



UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CAMPUS DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – PRODUÇÃO VEGETAL

Alan da Cunha Honorato

**Padronização de metodologias de esporulação, inoculação e
reação de acessos à morte descendente da aceroleira**

Petrolina - PE

2016

Alan da Cunha Honorato

**Padronização de metodologias de esporulação, inoculação e
reação de acessos à morte descendente da aceroleira**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal do *Campus* de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Vale do São Francisco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Agronomia – Produção Vegetal.

Orientador: Prof. D.Sc. Alexandre Sandri Capucho
Co-orientador: D.Sc. Flávio de França Souza

Petrolina - PE

2016

H774p Honorato, Alan da Cunha
Padronização de metodologias de esporulação, inoculação e reação de acessos à morte descendente da aceroleira / Alan da Cunha Honorato. – Petrolina, 2016.
84 f. : il. ; 29 cm.

Dissertação (Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, Petrolina-PE, 2016.

Orientador: Prof.D.Sc.Alexandre Sandri Capucho.

Referências.

1. Aceroleira. 2. Fitopatologia. I. Título. II. Universidade Federal do Vale do São Francisco.

CDD 634.973214

UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CAMPUS DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – PRODUÇÃO VEGETAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

Alan da Cunha Honorato

Padronização de metodologias de esporulação, inoculação e reação de acessos à morte descendente da aceroleira

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Produção Vegetal, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Aprovada em: 22 de Julho de 2016.

Banca Examinadora

Alexandre Sandri Capucho
(Alexandre Sandri Capucho, D.Sc., Univasf/CCA).

Flávio de França Souza
(Flávio de França Souza, D.Sc., Embrapa Semiárido/CPATSA).

Alexandre Reis Machado
(Alexandre Reis Machado, D.Sc., UFPE/ Departamento de Micologia).

Jerônimo Constantino Borel
(Jerônimo Constantino Borel, D.Sc., Univasf/CCA).

A Deus,
que me iluminou e contemplou com inúmeras graças, dentre elas o discernimento
para conviver com as adversidades da vida.

Aos meus pais (João Jurema e Cileuza Almeida), a minhas irmãs (Amanda e Camila), a meus avós (Marcos, Estela, Didi, Antônio, Francisca e Josefa), a minha esposa e filho (Jessica Coelho e Gabriel Honorato) pelo incentivo e por serem as principais pessoas que me proporcionaram conquistar mais essa vitória.

Aos meus amigos que me incentivaram e muito me ajudaram. Em especial posso citar: Antônio Elton, Fábio Sanches, Francinete Alves, Aline Passos, Patrícia Cabral, Marília Furtado...

Aos meus tios e primos que também me apoiaram e estiveram presentes nesta caminhada. Em especial Vicente Almeida que se foi nos últimos meses.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as graças alcançadas e pela sua infinita misericórdia para comigo, sem ele com certeza eu não teria chegado até aqui. Nos momentos mais difíceis foi a sua graça que me sustentou e nos momentos em que estive mais afastado e disperso foi sua misericórdia que me trouxe de volta ao caminho correto. Hoje posso e tenho certeza em dizer que “foi o Senhor e meu Deus que me fez escolher e ser muito realizado na vida”.

Também agradeço a toda minha família, em especial a meu pai, minha mãe, minha esposa e a meu filho. Essas pessoas foram e são a principal razão de minha vida, e nelas encontro força e apoio, acredito que esta vitória também é de vocês. Amo todos vocês.

À Universidade Federal do Vale do São Francisco (Univasf), pela formação acadêmica, por todo acolhimento, serviços prestados e estrutura cedida para estudos, pesquisas e demais atividades.

Meu grande agradecimento a toda equipe do grupo FitoMelhor, pelo apoio, dedicação e amizade, em especial aos colegas Antônio Elton e Fábio Sanchez.

Ao Prof. Dr. Alexandre Capucho pelo apoio, dedicação, orientação e conhecimentos transmitidos que muito contribuíram para minha formação profissional.

À Estudante de doutorado da UFV M.Sc. Patrícia Cabral pela dedicação e relevantes contribuições neste trabalho.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (Facepe) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro e disponibilidade de recursos necessários à realização do projeto.

À Embrapa Semiárido, em especial ao Dr. Flávio de França Souza por todo apoio e relevantes contribuições neste trabalho.

Aos professores que compõem o Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, da UNIVASF, pelos ensinamentos transmitidos com seriedade e compromisso, superando as adversidades de se implantar um programa novo.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho, minha eterna gratidão.

RESUMO

A aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.) é um arbusto frutífero cujo cultivo tem se expandido por todo o território brasileiro, principalmente na região Nordeste. A morte descendente causada por fungos da família Botryosphaericeae vem sendo relatada frequentemente nos pomares desta cultura, entretanto, este grupo de fungos ainda é pouco estudado e a padronização de metodologias para as inoculações e avaliação de resistência de acessos de aceroleira plantadas no Brasil, ainda são escassos e precisa de maior atenção. Assim, os objetivos deste trabalho foram ajustar metodologias fitopatológicas, bem como, identificar aceroleiras com resistência à morte descendente, causada por *Lasiodiplodia*. Para a metodologia de esporulação, três experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) no esquema fatorial (5x5), nos quais foram testados cinco substratos (1- acículas de Pinus, 2- palha da espiga do milho, 3- folha de mangueira, 4- ramos de aceroleira e 5- nervuras centrais da folha do milho) e cinco isolados dos gêneros *Lasiodiplodia* e *Botryosphaeria* com três repetições por tratamento. Cada repetição correspondeu a uma placa contendo ágar-água e quatro fragmentos para cada substrato. Foram avaliadas a produção e fertilidade de picnídios. Em sequência, três métodos de inoculação foram avaliados, sendo estes: 1- Furador, 2- corte em Bisel e 3- Desponte. Na execução deste experimento mudas de aceroleira das cultivares Junko e Okinawa foram inoculadas com um isolado de *Lasiodiplodia*. Este experimento foi montado em DIC em esquema fatorial com seis tratamentos de inoculação (três métodos de inoculação e suas testemunhas) e duas cultivares, sendo usados quatro repetições por tratamento. Para a avaliação dos métodos foi mensurado a área da lesão 30 dias após as inoculações. Em um segundo momento, três isolados de *Lasiodiplodia* foram avaliados quanto à agressividade e o mais agressivo foi utilizado para a determinação do nível de resistência dos acessos de aceroleira. Para isso, um experimento em DIC foi conduzido, contendo três tratamentos (isolados) e dez repetições (mudas da cultivar Junko). Na avaliação da resistência das aceroleiras, dois experimentos em DBC foram conduzidos, nos quais foram testados 34 acessos do BAG da Embrapa Semiárido. Cada acesso inoculado foi considerada um tratamento, sendo considerado como repetição uma planta clone de cada tratamento, no total foram usadas quatro repetições. Após 30 dias da inoculação do fungo, o comprimento das lesões foi mensurado. Os substratos com os melhores desempenhos, para induzir a esporulação dos isolados foram Folha de mangueira e Ramos de aceroleira, juntamente com as acículas de Pinus, sendo uma alternativa para induzir a esporulação deste fungo *in vitro*. Dentre os métodos de inoculação, o método do Furador foi o mais indicado para inoculação por ser de grande rapidez, simples execução e permitir a separação entre cultivares à resistência a morte descendente. O isolado de *L. iraniensis* foi o mais agressivo, causando a morte de 90% das mudas da cultivar Junko. Identificou-se também variabilidade genética entre clones de aceroleira quanto à reação a *Lasiodiplodia*, sendo possível identificar doze acessos de aceroleira moderadamente resistente à morte descendente, o que poderá permitir o desenvolvimento de materiais resistentes à morte descendente causada por *Lasiodiplodia* spp..

Palavras-chave: *Malpighia emarginata* DC., resistência genética, métodos fitopatológicos, esporulação

ABSTRACT

The acerola (*Malpighia emarginata* D. C.) is fruit-bearing shrub whose cultivation has expanded throughout the Brazilian territory, especially in the Northeast region. The branches dieback caused by Botryosphaericeae fungal family has been frequently reported in acerola fields, however, this fungi group has not been studied in deep and the methodologies for inoculation are not standardized yet and resistance evaluation of acerola cultivars planted in Brazil are still scarce. The aim of this study were to develop Phytopathological methodologies and identify acerola plants with resistance to dieback, caused by *Lasiodiplodia*. For the sporulation methodology, three experiments were conducted in 5x5 full factorial design, five media cultures were tested (needles of pine, corn cob straw, mango leaf, acerola branches and central ribbing the corn leaf) and five isolates of *Lasiodiplodia* and *Bothosphaeria* genus with three repetitions per treatment. Each repetition refers to a water-agar plate containing four fragments of each media. Production and pycnidia fertility were evaluated. Furthermore, three inoculation methods were evaluated: the awl, the cut in chisel and pruning. For this experiment each acerola plant of Junko and Okinawa cultivars were inoculated with an isolate of *Lasiodiplodia*. the experiment was in a full factorial design with six inoculations treatments (three methods of inoculation and their witnesses) and two cultivars and four replicates per treatment. to evaluate the methods, infected area was measured 30 days after inoculation. Later, three isolates of *Lasiodiplodia* were evaluated for aggressiveness and the most aggressive was used to determine the collection resistance level. For this, the experiment was completely randomized designed, with three treatments (isolated) and ten repetitions with the collection. To determine acerola's resistance, two experiments was conducted in a completely randomized blocks design with 34 collection from Embrapa semiarid germoplasm bank were tested. Each collection inoculated was considered a treatment, and each clone was considered one repetition, totalizing 4 repetitions for each collection 30 days after fungal inoculation, the length of lesions was measured. The results demonstrated that media with mango leaf and branches of acerola had the best performance, and needles of Pinus to induce fungal sporulation, thus an alternative to induce fungal sporulation *in vitro*. between the inoculation methods, the awl method was the most suitable for inoculation due to be faster, easy to do and permit separate cultivars. The *L. iraniensis* isolated was the most aggressive, causing the death of 90% plants of cultivar Junko. It was also identified genetic variability in acerola clones due to *Lasiodiplodia* resistance, Also this study permitted identify twelve collection of acerola with moderate resistance to branches dieback, of which only the BRS Cabocla and Flor Branca are grown on a larger scale, which it could support the development of branches dieback resistant materials caused by *Lasiodiplodia* spp..

Key-words: *Malpighia emarginata*, tough, phytopathological methods, sporulation, aggression

Sumário

1. INTRODUÇÃO	10
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
2.1. A aceroleira e seu cultivo no Brasil	13
2.2. Bioecologia de fungos Botryosphaeriaceae	17
2.3. Sintomatologia e epidemiologia da morte descendente em frutíferas cultivadas	21
2.4. Controle da morte descendente em aceroleira	24
2.4.1. Controle cultural	25
2.4.2. Controle químico	26
2.4.3. Controle biológico	27
2.4.4. Controle genético	27
3. Referências Bibliográficas.....	28
4. Capítulo 1 - Esporulação de fungos pertencentes à família Botryosphaeriaceae sob diferentes substratos	36
4.1. Resumo	36
4.2. Introdução	37
4.3. Material e métodos	39
4.3.1. Obtenção de Isolados.....	39
4.3.2. Seleção preliminar de substratos	40
4.3.3. Esporulação em diferentes substratos	41
4.4. Resultados	42
4.5. Discussão	44
4.6. Referências.....	47
5. Capítulo 2 - Padronização de metodologias de inoculação e reação de acessos à morte descendente da aceroleira	56
5.1. Resumo	56
5.2. Introdução	57
5.3. Material e métodos	59
5.3.1. Isolados.....	59
5.3.2. Velocidade de crescimento micelial e agressividade de <i>Lasiodiplodia</i> spp.	59
5.3.3. Métodos de inoculação	61
5.3.4. Experimento de resistência dos acessos	63
5.4. Resultados	65
5.5. Discussão	68
5.6. Referências.....	72
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
7. APÊNDICES	81

1. INTRODUÇÃO

A aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.) também conhecida como cereja-das-antilhas é um arbusto frutífero, originária da América Tropical, cujo cultivo tem se expandido por todo o Brasil, com destaque para a região Nordeste (RITZINGER et al., 2003). Esta expansão da área cultivada com aceroleira está relacionada, principalmente, por suas qualidades nutricionais com destaque para o alto percentual de vitamina C, facilidades de cultivo e adaptação edafoclimática (RITZINGER; RITZINGER, 2011). Porém, um dos fatores limitantes da produção tem sido a ocorrência de doenças, dentre elas pode-se destacar a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. e *Colletotrichum dematium* (Pers. ex Fr.)), nematoides (*Meloidogyne* sp.), cercosporiose (*Cercospora* sp.), mancha de *Alternaria* (*Alternaria* sp.), podridão dos frutos (*Rhizopus nigricans* Ehr.) e a podridão seca das hastes (*Lasiodiplodia theobromae* (Pat) Griff. & Maubl. (= *Botryodiplodia theobromae* Pat.)) (RITZINGER et al., 2003).

A podridão seca das hastes da aceroleira, causada por *Lasiodiplodia spp.* vem assumindo um papel importante no cultivo desta cultura, pois vem provocando a morte de plantas, tanto em pomares caseiros como em plantios comerciais, implicando em perdas de produtividade, aumento no custo de produção e redução na vida útil das plantas (Tavares, 2002; Ribeiro, 2005). A doença também é conhecida por morte descendente, devido ao fato dos sintomas iniciarem a partir da extremidade dos ramos, avançando em direção ao caule. Entretanto, em alguns casos, a infecção pode iniciar pelo sistema radicular. O quadro sintomatológico da doença pode evoluir para a morte descendente dos ramos e, meses depois, a morte da planta (FREIRE; CARDOSO, 2003).

Para reduzir os danos causados por esta doença, é necessário o uso de medidas de controle que geralmente estão associadas ao método cultural, como a poda de ramos com o sintoma da doença e a proteção da área de corte com pasta cúprica. Entretanto, o melhor método de controle desta doença seria a utilização de variedades resistentes (CARDOSO et al. 2009, 2010).

