacia karroo* in South Africa. *Fungal Ecol* 15:51–62. doi: 10.1016/j.funeco.2015.03.001
- Jorge VR, Silva MR, Guillin EA, et al (2015) The origin and genetic diversity of the causal agent of Asian soybean rust, *Phakopsora pachyrhizi*, in South America. *Plant Pathol* 64:729–737. doi: 10.1111/ppa.12300
- Kasuga T, White TJ, Koenig G, et al (2003) Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Mol Ecol* 12:3383–3401. doi: 10.1046/j.1365-294X.2003.01995.x
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451–1452. doi: 10.1093/bioinformatics/btp187
- Lima JS, Moreira RC, Cardoso JE, et al (2013) Caracterização cultural, morfológica e patogênica de *Lasiodiplodia theobromae* associado a frutíferas tropicais. *Summa Phytopathol* 39:81–88. doi: 10.1590/S0100-54052013000200001
- Lins SR de O, Alves E, de Oliveira SMA (2010) Estudos Da Interação *Lasiodiplodia theobromae* X *Mangueira* E Caracterização Morfológica De Isolados Do Patógeno. *Acta Microsc* 19:221–231.
- Machado AR, Pinho DB, Pereira OL (2014) 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 Divers* 67:231–247. doi: 10.1007/s13225-013-0274-1
- Marques MW, Lima NB, De Morais MA, et al (2013) Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. *Fungal Divers* 61:181–193. doi: 10.1007/s13225-013-0231-z
- Marsberg A, Kemler M, Jami F, et al (2017) *Botryosphaeria dothidea* : a latent pathogen of global importance to woody plant health. *Mol Plant Pathol* 18:477–488. doi: 10.1111/mpp.12495
- Mohali S, Burgess TI, Wingfield MJ (2005) Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. *For Pathol* 35:385–396. doi: 10.1111/j.1439-0329.2005.00418.x
- Monteiro CM, Caron ES, da Silveira SF, et al (2013) Control of foliar diseases by the axillary application of systemic fungicides in Brazilian coconut palms. *Crop Prot* 52:78–83. doi: 10.1016/j.cropro.2013.05.013
- Muniz CR, da Silva GF, Souza Jr MT, et al (2014) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Lasiodiplodia theobromae*, the causal agent of gummosis in cashew nut plants. *Genet Mol Res* 13:2906–2913. doi: 10.4238/2014.February.21.8
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*.
- Nei M, Li W-H (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:5269–5273. doi: 10.1073/pnas.76.10.5269
- Netto MSB, Assunção IP, Lima GSA, et al (2014a) Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. *Fungal Divers* 67:127–141. doi: 10.1007/s13225-014-0279-4
- Netto MSB, Assunção IP, Lima GSA, et al (2014b) Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. *Fungal Divers* 67:127–141. doi:

- 10.1007/s13225-014-0279-4
- Patouillard, N.T.; Lagerheim G de. (1892) Champignons de l'Equateur (Pugillus II). Bull la Société Mycol Fr 8:113–140.
- Perera L, Russell JR, Provan J, Powell W (2000) Use of microsatellite DNA markers to investigate the level of genetic diversity and population genetic structure of coconut (*Cocos nucifera* L.). Genome 43:15–21.
- Perneel M, Tambong JT, Adiobo A, et al (2006) Intraspecific variability of *Pythium myriotylum* isolated from cocoyam and other host crops. Mycol Res 110:583–593. doi: 10.1016/j.mycres.2005.12.002
- Pinho DB, Dutra DC, Pereira OL (2013) Notes on *Ceratocystis paradoxa* causing internal post-harvest rot disease on immature coconut in Brazil. Trop Plant Pathol 38:152–157. doi: 10.1590/S1982-56762013000200010
- Pinho DB, Pereira OL, Soares DJ (2014) First report of *Gilbertella persicaria* as the cause of soft rot of fruit of *Syzygium cumini*. Australas Plant Dis Notes. doi: 10.1007/s13314-014-0143-0
- Posada D, Buckley TR (2004) Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of akaike information criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. Syst Biol 53:793–808. doi: 10.1080/10635150490522304
- Punithalingam E (1980) Plant diseases attributed to *Botryodiplodia theobromae* Pat. Bibl Mycol 71:1–123.
- R Development Core Team (2015) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Found. Stat. Comput. Vienna Austria 0:{ISBN} 3-900051-07-0.
- Rambaut A (2009) FigTree, a graphical viewer of phylogenetic trees.
- Rambaut A, Drummond AJ (2013) Tracer v1.6. Available from <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>
- Rannala B, Yang Z (1996) Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. J Mol Evol 43:304–311. doi: 10.1007/BF02338839
- Ribeiro, F.E. Soares, A.R. Ramalho MAP (1999) Divergência genética entre populações de coqueiro-gigante-do-brasil 1. 34:1615–1622.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19:1572–1574. doi: 10.1093/bioinformatics/btg180
- Rosado AWC, Machado AR, Freire F das CO, Pereira OL (2016a) Phylogeny, Identification, and Pathogenicity of *Lasiodiplodia* Associated with Postharvest Stem-End Rot of Coconut in Brazil. Plant Dis 100:561–568. doi: 10.1094/PDIS-03-15-0242-RE
- Rosado AWC, Machado AR, Freire F das CO, Pereira OL (2016b) Phylogeny, Identification, and Pathogenicity of *Lasiodiplodia* Associated with Postharvest Stem-End Rot of Coconut in Brazil. Plant Dis 561–568. doi: 10.1094/PDIS-03-15-0242-RE
- Santos PHAD (2016) MELHORAMENTO GENÉTICO DO COQUEIRO (*Cocos nucifera* L.): CAPACIDADE COMBINATÓRIA E DIVERSIDADE GENÉTICA VIA RAD-SEQUENCING. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Riberiro
- Souza Filho BF de, Santos HP, Robbs CF (1979) Etiologia da queima das folhas do coqueiro. Fitopatol Bras 4:5–10.
- Subileau C, Renard J-L, Lacoste L (1994) *Botryosphaeria cocogena* nov. sp. agent causal du dessechement foliaire du cocotier au Brésil. Mycotaxon 41:5–14.
- Summerell BA, Laurence MH, Liew ECY, Leslie JF (2010) Biogeography and

- phylogeography of *Fusarium*: a review. *Fungal Divers* 44:3–13. doi: 10.1007/s13225-010-0060-2
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
- Templeton AR (1998) Nested clade analyses of phylogeographic data: Testing hypotheses about gene flow and population history. *Mol Ecol* 7:381–397. doi: 10.1046/j.1365-294x.1998.00308.x
- Templeton AR, Crandall KA, Sing CF (1992) Cladistic Analysis of Phenotypic Associations With Haplotypes Inferred From Restriction Endonuclease Mapping and DNA Sequence Data. 111. Cladogram Estimation. *Genetics* 132:619–633.
- van der Linde JA, Six DL, Wingfield MJ, Roux J (2011) *Lasiodiplodia* species associated with dying *Euphorbia ingens* in South Africa. *South For* 73:165–173. doi: Doi 10.2989/20702620.2011.639499
- Viana FMP, Freire FCO, Barguil BM, et al (2002) Post-harvest basal rot of coconut fruits in the State of Ceara, Brazil. - Podridao basal pos-colheita do coco verde no Estado do Ceara. *Fitopatol Bras* 5.
- Vicente Mussi-Dias, Adão Valmir dos Santos M das GMF (2016) PYCNIDIA AND CONIDIA QUANTIFICATION OF LASIODIPLODIA USING A CULTURE MEDIUM ENRICHED WITH SUGARCANE BAGASSE. *J Agric Res* 2:1–16.
- WANG Y, TAN ZM, ZHANG DC, et al (2006) Phylogenetic and populational study of the *Tuber indicum* complex. *Mycol Res* 110:1034–1045. doi: 10.1016/j.mycres.2006.06.013

### 3.2 IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS BOTRYOSPHAERIACEOUS ASSOCIADOS À QUEIMA-DAS-FOLHAS DO COQUEIRO E A PODRIDÃO PEDUNCULAR \*

P.H.D. Santos, B.M. Carvalho, F.A.S. Aredes, V. Mussi-Dias, D.B. Pinho, M.G. Pereira and S.F. Silveira

#### RESUMO

A “queima-das-folhas do coqueiro” causada por *Lasiodiplodia theobromae*, provoca abscisão das folhas inferiores, diminuindo a sustentação dos cachos, e conseqüentemente, ocasiona uma redução drástica da produção de coco no Brasil. Este trabalho teve como objetivo o estudo da etiologia desta doença baseando-se na combinação de análises morfológicas e filogenéticas para identificar os táxons associados aos sintomas e avaliar a sua patogenicidade ao coqueiro. Foram avaliados o crescimento micelial do fungo, coloração da colônia, dimensão dos conídios e patogenicidade dos isolados em frutos de coqueiro. As análises filogenéticas foram realizadas por meio de árvore multigene (ITS e TEF-1 $\alpha$ ) pela inferência Bayesiana. Seis espécies foram identificadas causando sintomas em frutos e em plantas: *L. brasiliense*, *L. egyptiaca*, *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae*, *Fusicoccum fabicercianum* e *Botryosphaeria dothidea*. Embora todos os isolados demonstrassem capacidade de infectar os frutos, esses variaram quanto à agressividade. *L. theobromae* foi em sua

\*Parte da tese de doutorado submetida na revista Tropical Plant Pathology.

maioria a espécie menos agressiva, apesar de ser, o mais comum, encontrado nos isolamentos. Este estudo representa o primeiro relato de *F. fabicercianum* e *B. dothidea* além de *L. theobromae* como agentes causais da queima das folhas do coqueiro e podridão basal em frutos. Também foi possível evidenciar a grande diversidade entre isolados das espécies identificadas, causando estas doenças no coqueiro.