Em aceroleira a base dos programas de melhoramento tem sido a seleção de genótipos portadores de características de interesse em pomares comerciais, tais como vitamina C, teor de sólidos solúveis, produtividade, porte da planta, porém o melhoramento genético visando à resistência tem sido negligenciado. Para a morte descendente, umas das principais dificuldades para a obtenção de cultivares resistente tem sido: 1) a não associação dos sintomas com a doença; 2) a falta de importância dada anteriormente à doença; 3) falta de estudos sobre a resistência dos cultivares plantados no Brasil; 4) falta de padronização de metodologias de estudos com o patossistema; 5) demora no surgimento dos primeiros sintomas da doença; 6) dificuldade de esporulação dos fungos causadores da doença.

O fungo *L. theobromae* (Botryosphaeriaceae), principal agente relatado causando a morte descendente, pode ser encontrado em todas as áreas geográficas e climáticas do mundo, com a exceção das regiões polares (PHILLIPS et al., 2013). Este fitopatógeno é polífago possuindo mais de 990 espécies hospedeiras (FARR; ROSSMAN, 2016) e vem sendo apontado como agente causal de danos em muitas frutíferas com importância econômica, como a aceroleira (LIMA et al., 2012; FREIRE et al., 2004), videira (BATISTA et al., 2010; CORREIA et al., 2012; 2016), abacateiro, citros (FREIRE et al., 2004), goiabeira (FREIRE et al., 2004; JÚNIOR et al., 2016), coqueiro (FREIRE et al., 2004; ROSADO et al., 2016), mangueira (SHAHBAZ et al., 2009; COSTA et al., 2010; BATISTA et al., 2012; MARQUES et al., 2013), cajueiro (CARDOSO et al., 2009; FREIRE et al., 2004), gravioleira (LIMA et al., 2013; FREIRE et al., 2004).

Estudos recentes evidenciaram um aumento na incidência de doença atribuídas a Botryosphaeriaceae, sendo possível observar diversos relatos em vários países, dentre estes podemos citar as regiões semiáridas do Brasil (CORREIA et al. 2016), África do Sul (TRAKUNYINGCHAROEN et al. 2014), Egito (ISMAIL et al. 2012), Irã (ABDOLLAHZADEH et al 2010, 2013; PHILLIPS et al 2013), Chile (VALENCIA et al. 2015). Apesar da importância fitopatogênica desse grupo de fungos, ainda existe uma carência de estudos sobre esse grupo de fungos, notadamente sobre métodos fitopatológicos como

esporulação e interação patógeno-hospedeiro (SAHA et al., 2008; JÚNIOR et al., 2016).

Dessa forma, estudos visando elucidar os aspectos biológicos destes patógenos, tais como aprimorar as metodologias de esporulação e inoculação e avaliação de resistência dos hospedeiros a esse grupo de fungos, certamente serão cruciais para o aprofundamento de estudos com estes fitopatógenos e conseqüentemente para determinação de estratégias de controle eficientes para essa doença.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. A aceroleira e seu cultivo no Brasil

A fruticultura é uma atividade que vem crescendo em todo o Brasil, o que fez com que o país alcançasse o patamar de um dos maiores produtores e exportadores de frutas do mundo (MARQUES et al., 2013), com cerca de 700 mil toneladas de frutas frescas exportadas em 2012 (IBRAF, 2015). Um dos principais pólos de produção de frutas frescas para exportação encontra-se na região do submédio do vale do Rio São Francisco, notadamente na microrregião de Petrolina-Juazeiro com mais de 120.000 ha irrigados (CODEVASF, 2015).

As principais culturas frutíferas cultivadas no país são: mangueira, macieira, videira, coqueiro, goiabeira, aceroleira, bananeira, maracujazeiro, mamoeiro, citros, abacaxizeiro entre outras frutíferas de menor expressão, perfazendo um volume de mais de 42 milhões de toneladas de frutas por ano (IBGE, 2015). O sucesso da fruticultura em algumas regiões do Brasil está associado a facilidade de escoamento da produção e boas condições edafoclimáticas para o desenvolvimento das culturas, além das pesquisas desenvolvidas na área de manejo cultural, irrigação, nutrição mineral, programas de melhoramento genético e biotecnologia.

O cultivo da aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.) tem ganhado espaço no cenário nacional, o que levou o Brasil a alcançar o posto de maior produtor, consumidor e exportador desta fruta a nível mundial (DE ASSIS et al., 2008). A área cultivada no país é estimada em cerca de 10.000 ha, existindo plantios comerciais em praticamente todos os Estados brasileiros, contudo, é na região nordeste, onde a aceroleira melhor se adaptou, contemplando a maior área plantada, assim como, as melhores produtividades (RITZINGER; RITZINGER, 2011; FREITAS et al. 2006).

A aceroleira é uma frutífera nativa das Ilhas do Caribe, América Central e Norte da América do Sul, região tropical da América. Mais recentemente, esta espécie tem sido introduzida em áreas subtropicais de todo o mundo como Ásia e América do Sul (DE ASSIS et al. 2008). No Brasil, esta planta foi

introduzida, oficialmente, em 1955, na região Nordeste, através da Universidade Federal Rural de Pernambuco, com sementes trazidas de Porto Rico, entretanto, esta planta já era cultivada nos quintais das casas principalmente como ornamental (SIMÃO, 1971).

O cultivo de aceroleira passou a ter maior impulso a partir do ano de 1946 depois da descoberta do alto conteúdo de vitamina C dos seus frutos. A partir daí teve início, em Porto Rico, o plantio comercial da aceroleira, expandindo-se para Cuba, Flórida e Hawai (NETO, et al. 1999). No Brasil se iniciou a exploração comercialmente e conseqüentemente a pesquisa com a aceroleira no início da década de 80, devido principalmente à alta demanda gerada pelo produto nos países da Europa, Japão e Estados Unidos pela vitamina C (FURLANETO; NASSER, 2015).

Os destaques nacionais no cultivo de aceroleira são os Estados da Bahia, Ceará, Paraíba e principalmente Pernambuco que juntos detêm cerca de 60% da produção nacional com 15.853 toneladas produzidas anualmente (FURLANETO; NASSER, 2015; IBGE, 2016; RITZINGER et al., 2003). A principal mesorregião produtora de acerola do país é o polo de Fruticultura Irrigada Petrolina-Juazeiro que é responsável pela produção de mais de seis mil toneladas/ano, o que corresponde a mais 25% da produção nacional (IBGE, 2016). Esta considerável produção de acerola está relacionada, principalmente, pela facilidade de cultivo (espécie rústica com poucos tratamentos culturais) e ótima adaptação edafoclimática (RITZINGER; RITZINGER, 2011).

O interesse dos produtores e do mercado consumidor na acerola surgiu em razão da descoberta dos altos teores de vitamina C e compostos benéficos do fruto, como os antioxidantes. A versatilidade e acessibilidade fazem do cultivo de acerola uma alternativa interessante para pequenos e médios fruticultores, além disso, a implantação dos pomares é relativamente simples e de baixo custo (PETINARI; TARSITANO, 2002). Outro fator que também chama bastante atenção dos produtores é o fato da aceroleira produzir até oito safras bem distribuídas ao longo do ano. Este fato pode assegurar uma renda regular para o produtor e absorver mão-de-obra intensiva, ajudando a fixar os trabalhadores nas comunidades do entorno dos perímetros irrigados (RITZINGER; RITZINGER, 2011).

O fruto de acerola tem ganhado grande importância no mercado mundial sendo comercializado in natura, na forma de sucos, geléias, sorvetes e também para a extração do ácido ascórbico (vitamina C) como matéria prima para a indústria farmacêutica, onde o Japão se destaca como o principal comprador (FREITAS et al., 2006). O teor de ácido ascórbico presente na acerola, é de aproximadamente, 800 mg/100g em frutas maduras, 1.600 mg/100g em frutos meio-maduros e 2.700 mg/100g em frutos verdes, chegando a ser, aproximadamente, 100 vezes maior que o valor encontrado na laranja ou 10 vezes maior que o da goiaba, tidas como frutas possuidoras de alto conteúdo de vitamina C (FURLANETO; NASSER, 2015).

A aceroleira é uma planta rústica que pode ser produzido em climas tropicais e subtropicais, sendo esta bem adaptada a temperaturas que girem em torno de 26 ° C e precipitação em torno de 1600 mm por ano (RITZINGER; RITZINGER, 2011; DE SOUZA et al., 2006; DE ASSIS et al., 2008; MOHAMMED; CAMPUS, 2011). Em áreas com pouca chuva, os pomares necessitam de irrigação. A aceroleira não apresenta qualquer demanda específica por tipos de solo, desde que seja bem drenado, podendo ser encontrada sob cultivo em todo o Brasil tanto em solos arenosos como argilosos (DE ASSIS et al., 2008).

A propagação de aceroleira pode ser tanto com o uso de sementes (propagação sexual), como pela estaquia e enxertia (propagação assexual ou vegetativa), sendo, assim, considerada uma planta de propagação bastante simples (ALVES et al., 2007; MOHAMMED; CAMPUS, 2011). Embora, no Brasil, muitos pomares foram formados a partir de sementes, este método de propagação caiu em desuso por proporcionar grande desuniformidade entre plantas. Por isso sua utilização é recomendável apenas para formação de porta-enxerto e híbridos em programas de melhoramento genético (RITZINGER; RITZINGER, 2011).

Nas últimas décadas, inúmeros cultivares têm sido recomendadas para o plantio no Brasil. Porém, apenas 14 cultivares de aceroleira são registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa). Os cultivares de aceroleira são basicamente “variedades monoclonais”, desenvolvidas a partir da seleção, clonagem e avaliação de plantas individuais. Geralmente,

trata-se de plantas que apresentaram características fenotípicas notáveis em áreas de cultivo comercial ou experimental e, por essa razão, foram coletadas e passaram a ser propagadas vegetativamente em maior escala (SOUZA et al., 2013). No Vale do Rio São Francisco, nos Estados da Bahia, Minas Gerais, Pernambuco e Sergipe destacam-se as variedades Flor branca, Okinawa, Junko e Sertaneja (RITZINGER; RITZINGER, 2011; SOUZA et al., 2013).

Por ser uma planta rústica, a aceroleira necessita de poucos tratamentos culturais, apesar disso, a poda é uma dos tratamentos que merece destaque visto que deve ser feito durante todo o ciclo produtivo da planta (SIMÃO, 1971). Na cultura da aceroleira são feitas podas de formação, de frutificação e de limpeza que, quando bem conduzidas, contribuem para o manejo da cultura, com destaque para a colheita e o controle de pragas e doenças (RITZINGER; RITZINGER, 2011).

Por outro lado, a alteração do agroecossistema, provocada pela expansão desta cultura, tem propiciado condições favoráveis ao surgimento de problemas fitossanitários, destacando-se, dentre estes a ocorrência de doenças. Na cultura da acerola são relatadas diversas doenças aqui no Brasil, dentre elas pode-se destacar a antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum dematium*, nematoides (*Meloidogyne* sp.), cercosporiose (*Cercospora* sp.), mancha de *Alternaria* (*Alternaria* sp.), Mancha-alvo (*Corynespora cassiicola*), fusariose (*Fusarium oxysporum*), fumagina (*Capnodium* sp.), podridão dos frutos e a podridão seca das hastes causadas por *Rhizopus nigricans* e *Lasiodiplodia theobromae*, respectivamente (RITZINGER et al., 2003; MOHAMMED; CAMPUS, 2011). Apesar de um considerável número de patógenos já esteja catalogado para a cultura da acerola no Brasil, nenhum deles foi considerado, até o presente momento, como fator limitante ao sucesso comercial da cultura (FREIRE, 2003).

Por ser uma cultura relativamente recente no Brasil, as informações sobre doenças e a relação hospedeiro-ambiente-patógeno são incipientes, limitando-se tão somente a relatos de sua ocorrência (RITZINGER et al., 2003). Assim, trabalhos que abordam sobre severidade, época de ocorrência e níveis de danos causados pelas principais doenças em aceroleira são pouco

relatados na literatura, provavelmente, em razão da falta de conhecimento em relação à estas doenças nos pomares. Dessa forma, o conhecimento destas doenças, e as táticas de manejo a serem adotadas, são primordiais para que a cultura mantenha sua importância econômica, social e ambiental de forma sustentável.

2.2. Bioecologia de fungos Botryosphaeriaceae

A família Botryosphaeriaceae é um importante grupo de fungos que apresenta uma grande distribuição global, podendo encontrados na fase saprofítica, patogênica ou endofítica em uma ampla gama de hospedeiros, incluindo monocotiledôneas, dicotiledôneas, gimnospermas e angiospermas (CROUS et al., 2006; SLIPPERS; WINGFIELD, 2007; PHILLIPS et al., 2013). Dentro dessa família, os gêneros *Diplodia*, *Botryosphaeria*, *Fusicoccum*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia* e *Sphaeropsis* são os que contêm a maioria das espécies identificadas até o momento (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007).

Entretanto, a identificação de espécies dentro da família é dificultada, devido à sobreposição das descrições dos caracteres morfológicos (SLIPPERS et al., 2014). Dessa forma, a utilização das técnicas moleculares vem sendo uma importante ferramenta para auxiliar na identificação dessas espécies (CROUS et al., 2006). Os estudos taxonômicos atuais utilizam os dados de sequências do DNA e de análises morfológicos conjuntamente para a diferenciação precisa das espécies (SLIPPERS et al., 2014).

Assim, análises filogenéticas utilizando sequências de nucleotídeos da regiões ITS (espaçador interno transcrito), β -tubulina e fator de alongação (EF1- α) têm sido largamente utilizadas para elucidar a taxonomia dessa família, e juntamente com caracteres morfológicos têm-se tornado uma ferramenta poderosa na separação de gêneros e espécies (SLIPPERS et al., 2004, 2007; ÚRBEZ-TORRES et al., 2008; PHILLIPS et al., 2013; NETTO et al., 2014; JÚNIOR et al., 2016).

No Brasil e em outros países, espécies desta família tornam-se problemas cada vez mais importantes, principalmente para os produtores de frutíferas (KHANZADA et al., 2004; JAVIER ALVA et al., 2009;). No país, as

principais espécies de fungos da família Botryosphaeriaceae encontradas são *Lasiodiplodia theobromae*, *L. pseudotheobromae*, *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum* e *N. ribis* infectando principalmente mangueira, coqueiro, mamoeiro, gravioleira, videira e cajueiro, sendo estes também, os fungos mais relatados nas áreas produtoras da região semiárida (COSTA et al., 2010; MARQUES et al., 2013; CORREIA et al., 2013, 2016; MACHADO et al., 2014; NETTO et al., 2014; ROSADO et al., 2016; FARR; ROSSMAN, 2016).

Entre os fungos da família Botryosphaeriaceae, o gênero *Lasiodiplodia* merece um destaque especial, dentre outros fatores por possuir fungos extremamente polífagos, apresentando uma gama de mais de 990 hospedeiros, causando os mais variados sintomas tais como, a morte descendente, podridão radicular, podridões de frutos, morte descendente, manchas foliares, entre outros (FARR; ROSSMAN, 2016). Dentro deste gênero, a espécie *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl é a mais relatada e, conseqüentemente, a que apresenta o maior número de hospedeiros catalogados, 627 até então (FARR; ROSSMAN, 2016).

L. theobromae penetra na planta por meio de aberturas naturais, ferimentos resultantes de injúrias mecânicas e podas, rachaduras na casca do tronco e ramos. O fungo torna-se mais agressivo em plantas sob estresse hídrico e com nutrição desbalanceada (DESPREZ-LOUSTAU et al., 2006; SLIPPERS; WINGFIELD, 2007). Os diferentes tipos de estresse, juntamente com a adicional pressão biológica causada pela expansão geográfica das culturas, são elementos que favorecem o desenvolvimento de doenças, um bom exemplo disso tem sido a ocorrência ascendente de *L. theobromae* (DESPREZ-LOUSTAU et al., 2006). O quadro sintomatológico da doença pode agravar rapidamente e levar a grandes danos nas plantas hospedeiras, caso o agente de estresse for generalizado na área (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007).

O gênero *Lasiodiplodia* se caracteriza por ser um dos mais agressivos dentro da família Botryosphaericeae, tendo um destaque especial a espécie *L. theobromae*. Em um trabalho conduzido por Úrbez-Torres et al. (2008) foi constatado que *L. theobromae* é mais agressiva do que *Diplodia seriata* em hastes de videiras. Costa et al. (2010) também observou que *L. theobromae* causa maiores lesões em frutos de manga quando comparada com

Neofusicoccum parvum e *N. ribis*. Além destes, outros trabalhos mostram a maior agressividade desta espécie em relação às outras em diferentes hospedeiros (ROSADO et al., 2016, CORREIA et al., 2016, ISMAIL, et al. 2012; MARQUES et al., 2013 e NETTO et al., 2014).

Lasiodiplodia theobromae também tem mostrado a capacidade de colonizar o tecido de plantas sem demonstrar os sintomas de infecção, o que caracteriza o comportamento endofítico (MOHALI et al., 2005). As observações da literatura levantam a hipótese de que esse fungo evoluiu da condição de endofitismo clássico para o parasitismo, em consequência de pressões ambientais, especialmente nas regiões semiáridas, onde as condições climáticas, notadamente o estresse hídrico e as altas temperaturas, favorecem a infecção e dispersão de patógenos desse grupo de fungos (TAVARES, 2002; ÚRBEZ-TORREZ et al. 2008; VALENCIA et al., 2015).

Na fruticultura, a proliferação da *L. theobromae* é ainda mais favorecida pelo uso de sistemas de irrigação por microaspersão, a qual aumenta a umidade relativa tornando-a favorável à produção de picnídios e liberação dos esporos que posteriormente, são disseminados principalmente pelo vento e pela chuva (VALENCIA et al., 2015, BATISTA et al., 2010), ausência de práticas culturais como a remoção de restos de material vegetal infestados após a poda (BATISTA et al., 2010) e o manejo inadequado de poda ao utilizar ferramentas infestadas em plantas saudáveis. Estudos recentes puseram em evidência um aumento na incidência de doença nas regiões frutíferas do Brasil atribuídas a estes fungos como se mostra no estudo de Marques et al. (2013), Lima et al. (2013), Netto et al., (2014) e Correia et al., (2013, 2016).

A diversidade de ambientes e hospedeiros no qual esta espécie de fungo é encontrada dificulta os estudos epidemiológicos (PHILLIPS et al., 2013; VALENCIA et al., 2015) e consequentemente a determinação da melhor estratégia de manejo. Por outro lado, os estudos em cultivo *in vitro* tem se iniciado e apesar de serem incipientes têm evoluído nos últimos anos.

Quando cultivado em meio de cultura, as características das colônias de *L. theobromae* são coloração marrom escuro à preto, sendo em alguns casos observado a cor cinza escuro, com abundante micélio imerso e/ou superficial (PEREIRA et al., 2006; PHILLIPS et al. 2013). Os picnídios podem ser

separados ou agregados e confluentes, imersos ou superficiais, globosos, apresentando até 5 mm de largura, marrom escuro, uni ou multilocular, estromáticos, ostiolados, com parede espessa de base truncada e coloração marrom escuro e muitas vezes com hifas superficiais marrom escuro ou hialina sobre a superfície (PHILLIPS et al., 2013). Nos caules e frutos de hospedeiros infestados, os picnídios geralmente são imersos, tornando-se erupcentes quando maduros, com extrusão de conídios e mucilagem com aspecto de uma massa preta (NISHIJIMA et al., 1994).

Os conídios, que variam de sub-ovoides a elipsoides-ovoides, possuem paredes espessas e inicialmente são hialinos e asseptados, permanecendo hialinos até atingir a maturidade com a idade (PHILLIPS et al. 2013). Quando maduros, tornando-se marrom escuro e uniseptados, sendo longitudinalmente estriados. As dimensões dos conídios variam entre (20 – 30 x 10 – 15 µm). As paráfises são hialinas, cilíndricas, ocasionalmente septadas e ramificadas, com extremidades arredondadas, tendo até 55 µm de comprimento e 3-4 µm de largura (PHILLIPS et al. 2013).

Alguns trabalhos têm evidenciado que o crescimento de *L. theobromae* ocorre na faixa de temperatura entre 4 °C e 36 °C, sendo que seu crescimento ótimo ocorre em torno de 28 °C (SAHA et al., 2008). Entretanto, observa-se ainda que temperaturas maiores que 40 °C são consideradas inibitórias ao desenvolvimento deste fungo (ENG et al., 2003; SAHA et al., 2008; BATISTA et al., 2010). De acordo com a literatura, a esporulação deste fungo é favorecida pela presença da luz e fotoperíodo de mais de 12 horas de exposição à luz é recomendado para a formação de picnídios (HALFELD-VIEIRA et al., 2007; SAHA et al., 2008; LATHA et al., 2013).

A formação de picnídios deste patógeno mostrou a mesmas tendências do crescimento do micélio em relação à mudança de temperatura, onde alguns trabalhos observaram a maior formação de picnídios entre 25 e 35°C (KHANZADA et al., 2006; LATHA et al., 2013). Geralmente, alta umidade relativa favorece a formação de picnídios para este fungo onde se observa ainda que sob tais condições, estes produzem e liberam esporos em forma de cirros (BATISTA et al., 2010).

As características das colônias de *L. theobromae* e demais fungos de sua família são bastante variáveis, e dependendo dentre outros fatores da origem do isolado e do meio em que é cultivado, isso implica em variações na coloração da colônia, no crescimento do micélio, patogenicidade, virulência e esporulação (HALFELD-VIEIRA et al., 2007; LIMA et al. 2013; VALENCIA et al., 2015; MACIEL et al., 2015). Além disso, alguns trabalhos têm evidenciado pouca esporulação ou mesmo a não esporulação de *L. theobromae* nos meios de cultura comumente utilizados (SAHA et al., 2008; JÚNIOR et al., 2016).

2.3. Sintomatologia e epidemiologia da morte descendente em frutíferas cultivadas

A morte descendente tem se tornado um sério problema para as regiões agrícolas do Brasil e do mundo, ocasionando diversos danos aos pomares. Em mangueira os primeiros relatos dessa doença, no Brasil, surgiram na década de 90, em pomares de Petrolina- PE e Juazeiro- BA. Essa doença vem se acentuando, principalmente nas áreas irrigadas do Nordeste do Brasil, devido à intensificação de áreas cultivadas, a adubação desequilibrada, ocorrência de pomares abandonados e as condições climáticas favoráveis (TAVARES, 2002).

Os fungos da família Botryosphaeriaceae são relatados como os principais agentes causadores dessa doença, onde se pode destacar *L. theobromae*. Entretanto, na grande maioria dos trabalhos a identificação dessas espécies foi realizada somente através de análises morfológicas, o que em alguns casos não traz precisão aos resultados encontrados uma vez que estudos mais recentes têm evidenciado a necessidade de se usar ferramentas de biologia molecular para identificação de espécies, a partir da qual têm se mostrado a presença de outras espécies causando a morte descendente em diferentes hospedeiros (JÚNIOR, et al 2016).

No Brasil, a morte descendente é observada em frutíferas exóticas cultivadas tais como aceroleira (LIMA et al., 2012; FREIRE et al., 2004), videira (BATISTA et al., 2010; CORREIA et al., 2013; 2016), abacateiro, citros (FREIRE et al., 2004), goiabeira (FREIRE et al., 2004; JÚNIOR et al., 2016),

coqueiro (FREIRE et al., 2004; ROSADO et al., 2016), mangueira (SHAHBAZ et al., 2009; COSTA et al., 2010; BATISTA et al., 2012; MARQUES et al., 2013) e em frutíferas nativas, como o umbuzeiro, cajarana, ateira, cajazeira (LIMA et al., 2013, 2014), cirigueleira, cajueiro (CARDOSO et al., 2009; FREIRE et al., 2004), gravioleira (LIMA et al., 2013; FREIRE et al., 2004) e sapotizeiro (FREIRE et al., 2004).

A morte descendente se inicia, principalmente, em hospedeiro que estão sob algum tipo de estresse, como por exemplo, déficit hídrico, deficiência nutricional, ferimentos causados por insetos, transplântio, competição entre plantas, poda, etc. (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007; CARDOSO et al., 2002, 2009). Geralmente, a penetração do fungo na planta está vinculada a alguma abertura natural, ferimentos resultantes de injúrias mecânicas e podas, rachaduras na casca do tronco e ramos, sendo possível observar que os agentes causais podem infectar a planta em qualquer estágio de desenvolvimento (PEREIRA et al., 2006).

Nos ramos podados e sem proteção, a morte descendente acontece iniciando pelo ferimento, avança de forma progressiva e contínua para o resto da planta. Nos ramos mais grossos e no tronco, a infecção geralmente acontece de fora para dentro do lenho e sob o córtex, onde são observadas lesões escuras, que progredem para o interior do lenho, podendo causar anelamento do órgão afetado (RIBEIRO, 2005). Umezurike (1979) menciona que este fungo ataca a planta de uma forma semelhante a um fungo de podridão mole, utilizando de compostos como amido e outros sacarídeos presentes no substrato inicial da madeira antes da degradação da celulose e hemicelulose, não sendo constatado a degradação da lignina.

Na literatura a sintomatologia do ataque dos fungos causadores da morte descendente pode variar entre hospedeiros, em cajueiro, por exemplo, os primeiros sintomas são: deficiência nutricional, murcha, queda de folhas, podridão dos ramos e a formação de cancrios nos ramos lenhosos e no tronco, geralmente acompanhada de exsudação de goma e escurecimento dos tecidos (FREIRE et al. 2002). Os danos devido à resinose são decorrentes da redução da produção da planta pelo bloqueio do movimento da seiva nos primeiros

estádios de infecção e da produção do pomar pela morte de plantas em virtude da expansão dos cancrios (BEZERRA et al., 2003).

A ocorrência dessa doença em videira se caracteriza por diminuição do vigor e do crescimento vegetativo da planta e um desfolhamento progressivo. As folhas nos ramos afetados adquirem uma coloração amarelada, murcham e caem, deixando a área afetada desfolhada (BATISTA et al., 2010). O ramo atacado adquire uma coloração castanha, com formação de cancro e posterior necrose da madeira, tornando-a ressecado (BATISTA et al., 2010; Úrbez-Torrez, 2011). Já em abacateiro a doença se caracteriza pela necrose e seca do ramo, avançando progressivamente do ápice até o tronco e a raiz, o que resulta também na queda da folhagem, definhamento e morte (FREIRE et al., 2004).

Em goiabeira o ramo afetado apresenta manchas necróticas, de coloração marrom claro, cobrindo toda a epiderme do caule e ramos do hospedeiro. Essas manchas estendem-se no sentido ascendente a partir do ponto de provável infecção do caule da planta. As lesões presentes nos ramos doentes são elípticas, com depressão e rachaduras no córtex, delimitadas pelos tecidos secos da casca e do lenho (JÚNIOR et al., 2016). Em situações de sintomas mais severos, a mancha necrótica assume uma coloração esbranquiçada, permitindo a visualização, a olho nu, de pontos escuros em toda a sua superfície (CARDOSO et al., 2002).

O sintoma mais característico desta doença em gravioleira é uma seca descendente nos ramos mais jovens, provocando o amarelecimento de suas folhas, seguido de seca e, depois, de queda (LIMA et al., 2013). Os ramos afetados mostram-se desnudos, secos e com uma coloração marrom-clara a marrom-escura. Às vezes, as lesões localizam-se no caule da planta, na forma de cancrios secos, deprimidos, de coloração quase negra e com rachaduras características (CARDOSO et al. 2006).

A morte descendente é um dos sintomas típicos e iniciais do ataque de *L. theobromae* em mangueira, logo em seguida o fungo move-se para baixo, envolvendo ramos maiores. Como resultado, é comum se ver queda de folhas seguida por exsudação de goma a partir das porções doentes, e em casos

graves, pode-se observar rachaduras na casca (cancro) (IQBAL et al., 2007; ISMAIL, et al 2012; MARQUES et al., 2013).

Em aceroleira esta doença se inicia a partir da extremidade do ramo, avançando em direção ao caule ou, mais raramente, se inicia a partir do sistema radicular podendo, posteriormente provocar a morte da planta (FREIRE; CARDOSO, 2003).