## ABSTRACT

Coconut productivity is directly related to the number of healthy leaves per plant. The "coconut leaf blight" disease (*Lasiodiplodia theobromae*), causes lower leaves abscission, which takes bunches unsupported causing a premature fall, before reaching the harvest point. This study aimed to study the etiology of this disease based on the combination of morphological and phylogenetic analyses to identify the taxa responsible for the symptoms and to evaluate its pathogenicity to coconut. Mycelial growth, colony staining, conidial dimensions and isolates pathogenicity in coconut fruits were evaluated. Phylogenetic analyzes were performed by producing a multigene tree (ITS and TEF-1 $\alpha$ ) by Bayesian inference. Six species were identified causing symptoms in fruits and plants: *L. brasiliense*, *L. egyptiaca*, *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae*, *Fusicoccum fabicercianum* and *Botryosphaeria dothidea*. Although all the isolates showed the ability to infect the fruits, they varied in their aggressiveness. *L. theobromae* was mostly the least aggressive isolates, although it was the most common isolates found. This study represents the first report of *F. fabicercianum* and *B. dothidea* besides *L. theobromae* as causal agents of the "coconut leaf blight" and Stem-End Rot in fruits. In addition, highlight the high diversity among isolates of the identified species.

## INTRODUÇÃO

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é considerado uma das espécies perenes de maior relevância do mundo, pois detém a capacidade de gerar emprego e, conseqüentemente, renda em vários países, seja através do consumo de seus frutos *in natura*, industrialização do fruto ou outros órgãos desta planta (raiz, estipe, inflorescência, folhas e palmito). Além disso, o coqueiro é utilizado como planta paisagística adornando espaços (Fontes & Wanderley 2006).

No Brasil e principalmente na região sudeste, lavouras de coqueiro Anão-Verde, muitas dos quais recém-implantadas, têm sido abandonadas devido à ataques severos e constantes de doenças e pragas, associados à baixa disponibilidade de água para irrigação e ao baixo nível tecnológico empregado. Na maioria destas lavouras predomina a mão-de-obra familiar (Aragão & Ribeiro Melo, 2009).

A produtividade do coqueiro é diretamente relacionada ao número de folhas sadias por planta. Plantas adultas da cultivar Anã-Verde de Jiqui (AVEJ) tornam-se improdutivas quando apresentam menos de 18 folhas (Monteiro et al. 2013). Doenças foliares fúngicas causam morte prematura das folhas do coqueiro, e conseqüentemente, redução da área foliar reduzindo a produtividade.

Dentre as doenças do coqueiro que incidem severamente nas lavouras do sudeste, destaca-se a “queima-das-folhas” (*Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon e Maubl ), provocando abscisão das folhas inferiores, o que deixa os cachos sem sustentação (Fontes & Wanderley 2006). Frutos de cachos sem folhas caem prematuramente, antes de atingirem o ponto de colheita.

Estudos comprovam a existência de espécies “crípticas” em *L. theobromae* (Alves et al. 2008), havendo indicações de que tanto por morfologia, quando por patogenicidade, os isolados de coqueiro diferenciam-se de outros descritos na mesma espécie. Assim, acredita-se que haja variabilidade genética suficiente que permita diferenciar isolados de *L. theobromae* de coqueiro das diferentes regiões do Brasil.

Essas informações, reforçam a necessidade de se revisar o status de *L. theobromae* como único agente causal da queima das folhas do coqueiro, por meio de análises moleculares, já que a identificação deste fungo só foi realizada por morfologia, o que pode levar a variações na identificação (Sousa Filho et. al. 1979). Esta identificação, de mais de um patógeno causando a mesma doença em um hospedeiro, já foi relatada em alguns trabalhos, como por exemplo o de Maques et al. (2013), onde os

autores encontraram oito espécies de *Lasiodiplodia* associadas com a podridão peduncular em manga, doença anteriormente atribuída somente à *L. theobromae*.

Espécies de *Botryosphaeriace* são associadas como patogênicas à inúmeras plantas, atuando tanto como patógenos primários quanto secundários, ou ainda como endofíticos que em condições de stress do hospedeiro podem se tornar patogênicos (Crous et al. 2006).

Estudos, envolvendo marcadores genético-moleculares e classificação filogenética já são amplamente usados e aceitos como ferramentas importantes para a caracterização de fungos, sendo protagonistas de inúmeros trabalhos nessa área (Ismail et al. 2012; Pinho et al. 2013; Pinho et al. 2014; Rosado et al. 2016b).

Este trabalho teve como objetivo o estudo da etiologia da queima das folhas do coqueiro no Brasil, utilizando análises morfológicas e filogenéticas para identificar os táxons associados aos sintomas da doença e a patogenicidade dos mesmos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Isolamento e armazenamento das amostras

Noventa amostras foram coletadas de coqueiros com sintomas de “Queima das folhas” e categorizadas de acordo com o órgão da planta (Folhas, frutos, ráquis e estipe) e localização. As coletas ocorreram nas três principais regiões produtoras do litoral brasileiro (Norte, Nordeste e Sudeste). Amostras de plantas sem sintomas também foram coletadas e submetidas ao isolamento indireto para a averiguação de possíveis isolados endofíticos. Isolados oriundos de outros hospedeiros também foram coletados.

O isolamento dos patógenos foi realizado como descrito por Ismail (2012). As culturas puras foram obtidas pela excisão de pontas da hifa nas bordas da colônia em BDA, as quais foram incubadas a 25°C no escuro. Todas as culturas foram mantidas na coleção de culturas da Clínica Fitossanitária da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

### Caracterização morfológica das culturas e isolados

Visando caracterizar o crescimento e esporulação dos isolados foi instalado em meio de cultura enriquecido com bagaço de cana (Mussi-Dias et al., 2016) um experimento no qual se observou o crescimento micelial, coloração das colônias e a morfologia dos conídios, após incubação a  $28 \pm 1$  °C, sob regime de alternância luminosa com fotoperíodo de 12 h. A avaliação do crescimento micelial foi constituída pela medição do diâmetro das colônias em duas direções ortogonais, a cada 12 h, obtendo-se uma média para cada repetição. As avaliações foram concluídas quando o primeiro isolado atingiu a borda da placa, determinando-se assim, a velocidade média de crescimento do fungo (cm/dia). A coloração predominante da colônia foi observada após 15 dias de incubação, utilizando-se uma escala descritiva reportada por Lima et. Al.,(2013). Utilizou-se, o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições, em que cada placa constituiu uma unidade experimental.

As dimensões dos conídios, considerando comprimento, largura, área e a relação comprimento/largura foram avaliadas, após esporulação por microscopia de luz (Nikon Eclipse 80i) sob aumento de 400X, com auxílio do software NIS – Elements.

. Avaliou-se 30 conídios por isolado. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de significância, utilizando o programa R (R Development Core Team 2015), no pacote ExpDes (Ferreira et al. 2014).

### **Caracterização patogênica dos isolados**

A patogenicidade de cada isolado foi realizada em frutos de coqueiro, os quais foram obtidos em plantações com ausência de pulverização com fungicidas e inseticidas. Realizou-se a desinfestação da superfície dos frutos imergindo-os em um solução de hipoclorito de sódio a1% por 5 minutos, os quais foram posteriormente enxaguados com água corrente. Após a secagem dos frutos, ferimentos foram feitos com um furador de rolhas com aproximadamente 1 cm de diâmetro x 1 cm de profundidade da porção basal de cada fruto (as brácteas foram anteriormente removidas). Cada isolado foi inoculado na região perfurada com um disco de micélio cultivados por 7 dias em meio. Nos frutos controle adicionou-se somente um disco de BDA sem o fungo. Todos os frutos foram mantidos por 11 dias em câmara de crescimento à uma temperatura de 28°C.

O experimento foi delineado em DIC com quatro repetições onde os tratamentos foram constituídos pelos isolados e a parcela experimental foi cada fruto inoculado. As avaliações foram realizadas no 11º dia da inoculação da seguinte forma: a água do coco foi extraída com um furador manual e, em seguida, os frutos foram seccionados no sentido longitudinal, de forma que o eixo central do coco ficasse exposto. Antes da oxidação interna dos tecidos e para facilitar a visualização da área lesionada pelo fungo, pincelou-se com tinta preta apenas a área afetada. Posteriormente, cada metade do fruto foi fotografada com câmera digital Canon® Ti5, de forma a obter uma imagem inteira e plana do mesocarpo com a extensão da área sadia em relação a área doente. Todas as imagens foram trabalhadas no programa Quant® (Vale et al. 2003), para se obter a porcentagem de área lesionada em relação área não lesionada de cada metade de fruto.

Os dados coletados foram avaliadas submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste de Scott-Knott ( $p=0,05$ ) usando o programa R (R Development Core Team 2015) no pacote ExpDes (Ferreira et al. 2014). Foi realizado o reisolamento do patógeno de todos os frutos analisados.

### **Extração de DNA e sequenciamento**

O DNA genômico foi extraído pela maceração do micélio no disruptor de células (Loccus L-Beader 3) a 3700 rpm durante 40 s. Após a maceração, a extração seguiu o protocolo utilizado por (Pinho et al. 2013), utilizando o kit de purificação de DNA genômico da Promega (WizardGenomic DNA Purification Kit). O DNA eluído foi armazenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até sua utilização.

A qualidade da extração do DNA genômico foi verificada por meio da eletroforese em gel de agarose 1 %. O gel consiste em 100 mL de solução TAE 1 X e 1 g de agarose. Essa mistura foi dissolvida em forno micro-ondas e posteriormente resfriada para aplicação dos DNAs. Uma alíquota de 2  $\mu\text{L}$  de cada amostra de DNA foi misturada a 3  $\mu\text{L}$  de gelred e 3  $\mu\text{L}$  de blue Juice e aplicados ao gel de eletroforese em tampão TAE 1X. O marcador 100 bp foi utilizado como padrão de peso molecular. A eletroforese foi realizada a 80 V por 1 hora. Em seguida, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta em fotodocumentador. As reações de amplificação foram realizadas com os iniciadores ITS1 (5' -TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'') e ITS4 (5''-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'') para a região ITS (White et al. 1990), e EF1-728F (5' -CATCGAGAAGTTCGAGAA-3') e EF2 (5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT-

3') para a região fator de alongação (Jacobs et al. 2004). As condições da reação foram as seguintes: 50 ng de DNA, tampão PCR 1x, 1,5U de Taq polimerase, 0,06  $\mu$ M de primers (3 pmol/reação), 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, e volume final de 50  $\mu$ l. A amplificação foi realizada em termociclador modelo Veriti<sup>®</sup> Thermal Cycler, com desnaturação inicial a 94° C por 2 minutos; 35 ciclos de 30 segundos a 94° C, 1 minuto a 55° C, 1 minuto a 72° C; seguida de extensão final de 3 minutos a 72° C. Os produtos da amplificação da PCR foram visualizados e quantificados em gel de agarose 1% (p/v) com o marcador de massa Kasvi DNA Ladder, RTU modelo K9-100 L.

Os produtos amplificados foram purificados utilizando o sistema comercial de purificação Agencourt AMPure XP (Ambion Magnetic Stand-96), seguindo as recomendações do fabricante. Foi adicionado cuidadosamente 36  $\mu$ L do reagente AMPure em cada poço da placa contendo 20  $\mu$ L dos produtos de PCR de cada fungo e esse material foi misturado 10 (dez) vezes com pipeta eletrônica. As amostras foram incubadas por 5 (cinco) minutos à temperatura ambiente. A placa com a reação foi colocada sobre a placa magnética Agencourt SPRIPlate 96 durante 2 (dois) minutos. Em seguida, a solução foi retirada da placa e descartada. Alíquotas de 200  $\mu$ L de etanol 70% foram adicionados em cada poço da placa de reação e incubados durante 30 (trinta) segundos à temperatura ambiente. Logo após, o etanol foi descartado e repetiu-se esse processo por 2 (duas) vezes. Essas etapas foram realizadas com a placa de reação sobre a placa magnética. Em seguida, foi adicionado 40  $\mu$ L de tampão Tris-acetato, pH 8,0, em cada poço da placa de reação e esse material foi misturado com pipeta 10 (dez) vezes, ficando por 1 (um) minuto sobre a placa magnética. As amostras purificadas foram transferidas para uma nova placa e enviadas para sequenciamento na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda (Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil).

As sequências de nucleotídeos foram editadas com o software DNA Dragon (Hepperle 2011). Todas sequências foram corrigidas manualmente e o arranjo dos nucleotídeos em posições ambíguas foram corrigidas utilizando as sequências dos iniciadores no sentido 5'–3' e 3'–5'. As novas sequências foram depositadas no GenBank (Tabela 1) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e sequências adicionais das regiões ITS e TEF-1 $\alpha$  foram obtidas do GenBank para identificação dos isolados.

### **Análises filogenéticas**

Regiões consenso foram comparadas no banco de dados do GenBank utilizando o programa Mega BLAST. As novas sequências (Tabela 1) foram adicionadas ao conjunto de sequências obtido no Genbank e alinhadas no programa MUSCLE<sup>®</sup> (Edgar 2004) existente no software MEGA v. 7 (Kumar et al. 2016). Espaços (Gaps) (inserções/deleções) foram tratados como inexistentes.

Tabela 1: Isolados incluídos no estudo filogenético de fungos associados a *Cocos nucifera* no Brasil

Espécie	Isolado	Hospedeiro	Localidade	Genbank	
				ITS <sup>a</sup>	TEF 1- $\alpha$ <sup>b</sup>
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CBS 164.96	<i>Frutos ao longo de corais</i>	Papua New Guinea	AY640255	AY640258
	CBS 124.13	-	EUA	EU673195	DQ458875
	<b>CF/UENF428<sup>c</sup></b>	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	KY655194	KY223711
	<b>CF/UENF427</b>	<i>Persea americana</i>	Brasil	KY655193	KY223707
	<b>CF/UENF421</b>	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	KY655200	KY223708
	<b>CF/UENF423</b>	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	KY655202	KY223710
	<b>CF/UENF429</b>	<i>Capparis flexuosa</i>	Brasil	KY655195	KY223712
	<b>CF/UENF438</b>	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	KY655211	KY223717
	<b>CF/UENF430</b>	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	KY655203	KY223713
	<b>CF/UENF432</b>	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	KY655205	KY223715
	<b>CF/UENF425</b>	<i>Elaeis guineensis</i>	Brasil	KY655191	KY223705
	<b>CF/UENF422</b>	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	KY655201	KY223709
	<b>CF/UENF435</b>	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	KY655208	KY223716
	<b>CF/UENF431</b>	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	KY655204	KY223714
	<b>CF/UENF420</b>	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	KY655199	KY223720
	<b>CF/UENF426</b>	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	KY655192	KY223706
	<b>CF/UENF437</b>	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	KY655210	KY223718
<b>CF/UENF419</b>	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	KY655198	KY223719	
<i>Lasiodiplodia crassispora</i>	CBS110492	-	-	EF622086	EF622066
	CMW22653	<i>Pterocarpus angolensis</i>	África do Sul	FJ888465	FJ888452
<i>Lasiodiplodia margaritacea</i>	CBS122065	<i>Adansonia gibbosa</i>	Austrália	EU144051	EU144066.1
	CBS122519	<i>Adansonia gibbosa</i>	Austrália	EU144050	EU144065
<i>Lasiodiplodia brasiliense</i>	CMM2255	<i>Carica papaya</i>	Brasil	KC484792	KC481523
	CMM4015	<i>Mangifera indica</i>	Brasil	JX464063	JX464049
	COAD 1784	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	KP244693	KP308469
	COAD 1786	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	KP244696	KP308471

	<b>CF/UENF436</b>	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	KY655209	KY223705
	<b>CF/UENF439</b>	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	KY655212	KY223719
<i>Lasiodiplodia viticola</i>	UCD2553AR	-	-	HQ288227	HQ288269
	UCD2604MO	-	-	HQ288228	HQ288270
<i>Lasiodiplodia exigua</i>	BL104	<i>Genista monspessulana</i>	Tunisia	KJ638317	KJ638336
	BL185	<i>Genista monspessulana</i>	Tunisia	KJ638319	KJ638338
<i>Lasiodiplodia mahajangana</i>	CMW27801	<i>Terminalia catappa</i>	Madagascar	FJ900595	FJ900641
	CMW27820	<i>Terminalia catappa</i>	Madagascar	FJ900597	FJ900643
<i>Lasiodiplodia egyptiaca</i>	BOT10	<i>Mangifera indica</i>	Egito	JN814397	JN814424
	BOT29	<i>Mangifera indica</i>	Egito	JN814401	JN814428
	<b>CF/UENF417</b>	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	KY655196	KY223714
<i>Lasiodiplodia citricola</i>	IRAN1521C	-	-	GU945353	GU945339
	IRAN1522C	-	-	GU945354	GU945340
<i>Lasiodiplodia euphorbicola</i>	CMM3609	<i>Jatropha curcas</i>	Brasil	KF234543	KF226689
	CMM3652	<i>Jatropha curcas</i>	Brasil	KF234554	KF226715
<i>Lasiodiplodia hormozganensis</i>	IRAN1498C	-	-	GU945356	GU945344
	IRAN1500C	-	-	GU945355	GU945343
<i>Lasiodiplodia parva</i>	CBS:495.78	<i>Manihot esculenta</i>	Colômbia	KX464138	KX464632
	CBS 456.78	<i>Manihot esculenta</i>	Colômbia	NR_111265	EF622063
<i>Lasiodiplodia mediterranea</i>	BL1	<i>Quercus ilex</i>	Itália	KJ638312	KJ638331
	BL101	<i>Vitis vinifera</i>	Itália	KJ638311	KJ638330
<i>Lasiodiplodia subglobosa</i>	CMM3872	<i>Jatropha curcas</i>	Brasil	KF234558	KF226721
	CMM4046	<i>Jatropha curcas</i>	Brasil	KF234560	KF226723
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	CBS116459	<i>Gmelina arborea</i>	Costa Rica	EF622077	EF622057
	CMM3887	<i>Jatropha curcas</i>	Brasil	KF234559	KF226722
	<b>CF/UENF434</b>	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	KY655207	KY223718
	<b>CF/UENF433</b>	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	KY655206	KY223721
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	IRAN1517C	-	-	GU945349	GU945337
	IRAN1519C	-	-	GU945350	GU945338

<i>Lasiodiplodia gilanensis</i>	IRAN1501C	-	-	GU945352	GU945341
	IRAN1523C	-	-	GU945351	GU945342
<i>Lasiodiplodia venezuelensis</i>	WAC12539	<i>Acacia mangium</i>	Venezuela	DQ103547	DQ103568
	CMW13513	<i>Acacia mangium</i>	Venezuela	DQ103549	DQ103570
<i>Fusicoccum fabicercianum</i>	CMM3928	<i>Mangifera indica</i>	Brasil	JX513639	JX513619
	CMM3925	<i>Mangifera indica</i>	Brasil	JX513640	JX513620
	CMW41226	<i>Avicennia marina</i>	África do Sul	KP860875	KP860718
	CMM3905	<i>Mangifera indica</i>	Brasil	JX513642	JX513622
	<b>CF/UENF418</b>	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	KY655197	KY223714
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	CMM3937	<i>Mangifera indica</i>	Brasil	JX513643	JX513622
	CMM3938	<i>Mangifera indica</i>	Brasil	JX513645	JX513624
	<b>CF/UENF416</b>	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	KY655190	KY223723

<sup>a</sup>ITS = internal transcribed spacer; <sup>b</sup>TEF1- $\alpha$  = translation elongation factor 1- $\alpha$ . <sup>c</sup> Isolados obtidos neste estudo estão destacados em negrito. CF/UENF = Coleção da Clínica Fitossanitária da the Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF.

A análise multigene de Inferência Bayesiana (BI) empregando o método da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) foi realizada. MrMODELTEST (Posada & Buckley 2004) foi utilizado para selecionar o modelo de substituição de nucleotídeos para análise de BI. Os modelos foram estimados separadamente para cada região gênica. Os valores de verossimilhança foram calculados e o modelo selecionado de acordo com Akaike Information Criterion (AIC). Os modelos de evolução selecionados para cada região gênica foram SYM+I para ITS e HKY+I+G para TEF1- $\alpha$ . A análise de BI foi concluída com MrBayes v.3.1.1 (Ronquist & Huelsenbeck 2003). As quatro cadeias MCMC foram conduzidas simultaneamente, iniciando as árvores aleatoriamente até  $10^7$  de gerações. As árvores foram amostradas a cada 1 000 gerações, resultando em 10 000 árvores. As primeiras 2500 árvores foram descartadas da análise. Os valores de probabilidade posterior (Rannala & Yang 1996) foram determinados da árvore consenso através das 7500 árvores remanescentes. A convergência dos log de verossimilhança foi analisada com o software TRACER v. 1.4.1 (Rambaut & Drummond 2013). A árvore foi visualizada no software FigTree (Rambaut 2009) e exportada para programas gráficos. A espécie *Barriopsis fusca* CBS174.26 foi utilizada como grupo externo (outgroup) nas análises.