Dentre as frutíferas aqui relatadas, a aceroleira é a que apresenta a maior deficiência de informação sobre a descrição dessa doença, a maioria dos trabalhos apenas relatam a ocorrência da doença.

2.4. Controle da morte descendente em aceroleira

O controle efetivo das doenças causadas pelo fungo *L. theobromae* torna-se bastante difícil, face às características ecológicas intrínsecas do fungo e a grande variedade de hospedeiros (CARDOSO et al., 2006, 2009; MOHALI et al., 2005; PEREIRA et al., 2006; PICOS-MUÑOZ et al., 2015). Lima et al (2013) reportam a existência de variações morfológicas e culturais entre isolados de *L. theobromae* provenientes de diferentes regiões brasileiras e isso pode ter implicações relevantes sobre a patogenicidade e agressividade do fungo. Dessa forma, existe a necessidade de se ter um aprofundamento da biologia populacional e da interação do patógeno com as plantas hospedeiras para que o estabelecimento de métodos de manejo se torne mais eficiente (CARDOSO et al., 2009; LIMA et al., 2013).

Neste sentido, quando se pensa no controle de *L. theobromae* é imprescindível se fazer o uso de práticas de manejo integrado, que envolvem, por exemplo, o controle genético com variedades resistentes à doença, controle cultural desfavorecendo a ocorrência de condições ambientais favoráveis à ocorrência da doença, controle químico e controle biológico (VIDA et al., 2004; BATISTA et al., 2010). No caso de *L. theobromae* o manejo cultural e genético tem sido apontado como as melhores alternativas para algumas frutíferas hospedeiras desse patógeno (CARDOSO et al., 2009, 2010). Entretanto, apesar da importância desse fungo, ainda são poucos os trabalhos

objetivando encontrar fontes de resistência em acessos das culturas presentes em Bancos Ativos de Germoplasma (BAG's) para este patógeno.

Na cultura da acerola esta realidade é ainda mais preocupante, visto que esta doença ainda não foi estudada com tanta profundidade e não existe na literatura estratégias de manejo descritas para esta doença.

2.4.1. Controle cultural

O controle cultural da morte descendente já é adotado para algumas culturas, por exemplo, videira e a manga, entretanto não existe na literatura estratégias de manejo propostas para aceroleira. Entretanto, a grande maioria destas práticas culturais pode ser adotada para praticamente todas as frutíferas cultivadas no país, muitas delas só precisam ser adequadas e/ou ajustadas para a cultura em questão, o que se deve levar em consideração é o princípio científico e técnico de cada estratégia. Zambolim e Junqueira (2004) e Batista et al. (2010) propõem praticamente as mesmas estratégias de controle cultural para *L. theobromae* em mangueira e videira, respectivamente, e estas estão descritas a seguir: a) Vistorias do pomar para se verificar a presença de manchas e desidratação de ramos e morte dos ramos que não foram eliminados nas podas de limpeza e proteção das partes podadas com fungicidas; b) Na implantação do pomar, utilizar mudas saudáveis, sem qualquer sinal de estresse, lesão ou sinal no local da enxertia; c) Adubar adequadamente o pomar no que se refere a macronutrientes (N P K, Ca, Mg), principalmente Ca e Mg, e a micronutrientes, com ênfase em B e Zn, durante ou após a colheita; d) Evitar submeter as plantas a estresse hídrico ou nutricional prolongado; e) Proceder à vistoria periódica do pomar, principalmente nas épocas de floração e de frutificação; f) Podar e eliminar sistematicamente os ramos, galhos e ponteiros afetados ou secos que possam favorecer a sobrevivência do fungo no pomar; g) Eliminar todas as plantas mortas ou que apresentem a doença em estágio avançado, reduzindo o potencial de inóculo no campo; h) desinfetar com frequência as ferramentas de poda com solução de água sanitária (hipoclorito de sódio 2%); i) Controlar adequadamente os insetos que possam causar nas árvores ferimentos que sirvam de porta de entrada para o fungo.

Cardoso et al. (2009) e Cardoso et al (2006) demonstraram que *L. theobromae* tem a capacidade de sobreviver endofiticamente em ramos de cajueiro e gravioleira e em sementes. Assim, torna-se importante conhecer a origem da semente para a formação das mudas, uma vez que, esta pode ser fonte de inóculo. Vale destacar ainda que este patógeno apresenta um elevado número de hospedeiros fazendo-se necessário uma atenção ainda maior com as plantas adjacentes.

2.4.2. Controle químico

Cabe salientar a inexistência de produtos registrados para combater o referido patógeno na cultura da aceroleira (AGROFIT, 2016), o que representa um agravante para o controle químico desta doença. Tendo em vista a carência de estudos relacionados ao controle químico desta enfermidade em acerola, deve-se iniciar pesquisas com os produtos que hoje já são utilizados em outras culturas como manga, mamão e anonáceas (AGROFIT, 2016), ou mesmo os que mostram bons resultados em pesquisas *in vitro*.

Alguns trabalhos com resultados expressivos do controle de *L. theobromae* com a utilização de alguns fungicidas podem ser observados da literatura, como o de Rodrigues (2003) em videira, utilizando os fungicidas Tebuconazole (triazol), Procimidone (dicarboximida) e Fluazinam (fenilpiridinilamina) e Khanzada et al (2005) em mangueira utilizando Carbendazim e Thiophanate-methyl. O Difenconazole apresentou resultado satisfatório no controle da podridão peduncular em manga segundo Sales Junior (2009) e este ingrediente ativo é o atualmente registrado para esta cultura pelo ministério da agricultura (AGROFIT, 2016). Já em mamoeiro, o único fungicida registrado para o controle da podridão peduncular causada por *L. theobromae* é o tiabendazol, pertencente ao grupo dos Benzimidazóis (AGROFIT, 2016), entretanto, já existem outros princípios ativos considerados promissores para o controle desta doença nessa cultura como Thiophanate-methyl (CAVALCANTE, 2014).

Caron (2012) observou que a aplicação axilar do Cyproconazole utilizado isoladamente ou em misturas pré-fabricadas com Azoxystrobin e/ou Trifloxystrobin, foi eficiente no controle da queima da folha do coqueiro anão-

verde, causado por *L. theobromae*, observando uma redução de até 71,5 % da severidade da doença. Silveira et al. (2010) observaram que mais de 90% das folhas das plantas que receberam tratamento com Cyproconazole, independente da dose de aplicação do produto, quando comparadas ao tratamento controle e demais tratamentos, permaneceram visivelmente sadias e com maior número total de folhas. De acordo com os autores, estes produtos podem ser utilizados em alternância com o Flutriafol, produto registrado para controle deste fungo em coqueiro e anonáceas.

2.4.3. Controle biológico

No que se refere ao controle biológico, as informações são ainda mais incipientes, visto que, de modo geral, entre as culturas atacadas por este fungo, são praticamente inexistentes trabalhos voltados para essa área. A utilização de fungos hiperparasitas como *Septofusidium elegantulum* (Pidopl.) W. Gams e *Acremonium alternatum* Link podem ser uma alternativa bastante promissora para o controle biológico deste patógeno (BATUGAL et al., 2005). Che et al. (2015) contataram que uma linhagem de *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX isolado a partir do solo em Yongtai, Província de Fujian, PR China, têm potencial para reduzir a incidência de mancha negra de frutos da maçã (*Syzygium samarangense* Merr. Et Perry) causada por *Lasiodiplodia theobromae*, fazendo testes in vitro e in vivo. Esse tipo de informação demonstra que o controle biológico tem um potencial muito grande para o controle deste fitopatógeno.

2.4.4. Controle genético

Para Souza et al. (2013) a solução para uma parcela considerável dos problemas da cultura da acerola, principalmente os fitossanitários, depende da continuidade e aprimoramento dos esforços em melhoramento genético, uma vez que esta estratégia é de baixo custo, fácil adoção e não implica em riscos ambientais e sanitários. Entretanto, os programas de melhoramento genético da aceroleira tem se preocupado basicamente em melhorar a produtividade, teor de vitamina C e precocidade das plantas (PAIVA et al., 1999; NETO, 1999).

Em outras culturas, observa-se trabalhos promissores em relação ao controle genético de *L. theobromae*, uma das maiores descobertas foi, sem dúvida, a identificação da variabilidade genética da população de cajueiro quanto à reação à resinose, que culminou com a seleção, lançamento e indicação dos clones BRS-226 (PAIVA et al., 2002) e Embrapa 51 (CARDOSO et al., 2006) resistentes e adaptados às condições de predisposição a essa doença. Recentemente, o clone CP 06, usado como porta-enxerto, contribuiu para a redução da severidade da resinose (CARDOSO et al., 2009). Entretanto, estes são uns dos poucos trabalhos que envolvem a identificação de variedades resistentes a este patógeno aqui no Brasil.

Em aceroleira não existem no Brasil trabalhos de melhoramento com esta vertente, o que se observa na literatura é apenas o trabalho de Lima et al. (2014) que avalia a reação de seis clones de aceroleira a *L. theobromae*. Os autores observaram que existe variabilidade genética entre clones de aceroleira quanto à reação a este patógeno, entretanto poucas foram às variedades avaliadas demandando assim pesquisas mais profundas para se obter resultados mais conclusivos.

3. Referências Bibliográficas

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

ABDOLLAHZADEH, J.; HOSSEINI, F.; JAVADI, A.. New records from Botryosphaeriaceae (Ascomycota) for mycobiota of Iran. **Mycologia Iranica**, v. 1, n. 1, p. 43-51, 2013.

AGROFIT Agrofit: Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em 15 fev. 2016.

ALVES, R. E. et al. Acerola. In: A. E.. JOHNSTON. (Org.). Fertilizing for high yield and quality: Tropical fruits of Brazil. 1ed. Horgen: **International Potash Institute**, 2007, v. 1, p. 13-30.

BATISTA, D. C. et al. Avaliação da resistência de 47 acessos de mangueira aos fungos *Fusicoccum aesculis* e *Neofusicoccum parvum*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.34, n.3, p. 823-831, 2012.

BATISTA, D. C. et al. **Manejo integrado de *Lasiodiplodia theobromae* em videira no Submédio do Vale do São Francisco**. Embrapa Semiárido, Petrolina - PE, 2010, p. 7. (Embrapa Semiárido. Circular Técnica 91).

BATUGAL, P.; RAMANATHA RAO, V.; OLIVER, J. **Coconut Genetic Resources. International Plant Genetic Resources Institute – Regional Office for Asia, the Pacific and Oceania (IPGRI-APO)**. Serdang: Selangor DE, Malaysia. 2005. p. 762.

BEZERRA, M. A. et al. **Efeito da Resinose na Fotossíntese do Cajueiro-Anão Precoce**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2003, p. 5. (Embrapa Agroindústria Tropical. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 8).

CARDOSO, J. E. et al. **Deteção e controle de *Lasiodiplodia theobromae* em sementes de graviola (*Annona muricata* L.)**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006, p.22. (Embrapa Agroindústria Tropical Circular técnica 27)

CARDOSO, J. E. et al. Método de avaliação da resistência de clones de cajueiro à resinose. **Summa Phytopathologica**, v.36, p.295-299, 2010.

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

CARDOSO, J. E.; MAIA, C. B.; PESSOA, M. N. G. Ocorrência de *Pestalotiopsis psidii* e *Lasiodiplodia theobromae* causando podridão no caule da goiabeira no Ceará. **Fitopatologia Brasileira**, V. 27, n.3, p. 320-320, 2002.

CARON, E. S. **Eficiência de fungicidas via aplicação axilar no controle da queima-das-folhas em coqueiro-anão verde**. 2012. 105p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2012.

CAVALCANTE, R. D. et al. Thiophanate-methyl sensitivity and fitness in *Lasiodiplodia theobromae* populations from papaya in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, V. 33, p.1-9, 2014.

CHE, J. et al. Biocontrol of *Lasiodiplodia theobromae*, which causes black spot disease of harvested wax apple fruit, using a strain of *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX. **Crop Protection**, v. 67, p. 178-183, 2015.

CODEVASF - Companhia de Desenvolvimento Dos Vales Do São Francisco e Parnaíba, **Relatório de produção dos perímetros de Irrigação**. 2012. Disponível em: <http://www.codevasf.gov.br/principal/estudos-e-pesquisas/pins/relatorios/news_listing?b_start:int=1440&-C=>>. Acesso em: 28 de Novembro de 2015.

CORREIA, K. C. et al. Fungal trunk pathogens associated with table grape decline in Northeastern Brazil. **Phytopathologia Mediterranea**, v.52, n.2, p.380-387, 2012.

CORREIA, K.C., et al. Phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of table grape in the main Brazilian exporting region. **Plant Pathology**, v. 65, n.1, p. 92-103, 2016.

COSTA, V. S. O. et al. Species of *Botryosphaeriaceae* associated on mango in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.127, n.4, p.509-519, 2010.

COUTINHO, I. B. L. et al. Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. **Plant Pathology**, v. 65, n. 5, p. 856-896, 2016.

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

DE ASSIS, S. A. et al. Acerola: importance, culture conditions, production and biochemical aspects. **Fruits**, v. 63, n. 02, p. 93-101, 2008.

DE SOUZA, M. J. H. et al. Potencial agroclimático para a cultura da acerola no Estado de Minas Gerais. R. Bras. **Eng. Agríc. Ambiental**, v. 10, n. 2, p. 390-396, 2006.

DESPREZ-LOUSTAU, M. L. et al. Interactive effects of drought and pathogens in Forest trees. **Annals of Forest Science**, v.63, p. 597-612, 2006.

ENG, F.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M.; FAVELA-TORRES, E. Efecto de la temperature y el pH en el crecimiento superficial de *Botryodiplodia theobromae* RC1. **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v. 20, p. 172-175, 2003.

FARR, D.F., & ROSSMAN, A.Y. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Em: <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/> acessado em 6 de junho de 2016.

FREIRE, F. C. O. et al. Diseases of cashew (*Anacardium occidentale* L.) in Brazil. **Crop Protection**, London, v. 21, p. 489-494, 2002.