## Resultados e Discussão

### Análise Filogenética

A análise filogenética combinada (ITS e TEF-1 $\alpha$ ) foi realizada com 66 taxa, e o alinhamento das sequências resultou num total de 1545 caracteres, dos quais 182 foram informativos para parcimônia, 228 foram variáveis e 1260 foram conservados. Pela análise filogenética foi possível a identificação de quatro espécies de *Lasiodiplodia*: *L. brasiliense* M. S. B. Netto, M. W. Marques & A. J. L. Phillips, *L. egyptiacae* A. M. Ismail, L. Lombard & Crous, *L. pseudotheobromae* A.J.L. Phillips, A. Alves & Crous, e *L. theobromae*. Além disso foram identificados isolados de *Fusicoccum fabicercianum* S.F. Chen, Pavlic, M.J. Wingfield & X.D. Zhou e *Botryosphaeria dothidea* Cesati & De Notaris. Estas espécies foram agrupadas em seis clados (Figura 1). A maioria dos

isolados (n= 16) formaram o maior clado da árvore, agrupados com *L. theobromae* e apresentaram o valor de probabilidade posterior (pp) de 0,92, confirmando a ampla distribuição deste patógeno pelo mundo, assim como reportado por Marques et al. (2013) e Rosado (2016a). Observou-se a formação de mais dois clados de *L. brasiliense* e *L. pseudotheobromae* com dois isolados cada (pp= 0,99 e 1 respectivamente). Agrupamentos contendo um isolado do estudo foi observado nas espécies *L. egyptiaca*, *F. fabicercianum* e *B. dothidea* (pp= 0,98, 1 e 0,99 respectivamente). Estes resultados assim como os encontrados por Marques et al. (2013) e Neto et al. (2014b) apontam as espécies *L. egyptiaca* *L. pseudotheobromae* como as segundas mais frequentes.

Os isolados identificados de *L. theobromae* foram oriundos de diferentes locais do país e partes da planta. Esta espécie é conhecida por sua distribuição cosmopolita e sua ampla gama de hospedeiros (Punithalingam 1980; Burgess et al. 2006). O isolado CF/UENF416 (*B. dothidea*), foi obtido de amostras da estipe da planta sem sintomas na região do norte fluminense, os isolados CF/UENF417 e CF/UENF418 (*L. egyptiaca*) e (*F. fabicercianum*) foram oriundos de frutos amostrados na Bahia e Norte Fluminense respectivamente. Os isolados CF/UENF433, CF/UENF434 (*L. pseudotheobromae*) CF/UENF436 (*L. brasiliense*) foram isolados da ráquis, apresentando sintomas de queima e encontrados em Pernambuco e o isolado CF/UENF436 (*L. brasiliense*) foi isolado da inflorescência apresentando necrose e oriundo de Alagoas.

A queima das folhas e a podridão basal dos frutos em coqueiro tem sido tratadas como doenças distintas pelos pesquisadores. Os resultados obtidos neste trabalho identificaram não só *L. theobromae* causando sintomas em diferentes órgãos da planta, como outras espécies de *Lasiodiplodia* sp., *F. fabicercianum* e *B. dothidea*, indicando que assim como a podridão basal (Rosado et al. 2016b), a queima das folhas pode estar associada à um complexo de espécies. Este trabalho é o primeiro a identificar *F. fabicercianum* e *B. dothidea* causando sintomas em coqueiro.

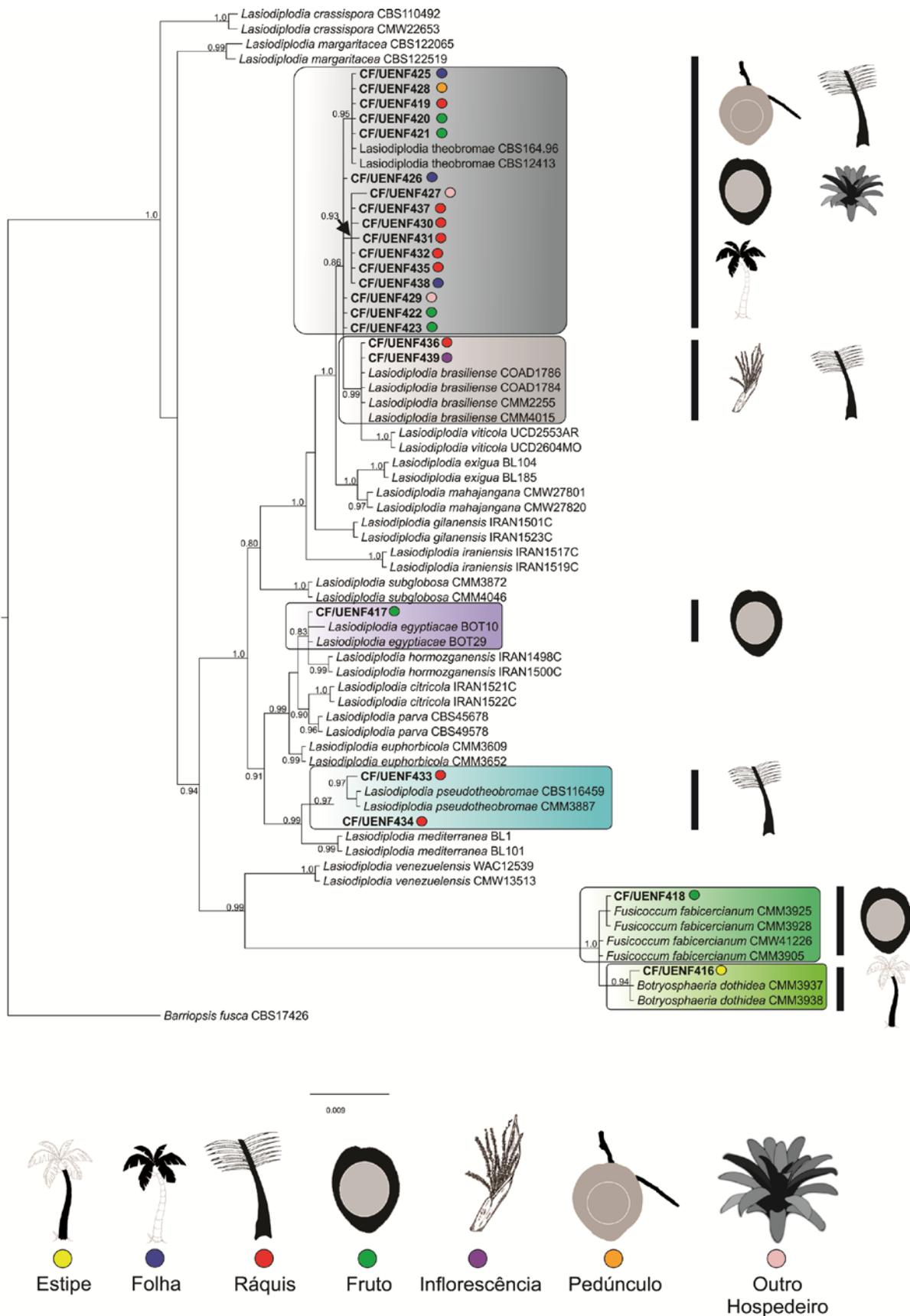


Figura 2 – Filograma baseado na Inferência Bayesiana de sequências combinadas dos genes ITS e TEF 1- $\alpha$  de isolados de Botryosphaeriaceae, associados à *Cocos nucifera*. A probabilidade posterior está indicada próxima aos nós dos ramos. A árvore foi enraizada em *Barriopsis fusca* CBS 17426

### **Caracterização cultural e morfológica dos isolados**

Os isolados apresentaram uma taxa média de crescimento micelial de: 8,7 cm/dia (*L. brasiliense*), 7,82 cm/dia (*L. egyptiacae*), 7,2 cm/dia (*L. theobromae*), 7,39 cm/dia (*L. pseudotheobromae*), 4,47 cm/dia (*B. dothidea*) e 3,52 cm/dia (*F. fabicercianum*) (Tabela 2). Observou-se ainda entre os isolados e espécies, diferença significativa entre as médias de crescimento micelial, ocorrendo também variação na coloração da colônia na população de fungos estudada cultivada BDA (Tabela 2), que variou de cinza claro (Figura 2, A até K), cinza escuro (Figura 2, L até T) e preto (Figura 2, U até W). Os dados de variações entre os isolados referentes à taxa de crescimento micelial e coloração da colônia, se enquadram dentro dos limites sugeridos por outros autores (Alves et al. 2008; Abdollahzadeh et al. 2010; Lins et al. 2010; Freire et al. 2013; Machado et al. 2014).

Tabela 2: Taxa de crescimento micelial e coloração da colônia de 23 isolados de fungos patogênicos ao coqueiro (*Cocos nucifera*), cultivados em meio BDA

Isolado	Espécie	Crescimento (cm/dia)*	Coloração***
CF/UENF428	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	8,95 A**	CZE
CF/UENF436	<i>Lasiodiplodia brasiliense</i>	8,75 A	CZE
CF/UENF427	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	8,67 A	CZC
CF/UENF421	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	8,61 A	CZC
CF/UENF423	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	8,61 A	CZC
CF/UENF429	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	8,50 A	PR
CF/UENF433	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	8,46 A	CZC
CF/UENF438	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	8,38 A	CZC
CF/UENF430	<i>Lasiodiplodia. theobromae</i>	7,88 B	CZC
CF/UENF432	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	7,88 B	CZC
CF/UENF417	<i>Lasiodiplodia egyptiaca</i>	7,82 B	PR
CF/UENF425	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	7,70 B	CZC
CF/UENF422	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	7,62 B	CZC
CF/UENF439	<i>Lasiodiplodia brasiliense</i>	7,40 B	CZE
CF/UENF435	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	7,17 C	CZE
CF/UENF431	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	7,08 C	CZE
CF/UENF434	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	6,33 D	CZC
CF/UENF420	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	5,88 E	CZC
CF/UENF426	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	5,75 E	CZE
CF/UENF416	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	4,47 F	PR
CF/UENF437	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	3,95 G	CZE
CF/UENF418	<i>Fusicoccum fabicercianum</i>	3,52 G	CZE
CF/UENF419	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	2,70 H	CZE

\* Médias de 4 repetições por tratamento. \*\*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância; \*\*\*CZC = cinza claro, CZE = cinza escuro, PR = preto.

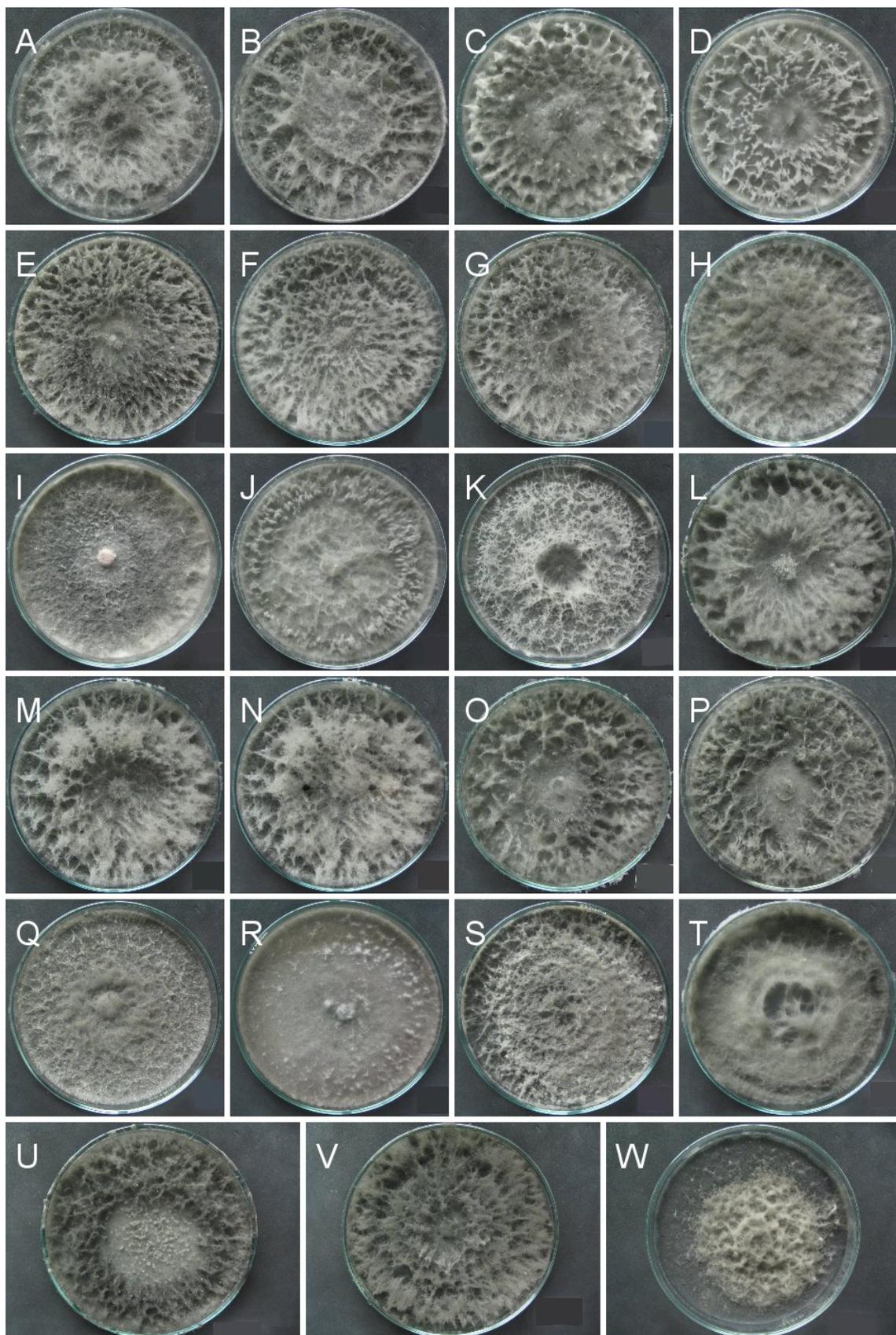


Figura 2 – Colônias de isolados utilizados neste estudo, cultivados em BDA

O agrupamento dos isolados em relação ao crescimento micelial e coloração da colônia ocorreu de forma distinta entre os isolados independente da espécie. Taxas médias de crescimento entre isolados da mesma planta hospedeira foram referidas em outros estudos (Dias et al. 2005; van der Linde et al. 2011; Netto et al. 2014a). A maioria dos isolados apresentou colônia de coloração cinza claro (Tabela2).

A dimensão média dos conídios, foi de 23 x 13  $\mu\text{m}$  para (*L. theobromae*), 26 x 16  $\mu\text{m}$  (*F. fabicercianum*), 14 x 23  $\mu\text{m}$  (*B. dothidea*) 25 x 13  $\mu\text{m}$  (*L. egyptiacae*), 22 x 13  $\mu\text{m}$  (*L. brasiliense*) e 22 x 24  $\mu\text{m}$  (*L. pseudotheobromae*). A relação comprimento/largura variou entre 0,6 e 1,86 com área entre 241  $\mu\text{m}^2$  e 338  $\mu\text{m}^2$  (Tabela 3). Em todas as análises, houve diferença estatística entre os conídios mas não houve um agrupamento das espécies, ressaltando a importância das técnicas moleculares para a identificação das espécies desta família.

Tabela 3: Dimensões dos conídios de 23 isolados patogênicos ao coqueiro (Cocos nucifera)

Comprimento (µm)		Diâmetro (µm)		Relação C/L <sup>1</sup>		Área (µm <sup>2</sup> )	
Isolado	Média*	Isolado	Média*	Isolado	Média*	Isolado	Média*
CF/UENF426	26,75 A**	CF/UENF416	23,50 A	CF/UENF433	2,19 A	CF/UENF418	338,51 A
CF/UENF419	26,66 A	CF/UENF418	16,71 B	CF/UENF426	1,91 B	CF/UENF433	336,35 A
CF/UENF418	26,28 A	CF/UENF423	15,51 C	CF/UENF419	1,89 B	CF/UENF416	331,05 A
CF/UENF420	25,86 B	CF/UENF420	14,40 D	CF/UENF417	1,86 B	CF/UENF417	323,95 A
CF/UENF423	25,80 B	CF/UENF419	14,12 D	CF/UENF427	1,85 B	CF/UENF423	311,95 B
CF/UENF417	25,56 B	CF/UENF426	14,06 D	CF/UENF437	1,84 B	CF/UENF426	309,93 B
CF/UENF437	24,64 C	CF/UENF429	14,04 D	CF/UENF420	1,80 B	CF/UENF419	309,36 B
CF/UENF427	24,56 C	CF/UENF422	14,01 D	CF/UENF421	1,70 C	CF/UENF420	293,69 C
CF/UENF433	24,26 C	CF/UENF417	13,81 D	CF/UENF431	1,69 C	CF/UENF437	274,47 D
CF/UENF439	22,41 D	CF/UENF434	13,63 E	CF/UENF423	1,68 C	CF/UENF427	273,89 D
CF/UENF436	22,33 D	CF/UENF439	13,62 E	CF/UENF432	1,68 C	CF/UENF439	242,04 E
CF/UENF438	22,12 D	CF/UENF435	13,60 E	CF/UENF425	1,67 C	CF/UENF436	241,65 E
CF/UENF432	22,07 D	CF/UENF436	13,55 E	CF/UENF428	1,67 C	CF/UENF422	239,91 E
CF/UENF435	22,00 D	CF/UENF437	13,37 E	CF/UENF438	1,67 C	CF/UENF432	237,43 E
CF/UENF421	21,63 E	CF/UENF427	13,31 E	CF/UENF436	1,66 C	CF/UENF429	236,53 E
CF/UENF431	21,62 E	CF/UENF438	13,24 E	CF/UENF439	1,65 C	CF/UENF421	236,53 E
CF/UENF429	21,53 E	CF/UENF432	13,12 F	CF/UENF430	1,65 C	CF/UENF438	236,22 E
CF/UENF422	21,41 E	CF/UENF431	12,84 F	CF/UENF435	1,62 C	CF/UENF435	235,64 E
CF/UENF428	21,34 E	CF/UENF425	12,83 F	CF/UENF418	1,59 D	CF/UENF431	231,61 F
CF/UENF425	21,30 E	CF/UENF421	12,79 F	CF/UENF429	1,54 D	CF/UENF425	230,10 F
CF/UENF430	20,84 F	CF/UENF428	12,78 F	CF/UENF422	1,54 D	CF/UENF428	229,95 F
CF/UENF434	20,31 F	CF/UENF430	12,58 F	CF/UENF434	1,49 D	CF/UENF430	222,93 F
CF/UENF416	14,10 G	CF/UENF433	11,30 G	CF/UENF416	0,60 E	CF/UENF434	222,25 F
Média	22,84		14,03		1,67		267,21
C.V. (%)	9,00		8,35		12,25		12,52

\*Médias de 30 repetições por tratamento. \*\*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância; <sup>1</sup>C/L = relaçãocomprimento/largura.

### Caracterização patogênica dos isolados

Todos os isolados foram capazes de colonizar os tecidos dos frutos de coco testados, demonstrado pelo desenvolvimento de lesões 10 dias após a inoculação e foram re-isolados após a abertura dos frutos. Observou-se os sintomas iniciando abaixo das brácteas, causando uma podridão seca externamente (Viana et al. 2002) enquanto que internamente provocou podridão do mesocarpo, rachadura e exposição do albúmen líquido (água de coco) à contaminação e deterioração secundária. Acredita-se que as espécies relatadas neste trabalho colonizam internamente a planta indo em direção ao cacho e atingindo o pedúnculo do fruto.

Embora todos os isolados demonstrassem capacidade de infectar os frutos, esses variaram quanto à agressividade (Figura 3). *L. theobromae* foi, em sua maioria (56%) o menos agressivo.