FREIRE, F. C. O. et al. **Novos hospedeiros do fungo *Lasiodiplodia theobromae* no Estado do Ceará**. Embrapa Agroindústria Tropical: Fortaleza, v. 91, p. 6, 2004.

FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E. Doenças da aceroleira. In: FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P. **Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial**. Embrapa Informações Tecnológicas: Brasília, p.59-81, 2003.

FREITAS, C. D. et al. Storage stability of acerola tropical fruit juice obtained by hot fill method. *International journal of food science & technology*, v. 41, n. 10, p. 1216-1221, 2006.

FURLANETO, F. P. B., NASSER, M.D.. Panorama da cultura da acerola no estado de São Paulo. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 12, n.1, p. 1-6, 2015.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K. L.; SOUZA, G. R.. Influência de meios de cultura e regimes de luz na esporulação e crescimento micelial de *Lasiodiplodia theobromae*. Boa Vista: **Centro de Pesquisa Agroflorestal de Roraima/EMBRAPA**, (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento), v.2., 14 p., 2007.

IBGE - **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística** - Condição do produtor. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp?t=2&z=t&o=11&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1>. Acesso em: 10 Jun. 2016.

IBGE - **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 10 set. 2015.

IBRAF - **Instituto Brasileiro de Frutas**. Estatísticas. Disponível em: http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est_frutas.asp. Acesso em: 17 dez. 2015.

IQBAL, Z. et al. Determination of different decline disorders in mango orchards of the Punjab, Pakistan. **Pakistan Journal of Botany**, V.39, p. 1313-1318, 2007.

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

JAVIER-ALVA, J. et al. First report of *Neofusicoccum parvum* associated with dieback of mango trees in Peru. **Plant Disease**, v.93, p. 426, 2009.

JÚNIOR, A. F. N. et al. **Identification of Botryosphaeriaceae species that cause styler-end rot of guavas and characterisation of the disease monocycle**. European Journal of Plant Pathology, v.144, 2ed., p. 271-28, 2016.

KHANZADA, M. A.; LODHI, A. M.; SHAHZAD, S. Pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Fusarium solanion* mango. **Pakistan Journal of Botany**, Pakistan, v. 36, n.1, p. 181-189, 2005.

KHANZADA, M. A.; RAJPUT, A. Q.; SHAHZAD, S. Effect of medium, temperature, light and inorganic fertilizers on in vitro growth and sporulation of *Lasiodiplodia theobromae* isolated from mango. **Pakistan Journal of Botany**, Pakistan, v. 38, n. 3, p. 885-889, 2006.

LATHA, P. et al. Effect of culture media and environmental factors on mycelial growth and pycnidial production of *Lasiodiplodia theobromae* in physic nut (*Jatropha curcas*). **Journal of Environmental Biology**, v. 34, n. 4, p. 683, 2013.

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

LIMA, J. S. et al. Caracterização cultural de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* e patogeni cidade em plantas de aceroleira. **Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 6, n.1, p.10, 2012.

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

MACHADO, A. R., PINHO, D. B., PEREIRA, O. L. . Phylogeny, identification and pathogenicity of the Botryosphaeriaceae associated with collar and root rot of the biofuel plant *Jatropha curcas* in Brazil, with a description of new species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Diversity**, v. 67, n.1, p. 231-247, 2014.

MACIEL, C. G. et al. *Lasiodiplodia theobromae* associated with seeds of *Pinus* spp. originated from the northwest of Rio Grande do Sul, Brazil. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 43, n. 107, p. 639-646, 2015.

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

MOHALI, S.; BURGESS, T. I.; WINGFIELD, M. J. Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. **Forest Pathology**, Berlin, v.35, p.385-396, 2005.

MOHAMMED, M.; CAMPUS, Trinidad. Acerola (*Malpighia emarginata* DC.). **Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits**, v. 3, p. 27-47, 2011.

NETO, L. G. **Melhoramento genético da aceroleira na Embrapa Semiárido. Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro**. Versão 1.0. Petrolina-PE: Embrapa Semi-Árido/Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br>.

NETTO, M. S., et al.. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. *Fungal Diversity*, v. 67, n.1, p. 127-141, 2014.

NISHIJIMA, W. T.; DICKMAN, M. B.; KO, W. H.; OOKA, J. J. Papaya diseases caused by fungi. In: PLOETZ, R. C., ZENTMYER, G. A., NISHIJIMA, W. T., ROHRBACH, K. G.; OHR, H. D. (Eds.). **Compendium of tropical fruit diseases**. St. Paul: APS Press, 1994. p. 58-64.

PAIVA, J. R. et al. **Clone de cajueiro-anão precoce BRS 226 ou Planalto: nova alternativa para o plantio na região Semiárida do Nordeste**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2002. 4 p.

PAIVA, J.R. et al Seleção massal de acerola em plantio comercial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.34, n.3, p.505-511, 1999.

PEREIRA, A. L.; SILVA, G. S.; RIBEIRO, V. Q. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.572-578, 2006.

PETINARI, R. A.; TARSITANO, M. A. A. Análise econômica da produção de acerola para mesa, em Jales-SP: um estudo de caso. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 411-415, 2002.

PHILLIPS, A. J. L. et al. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. **Stud Mycol.** v. 76, p. 51–167, 2013.

PICOS-MUÑOZ, P. A. et al. *Lasiodiplodia theobromae* en Cultivos Agrícolas de México: Taxonomía, Hospedantes, Diversidad y Control. **Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology**, v. 33, n. 1, p. 54-74, 2015.

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

RITZINGER, R.; KOBAYASHI, A.K.; OLIVEIRA, J.R.P. (eds). **A cultura da aceroleira**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003, p.198.

RITZINGER, R.; RITZINGER, C. H. S. P. **Acerola**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 32, n.264. 2011, p. 17-25.

RODRIGUES, R. **Caracterização morfológica e patológica de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. agente causal das podridões de tronco e raízes da videira**. 2003. 53p. Dissertação de Mestrado, Instituto Agronômico de Campinas.

ROSADO, A. W. C. et al. Phylogeny, Identification, and Pathogenicity of *Lasiodiplodia* Associated with Postharvest Stem-End Rot of Coconut in Brazil. **Plant Disease**, V.100, n. 3, p. 561-568, 2016.

SAHA, A. et al. Influence of culture media and environmental factors on mycelial growth and sporulation of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon and Maubl. **Journal of Environmental Biology**, India, v.29. n.3, p.407-410, 2008.

SALES JUNIOR, R. et al. Controle químico da podridão peduncular causada por *Lasiodiplodia theobromae* em mangas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.31, n.3, p.907-910, 2009.

SHAHBAZ, M. et al. Association of *Lasiodiplodia theobromae* with Different decline disorders in mango (*Mangifera Indica* L.). **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, n.1, p. 359-368, 2009.

SILVEIRA, S. F. et al. Aplicação axilar de fungicidas sistêmicos no controle da queima-das-folhas do coqueiro. In: XLIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, **Tropical Plant Pathology**, Cuiabá-MT, v. 35, 2010, p. 81-81.

SIMÃO, S. **Manual de fruticultura**. São Paulo: Agronômica Ceres, p.477-485, 1971.

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

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

SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. **Fungal Biology Reviews**, v.21, n.2, p.90-106, 2007.

SLIPPERS, B. et al. Confronting the constraints of morphological taxonomy in the Botryosphaeriales. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 33, n. 1, p. 155-168, 2014.

SOUZA F. D. F., et al.. Principais variedades de aceroleiras cultivadas no Submédio do Vale do São Francisco. Embrapa Semiárido-Documentos (INFOTECA-E), v. 255, p. 1-21, 2013.

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

TRAKUNYINGCHAROEN, T. et al. Botryosphaeriaceae associated with diseases of mango (*Mangifera indica*). **Australasian Plant Pathology**, v. 43, n. 4, p. 425-438, 2014.

UMEZURIKE, G. M. The cellulolytic enzymes of *Botryodiplodia theobromae* Pat. Separation and characterization of cellulases and β -glucosidases. **Biochemical Journal**, v. 177, n. 1, p. 9-19, 1979.

ÚRBEZ-TORRES, J. R. The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 50, n. 4, p. 5-45, 2011.

VALENCIA, D. et al. Dissemination of Botryosphaeriaceae conidia in vineyards in the semiarid Mediterranean climate of the Valparaíso Region of Chile. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 54, n. 2, p. 394, 2015.

VIDA, J. B. et al. Manejo de doenças de plantas em cultivo protegido. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 355-372, 2004.

ZAMBOLIM, L.; JUNQUEIRA, N. T. V. Manejo Integrado de Doenças da Mangueira. In: ROZANE, D. E.; DAREZZO, R. J.; AGUIAR, R. L.; AGUILERA, G. H. A.; ZAMBOLIM, L. **Manga: produção integrada, industrialização e comercialização**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2004. p. 377-408.

4. Capítulo 1 - Esporulação de fungos pertencentes à família Botryosphaeriaceae sob diferentes substratos¹

4.1. Resumo

Fungos da família Botryosphaeriaceae são conhecidos por apresentar dificuldades de esporulação *in vitro*. Assim, objetivou-se neste trabalho comparar a eficiência de diferentes substratos na produção e fertilidade de picnídios de isolados fúngicos pertencentes à família Botryosphaeriaceae. Para isso, um experimento foi desenvolvido com o delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial (5x5) utilizando cinco substratos para o fator A: acículas de *Pinus* sp.; palha da espiga do milho; folha de mangueira; ramos de aceroleira e nervuras centrais da folha do milho; e cinco isolados fúngicos da família Botryosphaeriaceae para o fator B: *Lasiodiplodia euphorbicola*, *L. hormozganensis*, *L. iraniensis*, *L. viticola* e *Botryosphaeria* sp.. Foram usadas três repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri com ágar-água 2%, contendo quatro fragmentos de cada substrato. Foram avaliados o número e a fertilidade dos picnídios. Todos os substratos permitiram a produção de picnídios das diferentes espécies fúngicas. Os substratos folha de mangueira e ramos de aceroleira se destacaram por induzirem precocemente a formação de picnídios, além de proporcionar as maiores produções e fertilidades de picnídios para a maioria das espécies analisadas. Assim, folhas de manga e ramos de aceroleira são substratos alternativos para esporulação de fungos do gênero *Lasiodiplodia* e *Botryosphaeria*.

¹ Artigo a ser submetido na revista **Tropical Plant Pathology**

Palavras-chave: *Botryosphaeria*; *Lasiodiplodia*; *in vitro*; produção e fertilidade de picnídios.

4.2. Introdução

A família Botryosphaeriaceae engloba uma ampla gama de espécies de fungos que podem ser agentes patogênicos, endofíticos ou saprófitas, principalmente em plantas lenhosas, e encontram-se distribuídos por todas as áreas geográficas do mundo, com a exceção das regiões polares (Phillips et al., 2013). Doenças causadas por estes fungos incluem a morte descendente, podridão radicular, podridões de frutos, morte descendente, manchas foliares, tombamento de plântulas, podridão do colo, cancrios em caules e raízes e gomose (Slippers et al., 2007, Mehl et al., 2011; Correia et al., 2016; Rosado et al., 2016). A infecção e produção de sintomas por patógenos desse grupo de fungos são facilitadas quando os hospedeiros que estão sob algum tipo de estresse, como por exemplo, déficit hídrico, deficiência nutricional, ferimentos causados por insetos, transplante, competição entre plantas, poda, entre outros (Slippers & Wingfield, 2007; Valencia et al., 2015).

A associação frequente de espécies da família Botryosphaeriaceae com doenças de plantas, principalmente em regiões semiáridas produtoras de frutas como o Submédio do São Francisco no Nordeste do Brasil, tem gerado uma grande preocupação devido aos danos que estas estão por acarretar. Nos últimos anos, tem-se observado uma ocorrência frequente em inúmeras culturas de importância econômica como o coqueiro, mamoeiro, mangueira, videira, goiabeira e aceroleira (De Oliveira Costa et al., 2010; Phillips et al., 2013; Marques et al., 2013; Correia et al., 2013, 2016; Cavalcante et al., 2014; Netto et al., 2014). Dentre as principais espécies encontrados no Brasil podem-

se destacar *Lasiodiplodia theobromae*, *L. pseudotheobromae*, *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum* e *N. ribis*, sendo estes relatados principalmente nas áreas produtoras das regiões semiáridas (DE OLIVEIRA COSTA et al., 2010; MARQUES et al., 2013; CORREIA et al., 2013, 2016; MACHADO et al., 2014; NETTO et al., 2014; ROSADO et al., 2016; FARR; ROSSMAN, 2016).

Geralmente espécies de Botryosphaeriaceae podem apresentar bastante variação nas características das colônias que ocorrem em função de fatores como origem do isolado, meio em que é cultivado, temperatura, luminosidade, etc. variações estas que podem implicar sobre a patogenicidade, virulência e esporulação (Halfeld-Vieira et al., 2007; Lima et al. 2013; Valencia et al., 2015; Maciel et al., 2015). Além disso, vários trabalhos têm evidenciado dificuldades de esporulação de espécies desse grupo de fungos em meios de cultura comumente utilizados, o que compromete as análises morfológicas (Saha et al., 2008; Júnior et al., 2016; Zlatkovic´ et al., 2016) e estudos sobre o comportamento do agente patogênico (Kim et al. 2005; Saha et al., 2008).

A metodologia padrão utilizada pelos pesquisadores que trabalham com este grupo de fungos foi descrita por Smith et al. (1996) e adaptado por Slippers et al. (2004) que consiste em repicar as colônias fúngicas em placas de Petri contendo ágar-água (AA) 2% sobreposto com acículas de pinheiro (*Pinus* sp.) duplamente esterilizada e incubada a 25 °C com fotoperíodo de 12h de luz ultravioleta-próximo por 3 a 4 semanas. Entretanto, como as acículas de pinheiro são de difícil acesso e muitas vezes não funciona na indução da esporulação, alguns autores têm utilizado outros substratos para induzir a esporulação desses fungos, como a palha do milho utilizada por Rosado et al. (2016) e Machado et al. (2014), álamos e ramos de azinheira por Linaldeddu et

al. (2015), ramos de *Chamaecyparis lawsoniana* por Zlatkovic' et al. (2016) e folhas de pistache por Chen et al. (2014).