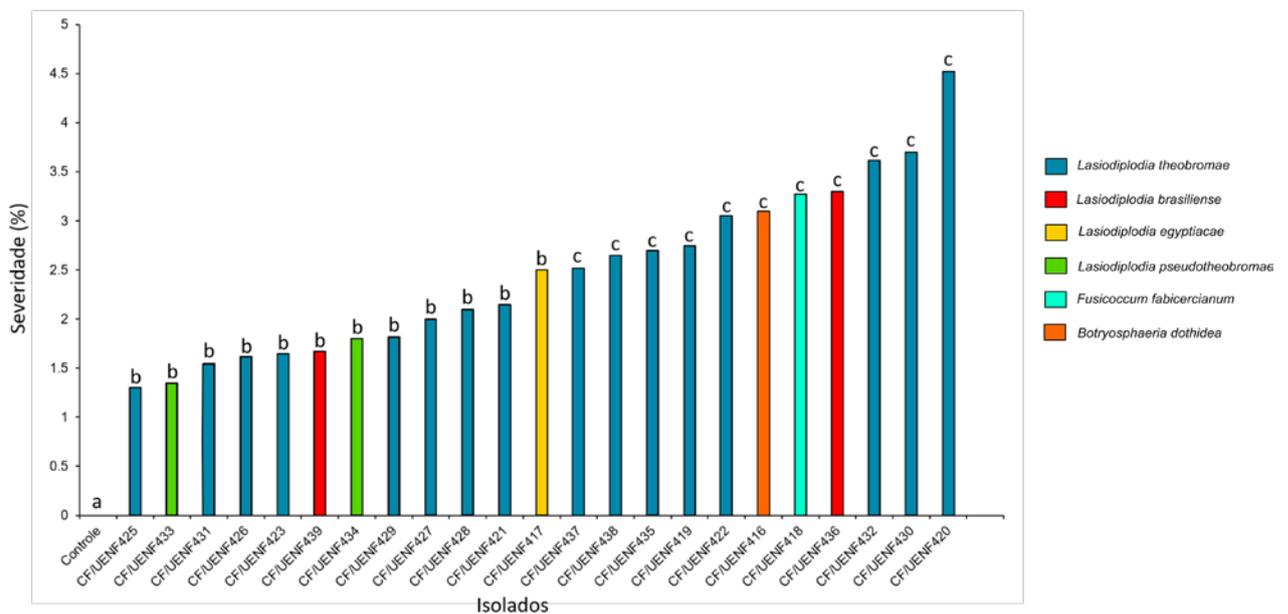


Figura 3: Severidade média das lesões em frutos de coqueiro inoculados com isolados de fungos patogênicos ao coco. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

Outros autores também reportaram *L. theobromae* como o mais agressivo para outras culturas e coco (Lima et al. 2013; Rosado et al. 2016b). Esta distinção pode estar

ligada à grande diversidade encontrada entre isolados de *L. theobromae* conforme reportado em outros trabalhos (Crous et al. 2006; Ismail et al. 2012; Marsberg et al. 2017), podendo se concluir que as populações de *L. theobromae* possuem uma grande capacidade patogênica interespecífica a tecidos, e este conceito pode se estender às outras espécies identificadas neste trabalho.

### Conclusões

Este estudo representa o primeiro relato de *F. fabicercianum* e *B. dothidea* além de *L. theobromae* como possíveis agentes causais da queima das folhas do coqueiro e podridão basal em frutos. Além de evidenciar a grande diversidade entre isolados das espécies identificadas em coqueiro no Brasil.

### Referências

- Abdollahzadeh J, Javadi A, Goltapeh EM, et al (2010) Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia Mol Phylogeny Evol Fungi* 25:1–10. doi: 10.3767/003158510X524150
- Al-Sadi AM, Al-Wehaibi AN, Al-Shariqi RM, et al (2013) Population Genetic Analysis Reveals Diversity in *Lasiodiplodia* Species Infecting Date Palm, Citrus, and Mango in Oman and the UAE. *Plant Dis* 97:1363–1369. doi: 10.1094/PDIS-03-13-0245-RE
- Alves a, Crous PW, Correia a, Phillips a JL (2008) Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Divers* 28:1–13.
- Avise JC (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press
- Balloux F, Lugon-Moulin N, Artico R, et al (2002) The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Mol Ecol* 11:155–165. doi:

doi:10.1046/j.0962-1083.2001.01436.x

- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37–48. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036
- Begoude Boyogueno AD, Slippers B, Perez G, et al (2012) High gene flow and outcrossing within populations of two cryptic fungal pathogens on a native and non-native host in Cameroon. *Fungal Biol* 116:343–353. doi: 10.1016/j.funbio.2011.12.001
- Brewer MT, Milgroom MG (2010) Phylogeography and population structure of the grape powdery mildew fungus, *Erysiphe necator*, from diverse *Vitis* species. *BMC Evol Biol* 10:268. doi: 10.1186/1471-2148-10-268
- Burgess T, Wingfield MJ (2002) Quarantine is important in restricting the spread of exotic seed-borne tree pathogens in the southern hemisphere. *Int For Rev* 4:56–65.
- Burgess TI, Barber P a, Mohali S, et al (2006) Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia* 98:423–435. doi: 10.3852/mycologia.98.3.423
- Castresana J (2000) Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis. *Mol Biol Evol* 17:540–552. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334
- Correia MS, Costa JLS (2005) Dispersão anemófila do fungo *Lasiodiplodia theobromae* em plantações de coqueiro. *Fitopatol Bras* 30:150–154. doi: 10.1590/S0100-41582005000200008
- Coutinho IBL, Freire FCO, Lima CS, et al (2016) Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. *Plant Pathol*. doi: 10.1111/ppa.12565
- Crous PW, Slippers B, Wingfield MJ, et al (2006) Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Stud Mycol* 55:235–253. doi: 10.3114/sim.55.1.235
- Dias MD, Pozza EA, Abreu MS de, Miranda EO (2005) Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de *Coffea arabica* L. *Ciência e Agrotecnologia* 29:545–552. doi: 10.1590/S1413-70542005000300006

- Edgar RC (2004) MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32:1792–1797. doi: 10.1093/nar/gkh340
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1:47–50. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x
- Farr, D F; Rossman A (2015) Systematic Mycology and Microbiology Laboratory Fungus-Host Distributions Database. <http://nt.ars-grin.gov/fungalDATABASES/>. Accessed 21 Sep 2016
- Ferreira EB, Cavalcanti PP, Nogueira DA (2014) ExpDes: An R Package for ANOVA and Experimental Designs. *Appl Math* 5:2952–2958.
- Fontes HR, Wanderley M (2006) Situação Atual e Perspectivas para a Cultura do Coqueiro no Brasil.
- Fournier E, Giraud T (2008) Sympatric genetic differentiation of a generalist pathogenic fungus, *Botrytis cinerea*, on two different host plants, grapevine and bramble. *J Evol Biol* 21:122–132. doi: 10.1111/j.1420-9101.2007.01462.x
- Freire M, Oliveira L (2008) Evolutionary history of *Phakopsora pachyrhizi* (the Asian soybean rust) in Brazil based on nucleotide sequences of the internal transcribed spacer region of. ... *Mol Biol* 931:920–931. doi: 10.1590/s1415-47572008005000026
- Freire MGM, Souza CLM, Portal TP, et al (2013) Effect of Castor Bean Oil on Post Harvest Fungal Pathogen of Coconut: *Lasiodiplodia theobromae*. *J Plant Physiol Pathol* 1:1–7. doi: 10.4172/2329-955X.1000108
- Griffon, E.; Maublanc A (1909) Sur une maladie du cacaoyer. *Bull la Société Mycol Fr* 25:51–58.
- Hartl DL, Grant A (2007) *Principles of Population Genetics*. 4th Edition.
- Hepperle D (2011) DNA Dragon 1.4.1 - DNA Sequence Contig Assembler Software.
- Ismail AM, Cirvilleri G, Polizzi G, et al (2012) *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica*) in Egypt. *Australas Plant Pathol* 41:649–660. doi: 10.1007/s13313-012-0163-1
- Jacobs K, Bergdahl DR, Wingfield MJ, et al (2004) *Leptographium wingfieldii* introduced

- into North America and found associated with exotic *Tomicus piniperda* and native bark beetles. *Mycol Res* 108:411–418. doi: 10.1017/S0953756204009748
- Jami F, Slippers B, Wingfield MJ, et al (2015) Temporal and spatial variation of Botryosphaeriaceae associated with *Acacia karroo* in South Africa. *Fungal Ecol* 15:51–62. doi: 10.1016/j.funeco.2015.03.001
- Jorge VR, Silva MR, Guillin EA, et al (2015) The origin and genetic diversity of the causal agent of Asian soybean rust, *Phakopsora pachyrhizi*, in South America. *Plant Pathol* 64:729–737. doi: 10.1111/ppa.12300
- Kasuga T, White TJ, Koenig G, et al (2003) Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Mol Ecol* 12:3383–3401. doi: 10.1046/j.1365-294X.2003.01995.x
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451–1452. doi: 10.1093/bioinformatics/btp187
- Lima JS, Moreira RC, Cardoso JE, et al (2013) Caracterização cultural, morfológica e patogênica de *Lasiodiplodia theobromae* associado a frutíferas tropicais. *Summa Phytopathol* 39:81–88. doi: 10.1590/S0100-54052013000200001
- Lins SR de O, Alves E, de Oliveira SMA (2010) Estudos Da Interação *Lasiodiplodia theobromae* X Mangueira E Caracterização Morfológica De Isolados Do Patógeno. *Acta Microsc* 19:221–231.
- Machado AR, Pinho DB, Pereira OL (2014) 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 Divers* 67:231–247. doi: 10.1007/s13225-013-0274-1
- Marques MW, Lima NB, De Moraes MA, et al (2013) Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. *Fungal Divers* 61:181–193. doi: 10.1007/s13225-013-0231-z
- Marsberg A, Kemler M, Jami F, et al (2017) *Botryosphaeria dothidea* : a latent pathogen of

- global importance to woody plant health. *Mol Plant Pathol* 18:477–488. doi: 10.1111/mpp.12495
- Mohali S, Burgess TI, Wingfield MJ (2005) Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. *For Pathol* 35:385–396. doi: 10.1111/j.1439-0329.2005.00418.x
- Monteiro CM, Caron ES, da Silveira SF, et al (2013) Control of foliar diseases by the axillary application of systemic fungicides in Brazilian coconut palms. *Crop Prot* 52:78–83. doi: 10.1016/j.cropro.2013.05.013
- Muniz CR, da Silva GF, Souza Jr MT, et al (2014) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Lasiodiplodia theobromae*, the causal agent of gummosis in cashew nut plants. *Genet Mol Res* 13:2906–2913. doi: 10.4238/2014.February.21.8
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*.
- Nei M, Li W-H (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:5269–5273. doi: 10.1073/pnas.76.10.5269
- Netto MSB, Assunção IP, Lima GSA, et al (2014a) Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. *Fungal Divers* 67:127–141. doi: 10.1007/s13225-014-0279-4
- Netto MSB, Assunção IP, Lima GSA, et al (2014b) Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. *Fungal Divers* 67:127–141. doi: 10.1007/s13225-014-0279-4
- Patouillard, N.T.; Lagerheim G de. (1892) Champignons de l'Equateur (*Pugillus* II). *Bull la Société Mycol Fr* 8:113–140.
- Perera L, Russell JR, Provan J, Powell W (2000) Use of microsatellite DNA markers to investigate the level of genetic diversity and population genetic structure of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Genome* 43:15–21.
- Perneel M, Tambong JT, Adiobo A, et al (2006) Intraspecific variability of *Pythium myriotylum* isolated from cocoyam and other host crops. *Mycol Res* 110:583–593. doi: 10.1016/j.mycres.2005.12.002

- Pinho DB, Dutra DC, Pereira OL (2013) Notes on *Ceratocystis paradoxa* causing internal post-harvest rot disease on immature coconut in Brazil. *Trop Plant Pathol* 38:152–157. doi: 10.1590/S1982-56762013000200010
- Pinho DB, Pereira OL, Soares DJ (2014) First report of *Gilbertella persicaria* as the cause of soft rot of fruit of *Syzygium cumini*. *Australas Plant Dis Notes*. doi: 10.1007/s13314-014-0143-0
- Posada D, Buckley TR (2004) Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of akaike information criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Syst Biol* 53:793–808. doi: 10.1080/10635150490522304
- Punithalingam E (1980) Plant diseases attributed to *Botryodiplodia theobromae* Pat. *Bibl Mycol* 71:1–123.
- R Development Core Team (2015) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Found. Stat. Comput. Vienna Austria 0:{ISBN} 3-900051-07-0.
- Rambaut A (2009) FigTree, a graphical viewer of phylogenetic trees.
- Rambaut A, Drummond AJ (2013) Tracer v1.6. Available from <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>
- Rannala B, Yang Z (1996) Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *J Mol Evol* 43:304–311. doi: 10.1007/BF02338839
- Ribeiro, F.E. Soares, A.R. Ramalho MAP (1999) Divergência genética entre populações de coqueiro-gigante-do-brasil 1. 34:1615–1622.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572–1574. doi: 10.1093/bioinformatics/btg180
- Rosado AWC, Machado AR, Freire F das CO, Pereira OL (2016a) Phylogeny, Identification, and Pathogenicity of *Lasiodiplodia* Associated with Postharvest Stem-End Rot of Coconut in Brazil. *Plant Dis* 100:561–568. doi: 10.1094/PDIS-03-15-0242-RE
- Rosado AWC, Machado AR, Freire F das CO, Pereira OL (2016b) Phylogeny, Identification, and Pathogenicity of *Lasiodiplodia* Associated with Postharvest Stem-End Rot of Coconut in Brazil. *Plant Dis* 561–568. doi: 10.1094/PDIS-03-15-0242-RE

- Santos PHAD (2016) MELHORAMENTO GENÉTICO DO COQUEIRO (*Cocos nucifera* L.): CAPACIDADE COMBINATÓRIA E DIVERSIDADE GENÉTICA VIA RAD-SEQUENCING. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
- Souza Filho BF de, Santos HP, Robbs CF (1979) Etiologia da queima das folhas do coqueiro. *Fitopatol Bras* 4:5–10.
- Subileau C, Renard J-L, Lacoste L (1994) *Botryosphaeria cocogena* nov. sp. agent causal du dessecement foliaire du cocotier au Brésil. *Mycotaxon* 41:5–14.
- Summerell BA, Laurence MH, Liew ECY, Leslie JF (2010) Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. *Fungal Divers* 44:3–13. doi: 10.1007/s13225-010-0060-2
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
- Templeton AR (1998) Nested clade analyses of phylogeographic data: Testing hypotheses about gene flow and population history. *Mol Ecol* 7:381–397. doi: 10.1046/j.1365-294x.1998.00308.x
- Templeton AR, Crandall KA, Sing CF (1992) Cladistic Analysis of Phenotypic Associations With Haplotypes Inferred From Restriction Endonuclease Mapping and DNA Sequence Data. 111. Cladogram Estimation. *Genetics* 132:619–633.
- van der Linde JA, Six DL, Wingfield MJ, Roux J (2011) *Lasiodiplodia* species associated with dying *Euphorbia ingens* in South Africa. *South For* 73:165–173. doi: Doi 10.2989/20702620.2011.639499
- Viana FMP, Freire FCO, Barguil BM, et al (2002) Post-harvest basal rot of coconut fruits in the State of Ceara, Brazil. - Podridao basal pos-colheita do coco verde no Estado do Ceara. *Fitopatol Bras* 5.
- Vicente Mussi-Dias, Adão Valmir dos Santos M das GMF (2016) PYCNIDIA AND CONIDIA QUANTIFICATION OF LASIODIPLODIA USING A CULTURE MEDIUM ENRICHED WITH SUGARCANE BAGASSE. *J Agric Res* 2:1–16.
- WANG Y, TAN ZM, ZHANG DC, et al (2006) Phylogenetic and populational study of the *Tuber indicum* complex. *Mycol Res* 110:1034–1045. doi: 10.1016/j.mycres.2006.06.013

#### 4. CONCLUSÕES GERAIS

Este estudo representa o primeiro relato de *F. fabicercianum* e *B. dothidea* além de *L. theobromae* como agentes causais da queima das folhas do coqueiro e podridão basal em frutos. Além de evidenciar a grande diversidade entre isolados das espécies identificadas.

Estes resultados servirão para futuros estudos no manejo da doença e no desenvolvimento de variedades de coqueiro resistentes em programas de melhoramento genético vegetal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfenas, A. C.; Peters, I.; Brune, W.; Passador, G. C. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 242p.,1991
- Almeida, C.C.A. de (2010) Caracterização morfológica de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* provenientes do estado de Alagoas. Universidade Federal de Alagoas, Centro de Ciências Agrárias Rio Largo – Alagoas. 35p.
- Altschul SF, Gish W, Miller W. (1990). Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215:403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Altschul SF, Gish W, Miller W. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res., 25, 3389–3402.
- Alves A, Crous PW, Correia A, Phillips AJL (2008) Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae* Fungal Divers 28:1–13
- Avise, J.C. (2000). Phylogeography : the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge.
- Batugal, P.; Ramanatha Rao, V. & Oliver, J. (2005) Coconut Genetic Resources. International Plant Genetic Resources Institute – Regional Office for Asia, the Pacific and Oceania (IPGRI-APO), Serdang, Selangor DE, Malaysia. Cap. 6 e 9, 762p. 2005.
- Bondar, G. A Cultura do Coqueiro no Brasil. Salvador, BA: Tipografia Naval. Salvador, 1955. 75 p.
- Cabral, T.S. (2011). Molecular phylogeny of gasteroid fungi from phallales and geastrales orders (phallomycetidae). Dissertação de Mestrado Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal 147p.
- Castro, P.C. (2007) Comportamento de cultivares de coqueiro anão (*Cocos nucifera* L.) nos tabuleiros costeiros do norte de Sergipe: [www.pos.ufs.br/agroecossistemas/dissertacoes/2006/DissertacaoCintiaPassosCastro.pdf](http://www.pos.ufs.br/agroecossistemas/dissertacoes/2006/DissertacaoCintiaPassosCastro.pdf) em Abril/ 2014

- Correia MS, Costa JLS (2005) Dispersão anemófila do fungo *Lasiodiplodia theobromae* em plantações de coqueiro. *Fitopatol Bras* 30:150–154. doi: 10.1590/S0100-41582005000200008
- Costa, R.S.C DA; Nascente, A.S.; Ribeiro, G.D.; Ferreira, M.DAS.G.R. (2005). *Cultivo do Coqueiro em Rondônia*. Ed. Téc. NASCENTE, A.S. EMBRAPA Rondônia. Versão Eletrônica: ISSN 1807-1805. Porto Velho, Rondônia.
- Crous, P.W., Slippers, B., Wingfield, M.J., Rheeder, J., Marasas, W.F.O., Phillips, A.J.L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P. and Groenewald, J.Z. (2006). Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology* 55: 235-253.
- Desalle, R.; Giribet, R.; Wheeler, G. (2002) . *Techniques in molecular systematics and evolution*. Basel;Boston: Birkhäuser.
- Doyle, J.J.; Davis, J.I. (2001) Homology in Molecular Phylogenetics: A Parsimony Perspective. In: Soltis, D.E. et al (Ed.). *Molecular systematics of plants*. Boston, Mass.: Kluwer Acad. Publ.
- Ferreira, M.E. & Grattapaglia, D. 1998. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3ª ed., Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220p.
- Frison, E. A.; Putter, C. A. J. & Diekmann, M. (1993) *FAO/IBPGR technical guidelines for the safe movement of coconut germplasm*. Rome: FAO/IBPGR, 48 p.
- Gibas, C.; Jambeck, P. *Desenvolvendo Bioinformática*. P. 293, Campus, Rio de Janeiro, 2001.
- Halfeld-Vieira, B., Nechet, K.L. (2005) Queda de frutos em coqueiro causada por *Lasiodiplodia theobromae* em Roraima. *Fitopatologia Brasileira*, 30: 203.
- Hall, B.G. (2011) *Phylogenetic trees made easy: a how-to manual*. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates.
- Hennig, W. (1966) *Phylogenetic systematics*. Urbana: University of Illinois Press
- Holliday, P. (1980) *Fungus diseases of tropical crops*. Cambridge University Press.
- Huang, S.F.; Hwang, S.Y.; Wang, J.C.; Lin, T.P. (2004). Phylogeography of *Trochodendron aralioides* (Trochodendraceae) in Taiwan and its adjacent areas. *Journal of Biogeography*. v31, p. 1251-1259.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Levantamento sistemático da produção agrícola*. Rio de Janeiro: IBGE, v.29, 83p., 2015.
- Ikin, R. (1997) Pest Risk Analysis – Technical justification of quarantine application to the exchange of coconut germplasm material. p. 12-17. In: 65 M. Diekmann (Ed.). *Proceedings of the ACIAR meeting to discuss viroids and viroid-like sequences in coconut*, 21-23. Kuala Lumpur, Malaysia. IPGRI, Rome, Italy.
- Ismail A. M & G.; Cirvilleri Polizzi G.; Crous P. W.; Groenewald J. Z.; Lombard L. *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica*) in Egypt *Australasian Plant Pathol.* (2012) 41:649–660
- Leuchtmann, A. 1994. Isozyme relationships of *Acremonium endophytes* from twelve Festucaspp.. *Mycological Research*, Cambridge, v.98, nº 1, p.25-33.
- Leuchtmann, A.; Petrini, O.; Petrini, L.E. & Carroll, G.C. 1992. Isozyme polymorphism in six endophytic *Phyllosticta* sp. *Mycological Research*, v.96, p.287-95.
- Magnani, M.; Fernandes, T.; Prete, C. E. C.; Homechim, M.; Ono, E. Y. S.; Vilas-Boas, L. A.; Sartori D.; Furlaneto, M. C.; Fungaro, M. H. P. *Molecular*