Por outro lado, não existe na literatura trabalhos que comparem a eficiência de diferentes substratos na esporulação de fungos da família Botryosphaeriaceae e isso se faz necessário, uma vez que as acículas de pinus não são de fácil acesso, principalmente nas regiões semiáridas onde esta planta é cultivada. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi comparar a eficiência de cinco substratos quanto à produção e fertilidade de picnídios de isolados fúngicos pertencentes à família Botryosphaeriaceae isolados a partir de ramos de aceroleira no pólo de fruticultura irrigada Juazeiro/Petrolina localizado na região do Submédio do São Francisco no Nordeste do Brasil.

4.3. Material e métodos

Todas as atividades laboratoriais dos experimentos de esporulação foram desenvolvidas no laboratório de Fitopatologia da UNIVASF (Universidade Federal do Vale do São Francisco).

4.3.1. Obtenção de Isolados

Para este trabalho foram selecionados cinco isolados fúngicos (*Lasiodiplodia euphorbicola* (ISO. 19), *L. hormozganensis* (ISO. 35), *Botryosphaeria* sp. (ISO. 41), *L. iraniensis* (ISO. 69) e *L. vitícola* (ISO. 85)), pertencentes a coleção de fungos do grupo de pesquisa Variabilidade de fitopatógenos, melhoramento genético e resistência à doenças no semiárido (FitoMelhor), mantidos no laboratório de fitopatologia da UNIVASF. Esses isolados foram obtidos a partir de ramos de aceroleira apresentando sintoma de seca em pomares de diferentes cultivares em Petrolina-PE (Tabela 1).

A morfologia dos isolados foi estudada por meio da indução da esporulação dos isolados crescendo em acículas de *Pinus* estéreis colocadas em AA 2% e mantidas sob luz UV próximo a 25 °C durante 14 a 30 dias (Smith et al., 1996). Os caracteres morfológicos foram observados por meio da montagem de cortes das estruturas fúngicas em lactofenol, onde foram medidos, pelo menos, 30 conídios e paráfises de cada isolado com auxílio de um microscópio de luz (Nikon E-200). A identificação molecular dos isolados foi realizada em trabalho ainda não publicado pelo grupo FitoMelhor (Cabral et al., em preparação).

Para o experimento de indução de esporulação, os cinco isolados preservados pelo método do Castellani foram repicados para meios de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) em placas de Petri e mantidos em câmara de inoculação tipo BOD sob fotoperíodo de 12 h durante cinco dias até o momento da repicagem para outras placas contendo os diferentes substratos para induzir a esporulação dos isolados. Para isso, foram retirados, das bordas da colônia, discos de micélio de aproximadamente 8 mm de diâmetro de cada um dos isolados.

4.3.2. Seleção preliminar de substratos

Um experimento preliminar foi realizado com o isolado de *L. euphorbicola* objetivando a seleção de substratos promissores para a indução de esporulação dos isolados da família Botryosphaeriaceae. A metodologia padrão consiste em repicar as colônias fúngicas em placas de Petri contendo AA 2% sobreposto com acículas de pinheiro (*Pinus* sp.) duplamente esterilizada e incubada a 25 °C com fotoperíodo de 12h de luz UV-próximo por 3 a 4 semanas (Slippers et al., 2004). Portanto, as acículas de *Pinus* foram substituídas por diferentes substratos comumente encontrados na região de

Petrolina-Juazeiro. Os substratos foram: limbo e nervura central de folhas de milho, fibra de coco seco e verde, vagem de feijão, folha de banana, ramos de aceroleira e folha de mangueira. Todos os materiais foram cortados em pequenos pedaços de 10x10 mm com uma espessura de aproximadamente 2 mm, sendo estes autoclavados três vezes durante 20 minutos e com intervalos de 24 horas. No caso específico dos ramos de aceroleira, os mesmos possuíam 2-3 mm de diâmetro e 2 cm de comprimento.

Neste experimento teste, foram colocados quatro fragmentos em cada placa, e cada fragmento foi considerado como uma repetição. A avaliação foi realizada 30 dias após a instalação do experimento, sendo verificado o número e o local do surgimento dos picnídios. A partir desses resultados (dados não mostrados), três tratamentos foram considerados promissores: nervura central do milho, folha de mangueira e ramos de Aceroleira.

4.3.3. Esporulação em diferentes substratos

Para o experimento de indução de esporulação foram avaliados três substratos considerados promissores no experimento preliminar (nervura central do milho, folha de mangueira, e ramos de aceroleira) e outros dois substratos comumente citados na literatura, que seriam as acículas de *Pinus* e a palha de milho (Rosado et al., 2016).

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (5x5), sendo o fator A constituído por cinco substratos sobre o meio AA 2% e o fator B formado por cinco isolados fúngicos. A unidade experimental foi constituída por uma placa de Petri, com quatro fragmentos para cada substrato, sendo usadas três repetições por tratamento. As avaliações do experimento foram realizadas quatro semanas após a sua instalação. Durante este período foram realizadas observações sob o microscópio estereoscópio (Stemi DV4;

Zeiss) a fim de acompanhar o início da formação dos picnídios e determinar o início da determinação do número total de picnídios formados ao final de cada época do experimento. Para auxiliar na contagem do número de picnídios foi utilizada uma escala de notas baseada no número de picnídios, distribuídas da seguinte forma: Nota 0 = 0 picnídios, Nota 1 <30 picnídios, Nota 2 entre 31 e 60 picnídios, Nota 3 entre 61 e 90 picnídios, Nota 4 entre 91 e 120 picnídios e Nota 5 > 120 picnídios.

A fertilidade dos picnídios foi avaliada ao final do experimento por meio da realização de cortes transversais dos corpos de frutificação e montagem de lâminas em lactofenol, com posterior observação em microscópio de luz (Nikon E-200) para a verificação da presença ou não de conídios. Para cada repetição, quando possível, 30 cortes foram realizados com o auxílio de uma lâmina de aço inoxidável. O experimento foi repetido três vezes, sendo estas realizadas em três épocas diferentes em setembro de 2015, outubro de 2015 e março de 2016.

Os dados obtidos foram, primeiramente, avaliados quanto à sua normalidade, sendo em seguida submetido ao teste de Skott-Knott, a 5% de probabilidade. Os dados de percentual de picnídios férteis foram transformados para $(X+0,5)^{0,5}$. As análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico SISVAR 5.3 (Ferreira, 2011).

4.4. Resultados

De modo geral, houve produção de picnídios nos cinco substratos para todos os isolados avaliados, em pelo menos uma das épocas do experimento, com exceção da folha do milho, que não induziu a formação de picnídios para os isolados de *L. hormozganensis* e *L. viticola*. Já a fertilidade dos picnídios

variou entre 6,4 e 91,4%, não sendo observado picnídios férteis para os isolados de *L. hormozganensis* (Figuras 1, 2 e 3).

Os substratos ramos de aceroleira, folhas de manga e acículas de pinus foram os que induziram a formação de picnídios de forma mais precoce, sendo os mesmos observados em média 72 horas após a instalação dos experimentos. Esses substratos também foram os tratamentos que apresentaram os maiores números (média entre 32 e 105) e fertilidade de picnídios (média entre 16,5 e 48,1%). Os substratos folha de mangueira e ramos de aceroleira foram os que apresentaram os melhores resultados (Figuras 1, 2 e 3).

Houve diferença significativa entre os isolados fúngicos quanto à produção e fertilidade de picnídios nos diferentes substratos. Os isolados *Botryosphaeria* sp. e *L. iraniensis* apresentaram a maior produção e fertilidade de picnídios nas três épocas do experimento, enquanto o isolado *L. hormozganensis* apresentou os menores valores (Figuras 1, 2 e 3).

A interação entre as espécies e os substratos foi significativa ($P > 0,05$) tanto para número de picnídios formados como para a sua fertilidade. No substrato acículas de pinus foi possível observar que todos os isolados formaram picnídios nos três experimentos, com exceção do isolado *L. hormozganensis*, no terceiro experimento. Para este substrato, o isolado de *Botryosphaeria* sp. se destacou e obteve uma produção e fertilidade de picnídios significativamente maior que a maioria dos demais isolados nos três experimentos.

No substrato palha de milho a tendência foi a formação de um maior número de picnídios para os isolados de *Botryosphaeria* sp. e *L. iraniensis*. Os isolados de *L. hormozganensis* e *L. viticola* não formaram picnídios. A

fertilidade dos picnídios no geral foi muito baixa (56,5% menor que o melhor tratamento) em relação aos demais substratos.

Já no substrato folha de mangueira, todos os isolados formaram picnídios, sendo importante destacar que isolados *Botryosphaeria* sp., *L. iraniensis* e *L. viticola* foram sempre os que mais produziram picnídios. Para os dois primeiros, observou-se também uma maior fertilidade dos picnídios. Semelhante aos demais substratos, o isolado *L. hormozganensis* foi o que produziu menos picnídios.

O ramo de aceroleira foi outro substrato que se destacou. Todos os isolados formaram picnídios neste substrato nas três épocas do experimento, com exceção *L. hormozganensis* no terceiro experimento. Semelhante ao substrato folha de mangueira, os isolados *Botryosphaeria* sp., *L. viticola* e *L. iraniensis* se destacaram e produziram mais picnídios formados em pelo menos duas épocas do experimento. *Lasiodiplodia iraniensis* também se destacou na fertilidade dos picnídios com esse substrato, em todas as épocas do experimento a fertilidade de picnídios variou entre 50 e 60% .

No substrato nervuras centrais da folha de milho, apenas *Botryosphaeria* sp. e *L. iraniensis* produziram maior número e fertilidade de picnídios nas três épocas do experimento. Neste substrato, os isolados de *L. hormozganensis*, *L. euphorbicola* e *L. viticola* produziram poucos picnídios, com exceção de *L. euphorbicola* no primeiro experimento.

4.5. Discussão

Este é o primeiro estudo sobre a influência de diferentes substratos na esporulação *in vitro* de fungos Botryosphaeriaceae isolados a partir de aceroleira com morte descendente. Para uma melhor representatividade do

patossistema, buscou-se neste estudo o uso de diferentes espécies do grupo, como *L. euphorbicola*, *L. hormozganensis*, *L. iraniensis*, *L. viticola* e *Botryosphaeria* sp. Em virtude do uso dessa diversidade de espécies foi observado neste, assim como em outros trabalhos (Pereira et al., 2006, Halfeld-Vieira et al., 2007 e Amponsah et al., 2008), variações na produção e fertilidade de picnídios sob diferentes substratos. Essas variações podem estar relacionadas à existência de variabilidade genética entre os isolados quanto ao crescimento e esporulação (Pereira et al., 2006). Este fato já foi relatado para isolados de *Botryosphaeria* sp. (Amponsah et al., 2008) e *L. iraniensis* (Maciel et al., 2015), parecendo ser algo comum entre espécies e muito mais frequente entre gêneros.

Os tratamentos com folhas de mangueira e ramos de aceroleira se destacaram. Estes tratamentos foram duas vezes superiores na produção de picnídios ao padrão (Acículas de *Pinus*) para a maioria das vezes em que os isolados foram avaliados (73%). A escolha do substrato para a indução de esporulação de fungos é de extrema importância, uma vez que um substrato pode induzir a formação de picnídios, mas os mesmo podem não estar férteis. Kim et al. (2005) afirmam que os nutrientes e a sua disponibilidade no meio de cultivo podem estar relacionados às diferenças na esporulação de fungos Botryosphaeriaceae em diferentes substratos.

A preferência dos fungos usados no trabalho foi maior em substratos com superfície mais ondulada, o que favoreceu a formação dos corpos de frutificação e produção de conídios. Este fato foi observado nas nervuras secundárias de folhas de manga e nas cicatrizes dos ramos de aceroleira gerados pela retirada de folhas para o preparo deste substrato (Figura 4).

O bom desempenho dos ramos de aceroleira, de certa forma, era especulado por ser a cultura hospedeira dos fungos avaliados. O sucesso na indução de esporulação desses fungos em fragmentos de partes da planta hospedeira já foi relatada em outros trabalhos, como Linaldeddu et al. (2015) e Zlatkovic´ et al. (2016) que utilizaram ramos de carvalho e cipreste (*Lawson cypress*), respectivamente, para induzir a esporulação de algumas espécies da família Botryosphaeriaceae.

A folha de manga também se destacou por ter induzido a produção de picnídios férteis para todos os isolados nas três épocas do experimento. Os isolados de *Botryosphaeria* sp. e *L. iraniensis* quando cultivados sob folhas de manga foram os que tiveram a maior estabilidade, apresentando a mesma tendência de produção e fertilidade de picnídios nas três épocas do experimento.

Os resultados deste estudo são cruciais para realização de futuros estudos desse importante grupo de fungos, principalmente taxonômicos, em locais onde a ocorrência desses patógenos tem sido um problema cada vez mais frequente. Assim, na impossibilidade da utilização da metodologia tradicional este trabalho demonstrou que é possível utilizar substratos alternativos igualmente eficientes na esporulação de fungos dos gêneros *Lasiodiplodia* e *Botryosphaeria*, como as folhas de manga e ramos de aceroleira.

4.6. Referências

- Abdollahzadeh J, et al. (2010). Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 25(1), 1-10.
- Amponsah NT, Jones EE, Ridgway HJ, Jaspers MV (2008). Production of *Botryosphaeria* species conidia using grapevine green shoots. *New Zealand Plant Protection*, 61, 301-305.
- Cavalcante RD, Lima WG, Martins RB, Tovar-Pedraza JM, Michereff SJ, Câmara MPS, (2014). Thiophanate-methyl sensitivity and fitness in *Lasiodiplodia theobromae* populations from papaya in Brazil. *European journal of plant pathology*, 140(2), 251-259.
- Chen SF, Morgan DP, Michailides TJ (2014). Botryosphaeriaceae and Diaporthaceae associated with panicle and shoot blight of pistachio in California, USA. *Fungal Diversity*, 67(1), 157-179.
- Correia KC, Câmara MPS, Barbosa MAG, Sales Jr R, Agustí-Brisach C, Gramaje D (2013). Fungal trunk pathogens associated with table grape decline in Northeastern Brazil. *Phytopathologia Mediterranea*, 52(2), 380.
- Correia KC, Silva MA, Morais MA, Armengol J, Phillips AJL, Câmara MPS, Michereff SJ (2016). Phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of table grape in the main Brazilian exporting region. *Plant Pathology*, 65(1), 92-103.
- De Oliveira Costa VS, Michereff SJ, Martins RB, Gava CAT, Mizubuti ESG, Câmara MPS (2010). Species of Botryosphaeriaceae associated on mango in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, 127(4), 509-519.