- identification of *Aspergillus* spp. isolated from coffee beans. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 62, n. 1, p. 45-49, 2005.
- Mariano, R. L. R. & Silveira, E. B. (2005) Doenças do coqueiro (*Cocos nucifera* L.). In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L. E. A.; Rezende, J. A. M. (Eds.) Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p.271-281.
- Mariau, D. (Ed.) (1999) Les maladies des cultures pérennes tropicales. CIRAD, collection Repères. 287p.
- Menezes, M., Muniz, M.F.S., Queiroz, F.M. (1997) Podridão da haste do mamoeiro "sunrisesolo" causada por *Botryodiplodia theobromae* no estado de Alagoas. *Summa Phytopathologica*, v.23, p.44-45.
- Metzenberg, R.L. 1991. Benefactor's lecture: the impact of molecular biology on mycology. *Mycological Research*, v.95, p.9-13.
- Miyaki, C.Y.; Russo, C.A.M.; Pereira, S. L. Reconstrução filogenética. Introdução e o método da máxima parcimônia. In: Matioli, S.R. *Biologia molecular e evolução*. Ribeirão Preto, 2001. p. 97-107.
- Mount, D. W. (2004). *Bioinformatics, Sequence and Genome Analysis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Nei, M.; Kumar, S. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press: New York, 2000. 333 p.
- Nozaki, M. H. Camargo, M., Lemos, E. G. M.; Aukar, A. P. A.; Barreto, M. Caracterização molecular através da técnica FAFLP de isolados de *Diaporthe citri*. *Summa Phytopathologica*, v.32, p. 147-150, 2006.
- Page, R.D.M.; Holmes, E.C. (1998) *Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach*. Blackwell Science, Oxford, U.K.
- Paulin-Mahady, A.E.; Harrington, T.C. & Mcnew, D. 2002. Phylogenetic and taxonomic evaluation of *Chalara*, *Chalaropsis*, and *Thielaviopsis anamorphs* associated with *Ceratocystis*. *Mycologia*, v.94, nº 1, p.62-72.
- Pereira, A.L., Silva, G.S., Ribeiro, V.Q. (2006) Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 31(6).
- Pinho DB, Firmino AL, Ferreira Junior WG, Pereira OL (2012) An efficient protocol for DNA extraction from Meliolales and the description of *Meliola centellae* sp. nov. *Mycotaxon* 122:333-345
- Pinho, D. B.; Pereira, O. L.; Soares, D. J.. First report of *Gilbertella persicaria* as the cause of soft rot of fruit of *Syzygium cumini*. *Australasian Plant Disease Notes*, v. 9, p. 143, 2014.
- Punithalingam E (1980) Plant diseases attributed to *Botryodiplodia theobromae* Pat. *Bibl Mycol* 71:1-123.
- Puterka, G.J.; Black, W.C.; Steiner, W.M. & Burton, R.L. 1993. Genetic variation and phylogenetic relationships among worldwide collections of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Morkvilko), inferred from allozyme and RAPD-PCR markers. *Heredity*, London, v.70, p.604-18
- Ram, C. (1994) Dosagens e intervalos de aplicação da mistura de fungicidas no controle da queima-das-folhas (*Lasiodiplodia theobromae*) do coqueiro. *Fitopatologia Brasileira*, 19: 238-240p.
- Rannala, B.; Yang, Z. (1996) Probability distribution of molecular evolutionary trees: A new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution*. v. 43, p.304-311.
- Ridley, M. (2004) *Evolução (3ª Edição)*. Artmed, Porto Alegre.

- Rodrigues A.L.; Danilo B. Pinho, Daniela O. Lisboa, Robson J. Nascimento, Olinto L. Pereira, Acelino C. Alfenas & Gleiber Q. Furtado *Colletotrichum theobromicola* causes defoliation, stem girdling and death of mini-cuttings of eucalyptus in Brazil Tropical Plant Pathology 39 (4) 326 – 330 2014
- Rodrigues, R. (2003) Caracterização morfológica e patológica de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon e Maubl. agente causal das podridões de tronco e raízes da videira. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas. Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 53 p.
- Rosado, A. W. C.; Machado, A. R.; Freire, F. C. O.; Pereira, O.L. Phylogeny, identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia* associated with postharvest stem-end rot of coconut in Brazil. Plant Disease, p. 150803104216002, 2015.
- Russo, C.A. M. (2001) Como Escolher Genes para Problemas Filogenéticos Específicos. In: MATIOLI, S.R. (ed.) Biologia Molecular e Evolução. Ribeirão Preto: Holos, p. 130-136.
- Salemi, M.; Vandamme, A.M. (2003) The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 406 pp. ISBN 0-521-80390-X.
- Sanger F, Coulson AR (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. J Mol Biol 94:441–8.
- Schneider, H. Métodos de Análise Filogenética: Um Guia Prático. 2. ed. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2007.
- Schuler GD (2001) Sequence alignment and database searching. Methods Biochem Anal 43:187–214.
- Silva, R. F. (2008). Análise computacional da origem do subtipo C do HIV-1 na Américado Sul. Dissertação de Mestrado, Laboratório Nacional de Computação Científica, Petrópolis, 87p.
- Silva M. A., Lisboa D. O., Pinho D. B., Pereira O. L.; Furtado G. Q (2015). First Report of Gray Mold Caused by *Botrytis cinerea* on *Joannesia princeps* in a forest nursery in Brazil
- Siqueira, L. A.; Aragão, W. M.; Tupinambá, E. A. A introdução do coqueiro no Brasil, importância histórica e agrônômica. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2002. 24 p. Documentos.
- Souza Filho, B.F. de., Santos Filho, H. P., Robbs, C.F. (1979) Etiologia da queima- das- folhas do coqueiro. Fitopatologia Brasileira, 4: 5-10.
- Subileau C & Lacoste L. (1993) Systématique et biologie du complexe parasitaire constitué du *Phyllachora torrendiella* (Bat.) nov. comb. et du *Botryosphaeria cocogena* nov. sp., agents fongiques du dessèchement foliaire du cocotier au Brésil. Tese de Doutorado. Université de Paris, Paris, FRANCE (Université de Soutenance). Anais de Defesas, N° 93, PA06 6645.
- Subileau C, Renard J L & Lacoste L (1994) *Botryosphaeria cocogena* nov. sp. Agente causal du dessèchement foliare du cocotier au Brésil. Mycotaxon, p.5-14.
- Tavares, S.C.C.H.; Amorim, L.R.; Assunção, I.P.; Perez, J.O. e Lima, J.A.S. (1994). *Botryodiplodia theobromae* (Pat.) em mangueira no Vale São Francisco, IV proteção de pomares. Fitopatologia Brasileira, v. 19 (Suplemento) Agosto. 292p.
- Templeton, A.R.; Crandall, K.A.; Sing, C.F. (1992). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease

- mapping and DNA sequence. III. Cladogram estimation. *Genetics*. 132: 619-633.
- Tiago, P. V.; Carneiro Leão, M. P.; Lima, M. L. A.; Oliveira, N. T.; Luna-Alves Lima, E. A. Polymorphism in *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) based on internal transcribed spacer-RFLP, ISSR and intron markers. *Genetics and Molecular Research* v.10, n.3, p. 1565-1575. 2011.
- United Nations Conference On Trade And Development (UNCTAD), 2014. Disponível em: <http://www.unctad.info/en/Infocomm/AACP-Products/COMMODITY-PROFILE---Coconut2/>. Acessado em 22 de setembro de 2017
- Warwick, D.R.N. (1997) Coco (*Cocos nucifera*) controle de doenças In: Vale, F.X.R. do, Zambolin, L.; (Eds.) Controle de doenças de plantas: grandes culturas. Viçosa, MG: UFV; Brasília: Ministério da Agricultura e Abastecimento. Cap.15, p.765-787.
- Warwick, D.R.N.; Leal, E.C. (2003) Principais doenças foliares. In: Ferreira, J.M.S. Coco: Fitossanidade. Embrapa/CPATC, Embrapa Informações tecnológicas, Brasília-DF, 41-50.
- Wingfield BD, Grant WS, Wolfaardt JF, Wingfield MJ (1994) Ribosomal RNA sequence phylogeny is not congruent with ascospore morphology among species in *Ceratocystis* sensu stricto. *Mol Biol Evol* 11:376–83.
- Witthuhn, R.C.; Wingfield, B.D.; Wingfield, M.J. & Wolfaardt, M. 1998. Monophyly of the conifer species in the *Ceratocystis coerulescens* complex based on DNA sequence data. *Mycologia*, v.90, nº 1, p.96-101.
- Zervakis, G.; Sourdís, J. & Balis, C. 1994. Genetic variability and systematics of eleven *Pleurotus* species based on isozyme analysis. *Mycological Research*, Cambridge, v.98, nº 3, p.329-41