- Farr DF, Rossman AY (2016). Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Em: <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/> acessado em 6 de junho de 2016.
- Ferreira DF (2011). Sisvar: Computer statistic analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)*, 35(6), 1039-1042.
- Halfeld-Vieira BA, Nechet KL, Souza GR (2007). Influência de meios de cultura e regimes de luz na esporulação e crescimento micelial de *Lasiodiplodia theobromae*. Boa Vista: Centro de Pesquisa Agroflorestral de Roraima/EMBRAPA. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento(2)*, 1-14.
- Júnior AFN, Fischer IH, Bragança CA, Júnior NSM, Amorim L, 2016. Identification of Botryosphaeriaceae species that cause styler-end rot of guavas and characterisation of the disease monocycle. *European Journal of Plant Pathology*, 144(2), 271-287.
- Kim YK, Xiao CL, Rogers JD (2005). Influence of culture media and environmental factors on mycelial growth and pycnidial production of *Sphaeropsis pyriputrescens*. *Mycologia*, 97(1), 25-32.
- Lima J, Moreira R, Cardoso J, Martin M, Viana F (2013). Caracterização cultural, morfológica e patogênica de *Lasiodiplodia theobromae* associado a frutíferas tropicais. *Summa Phytopathologica*, 39(2), 81-88.
- Linaldeddu BT, Deidda A, Scanu B, Franceschini A, Serra S, Berraf-Tebbal A, et.al. (2015). Diversity of Botryosphaeriaceae species associated with grapevine and other woody hosts in Italy, Algeria and Tunisia, with descriptions of *Lasiodiplodia exigua* and *Lasiodiplodia mediterranea* sp. nov. *Fungal Diversity*, 71(1), 201-214.
- 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 Diversity*, 67(1), 231-247.
- Maciel CG, Muniz MFB, Mezzomo R, Reiniger LRS (2015). *Lasiodiplodia theobromae* associated with seeds of *Pinus* spp. originated from the northwest of Rio Grande do Sul, Brazil.
- Marques MW, Lima NB, De Moraes Jr MA, Barbosa MAG, Souza BO, Michereff SJ, et al. (2013). Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. *Fungal Diversity*, 61(1), 181-193.
- Mehl JW, Slippers B, Roux J, Wingfield MJ (2011). Botryosphaeriaceae associated with *Pterocarpus angolensis* (kiaat) in South Africa. *Mycologia*, 103(3), 534-553.
- Mohali S, Burgess TI, Wingfield MJ (2005). Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. *Forest Pathology*, 35(6), 385-396.
- Netto MS, Assunção IP, Lima GS, Marques MW, Lima WG, Monteiro JH, et al. (2014). Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. *Fungal Diversity*, 67(1), 127-141.
- Pereira AL, Silva GS, Ribeiro VQ (2006). Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. *Fitopatologia Brasileira*, 31(6), 572-578.
- Phillips AJL, Alves A, Abdollahzadeh J, Slippers B, Wingfield MJ, Groenewald JZ, Crous PW (2013). The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, 76, 51-167.
- Rosado AWC, Machado AR, Freire FDCO, Pereira OL (2016). Phylogeny, Identification, and Pathogenicity of *Lasiodiplodia* Associated with Postharvest Stem-End Rot of Coconut in Brazil. *Plant Disease*, PDIS-03.

- Saha A, Mandal P, Dasgupta S, Saha D (2008). Influence of culture media and environmental factors on mycelial growth and sporulation of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon and Maubl. *Journal of Environmental Biology*, 29(3), 407.
- Slippers B, Crous PW, Denman S, Coutinho TA, Wingfield BD, Wingfield MJ (2004). Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia*, 96(1), 83-101.
- Slippers B, Smit WA, Crous PW, Coutinho TA, Wingfield BD, Wingfield MJ (2007). Taxonomy, phylogeny and identification of Botryosphaeriaceae associated with pome and stone fruit trees in South Africa and other regions of the world. *Plant Pathology*, 56(1), 128-139.
- Slippers B, Wingfield MJ (2007). Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal biology reviews*, 21(2), 90-106.
- Smith H, Wingfield MJ, Coutinho TA, Crous PW (1996). *Sphaeropsis sapinea* and *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Pinus* spp. and *Eucalyptus* spp. in South Africa. *South African journal of botany*, 62(2), 86-88.
- Urbez-Torres JR, Peduto F, Striegler RK, Urrea-Romero KE, Rupe JC, Cartwright RD, Gubler WD (2012). Characterization of fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Arkansas and Missouri. *Fungal Divers* 52:169–189
- Valencia D, Torres C, Camps R, López E, Celis-Diez JL, Besoain X (2015). Dissemination of Botryosphaeriaceae conidia in vineyards in the semiarid Mediterranean climate of the Valparaíso Region of Chile. *Phytopathologia Mediterranea*, 54(2), 394.

Zlatković M, Keča N, Wingfield MJ, Jami F, Slippers B (2016).

Botryosphaeriaceae associated with the die-back of ornamental trees in the

Western Balkans. *Antonie van Leeuwenhoek*, 109(4), 543-564.

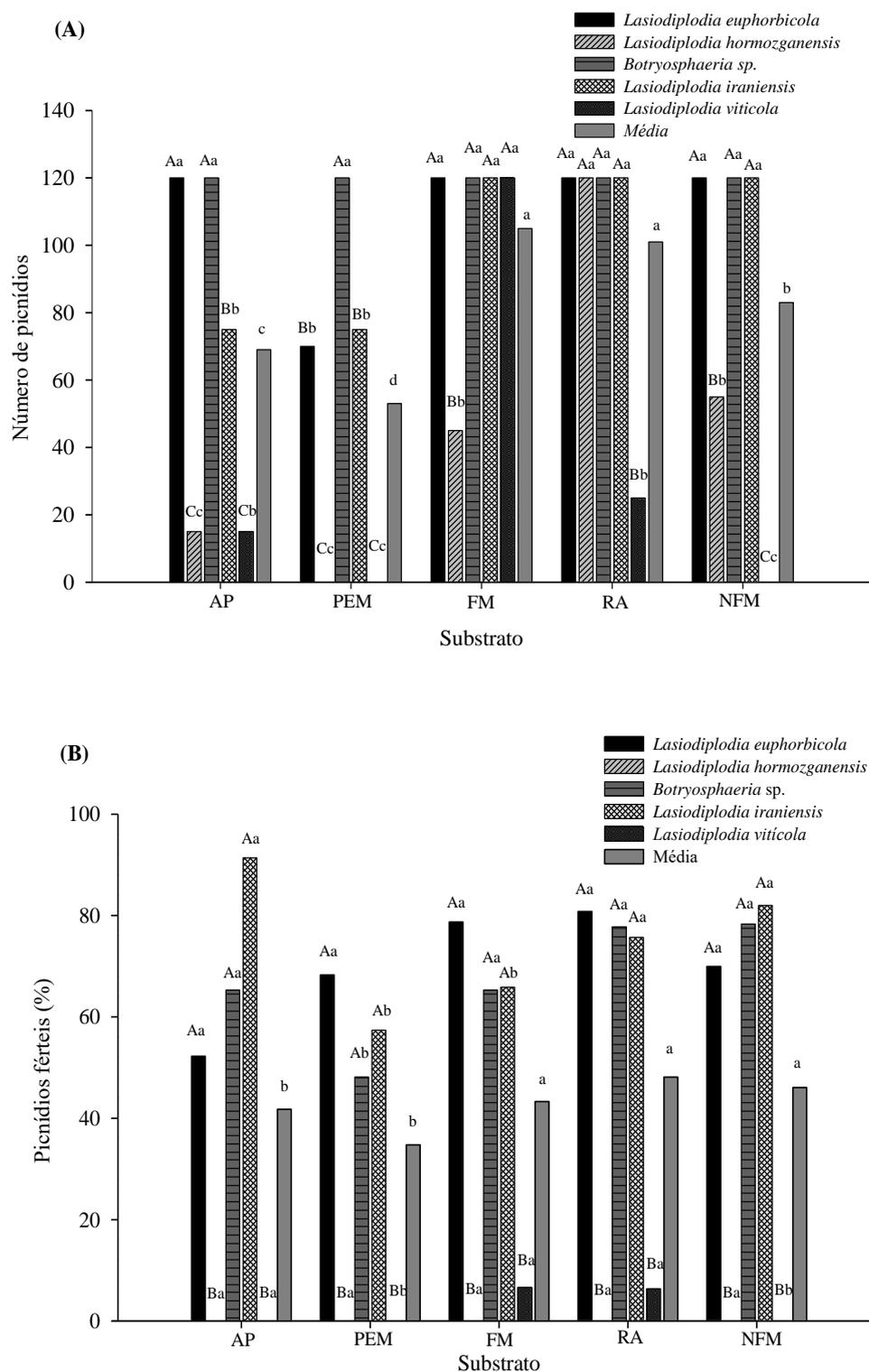


Figura 1- Primeira época do experimento de produção (A) e fertilidade (B) de picnídios de cinco isolados da família Botryosphaeriaceae, após 30 dias de cultivo em BOD a 25°C sob 12h de luz UV próximo, em meio ágar-água 2% sobreposto com acículas de *Pinus* (AP), palha da espiga do milho (PEM), folha de mangueira (FM), ramos de aceroleira (RA) e nervuras centrais da folha do milho (NFM). *Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Skott-knott a 5% de probabilidade.

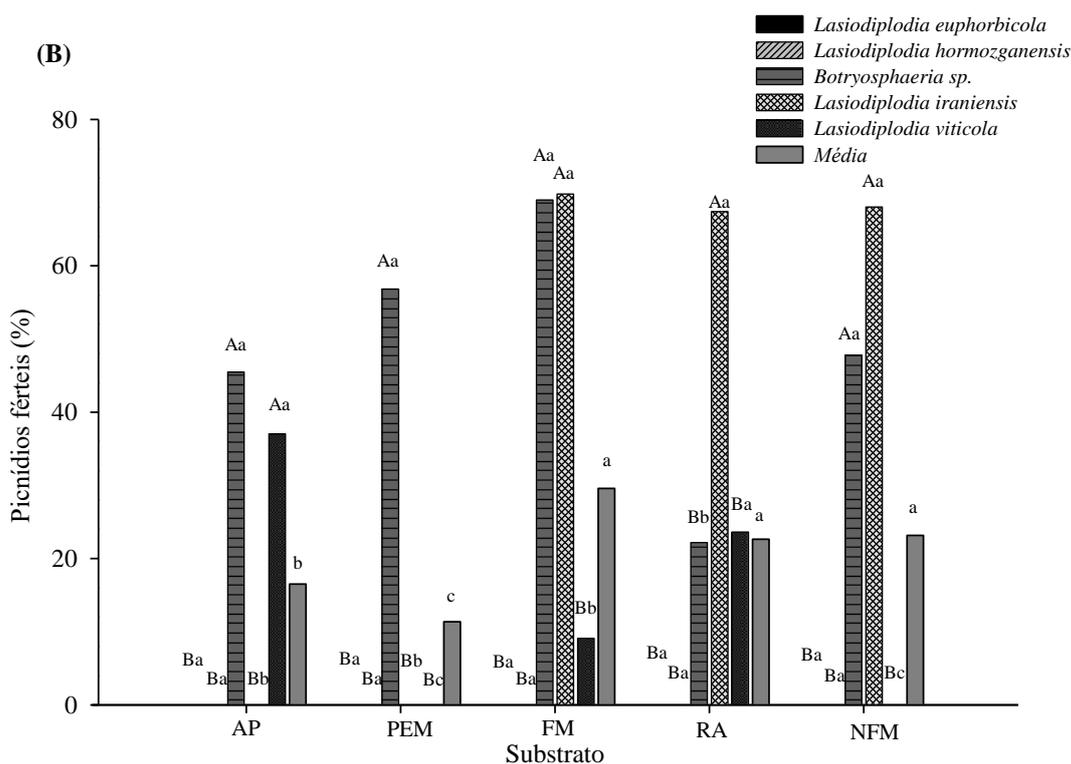
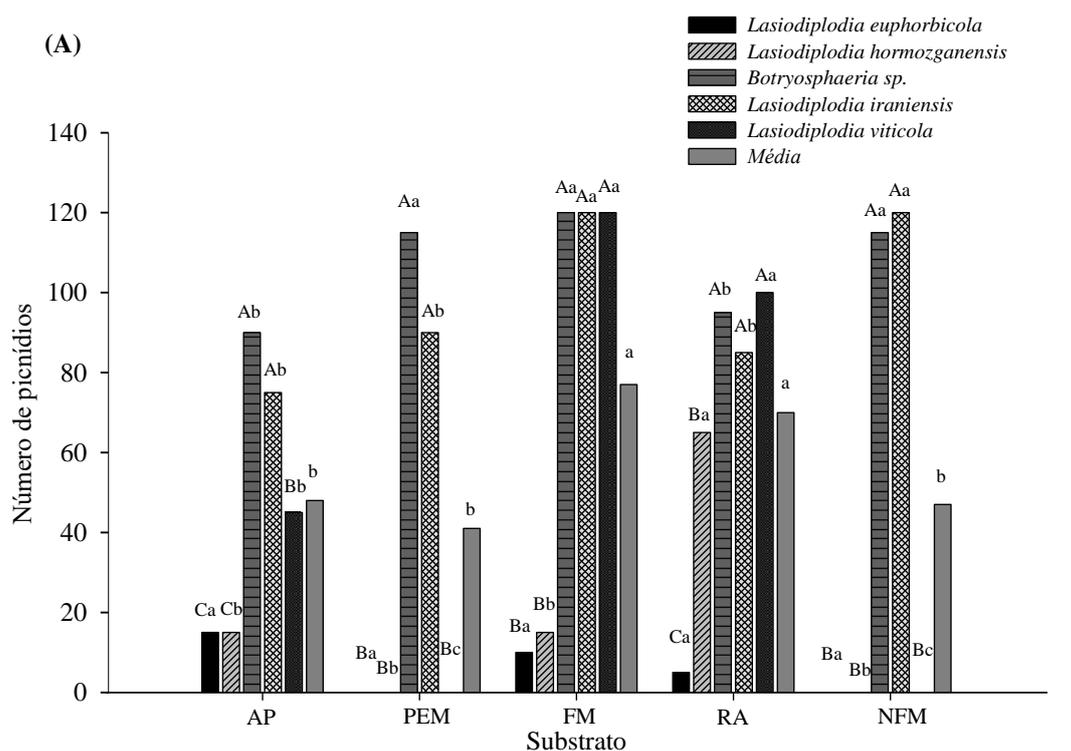


Figura 2- Segunda época do experimento de produção (A) e fertilidade (B) de picnídios de cinco isolados da família Botryosphaeriaceae, após 30 dias de cultivo em BOD a 25°C sob 12h de luz UV próximo, em meio ágar-água 2% sobreposto com acículas de *Pinus* (AP), palha da espiga do milho (PEM), folha de mangueira (FM), ramos de aceroleira (RA) e nervuras centrais da folha do milho (NFM). *Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Skott-knott a 5% de probabilidade.

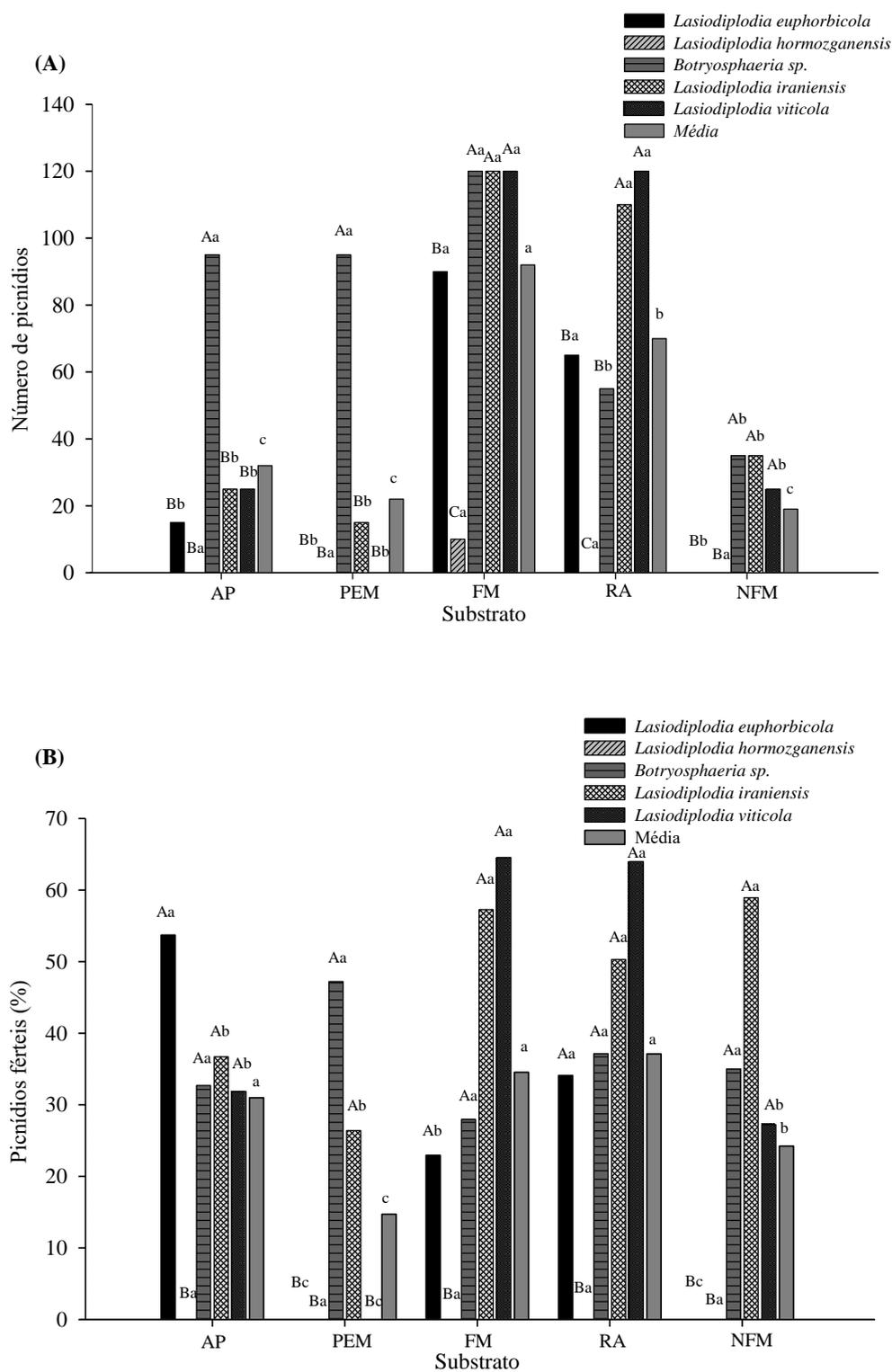


Figura 3- Terceira época do experimento de produção (A) e fertilidade (B) de picnídios de cinco isolados da família Botryosphaeriaceae, após 30 dias de cultivo em BOD a 25°C sob 12h de luz UV próximo, em meio ágar-água 2% sobreposto com acículas de *Pinus* (AP), palha da espiga do milho (PEM), folha de mangueira (FM), ramos de aceroleira (RA) e nervuras centrais da folha do milho (NFM). *Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Skott-knott a 5% de probabilidade.

Tabela 1 – Informações sobre os isolados de Botryosphaeriaceae utilizados nos experimentos de indução de esporulação sob diferentes substratos. Estes fungos foram isolados a partir de diferentes cultivares de aceroleira.

Gênero/ Espécie*	Local (Coordenadas)	Cultivar hospedeira	Conídios estudo (μm)	Conídios literatura (μm)	Referência
<i>Lasiodiplodia euphorbicola</i>	09,28°16,53'S 40°34,50'W	Costa Rica	17-24,3x 9,7-12,1	15-23x9-12	Machado et al. 2014
<i>Lasiodiplodia hormozganensis</i>	09°17,89'S 40°29,72'W	Comum	**	18-24x11-14	Abdollahzadeh et al. 2010
<i>Botryosphaeria sp.</i>	09°17,89'S 40°29,72'W	Okinawa	21,9-24,3 x 6,7-8,5	-	-
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	09°18,68'S 40°34,93'W	Junko	21-29,3 x 12,1-14,6	17-23x11-14	Abdollahzadeh et al. 2010
<i>Lasiodiplodia viticola</i>	09°19,94'S 40°37,50'W	Flor branca	19,4-23,1 x 9,7-12,1	18,2-20,5x8,8-10,1	Urbez-Torres et al. 2012

* Cabral et al., em preparação. ** Isolado não produziu conídios.

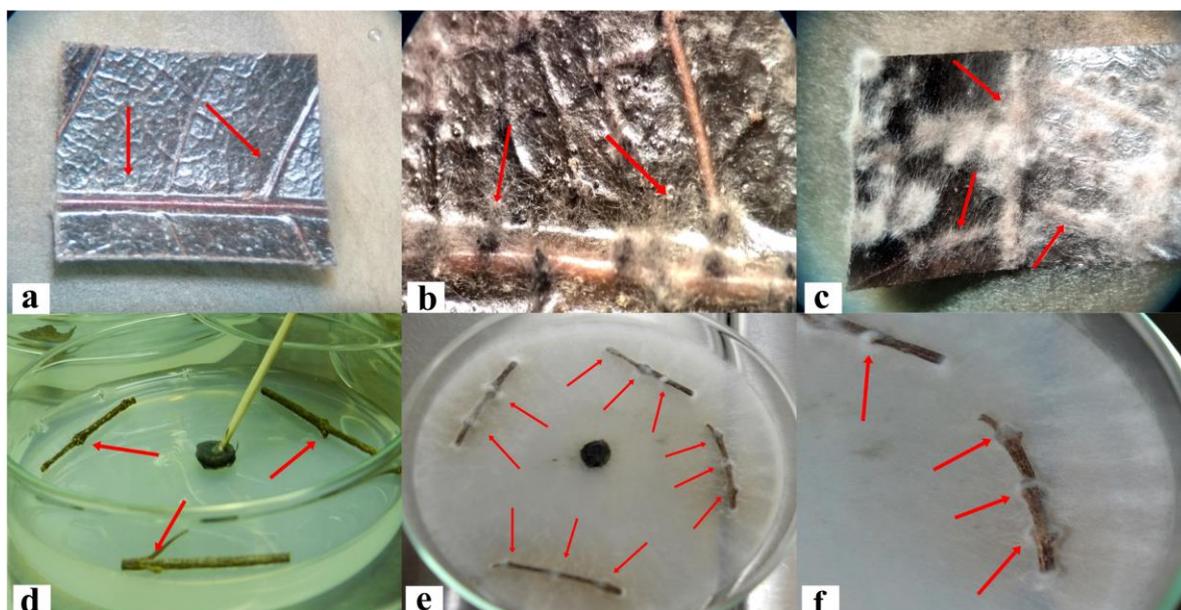


Figura 4 – Formação de picnídios nas nervuras de folhas de manga e nas cicatrizes das folhas dos ramos de aceroleira. a) Nervuras das folhas de manga. b-c) Formação de picnídios sobre as nervuras. d) Cicatrizes das folhas dos ramos de aceroleira. e-f) Formação de picnídios sobre as cicatrizes.

5. Capítulo 2 - Padronização de metodologias de inoculação e reação de acessos à morte descendente da aceroleira²

5.1. Resumo

A interação entre *Lasiodiplodia* spp. e aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.) ainda foi pouco estudada, muito em parte devido à falta de padronização de métodos de inoculação artificial e de avaliação do patossistema. Assim, objetivaram-se deste estudo foram avaliar a agressividade de isolados de *Lasiodiplodia*, determinar um método de inoculação e avaliação do patossistema e avaliar a resistência de 34 acessos de aceroleira a um isolado de *Lasiodiplodia* agressivo. Para os experimentos de agressividade, três isolados de *Lasiodiplodia* foram utilizados para avaliação da velocidade de crescimento micelial *in vitro* e agressividade em mudas. O isolado mais agressivo foi utilizado nos testes para determinação do melhor método de inoculação e avaliação de 34 acessos de aceroleira do Banco de Germoplasma de Embrapa Semiárido. Os métodos avaliados foram: 1) Furador, 2) corte em Bisel e 3) retirada manual de ramos de mudas. O método mais eficiente foi utilizado no experimento de reação dos acessos. Todos os experimentos foram realizados pelo menos duas vezes. O isolado com maior taxa de crescimento micelial (*L. euphorbicola*) não corroborou com o isolado mais agressivo em mudas (*L. iraniensis*), sendo este último utilizado nos experimentos subsequentes. Os resultados dos experimentos inferiram que o método do Furador foi o mais eficiente na distinção de acessos de aceroleira a morte

² Artigo a ser submetido na revista **Crop Protection**

descendente. Os acessos BRS Cabocla, Dominga, Coopama N°1, Flor Branca; BV 01, ACO 09, Barbados, UEL 01, ACO 14, ACO 10, Clone 47, e Camta apresentaram os maiores níveis de resistência à morte descendente causada por *L. iraniensis*.

Palavras-chave: *Malpighia emarginata*, *Lasiodiplodia iraniensis*, métodos de inoculação, níveis de resistência.

5.2. Introdução

O cultivo de acerola (*Malpighia emarginata* DC.) tem ganhado espaço no cenário mundial na década de 80, o que fez com que países como o Brasil aumentassem a área cultivada e, conseqüentemente, a produção nacional (De Assis et al., 2008). O interesse do mercado consumidor na acerola surgiu principalmente depois da descoberta (1950) dos altos teores de vitamina C e compostos benéficos do fruto, como os antioxidantes (Furlaneto; Nasser, 2015). Por ser uma cultura pouco estudada tanto no Brasil como em outros países, os conhecimentos sobre as doenças e a relação hospedeiro-ambiente-patógeno são incipientes, limitando-se somente a relatos de sua ocorrência (Ritzinger; Kobayashi; Oliveira, 2003; Ritzinger; Ritzinger, 2011).

A morte descendente ou também podridão seca das hastes vêm se constituindo em um sério problema para as regiões agrícolas do Brasil e do mundo, ocasionando diversos danos aos pomares, principalmente os de manga, uma vez que a doença aumenta o custo de produção, além de reduzir a vida útil e produtividade do pomar (Tavares, 2002; Ribeiro, 2005). Em aceroleira esta doença pode se iniciar a partir da extremidade do ramo, avançando em direção ao caule ou, mais raramente, se iniciar a partir do sistema radicular, que posteriormente pode provocar a morte da planta (Freire

& Cardoso, 2003). Os fungos da família Botryosphaeriaceae são relatados como os principais agentes causadores dessa doença, com destaque para as espécies do gênero *Lasiodiplodia* (Phillips et al., 2013; Marques et al., 2013; Netto et al., 2014; Maciel et al., 2015; Júnior, et al. 2016).

Os fitopatógenos do gênero *Lasiodiplodia* geralmente são polívoros, apresentando uma gama de mais de 990 hospedeiros catalogadas em regiões tropicais e temperadas, causando os mais variados sintomas, e apresentando uma alta variabilidade patogênica (Lima et al., 2013; Correia et al., 2016; Farr & Rossman, 2016). A alta variabilidade patogênica implica na necessidade de se ter um aprofundamento da biologia populacional e da interação do patógeno com as plantas hospedeiras para que o estabelecimento de métodos de manejo se torne mais eficientes (Cardoso et al., 2009; Lima et al., 2013).

O método de inoculação desempenha um papel essencial no estudo de um patossistema de interesse, sendo importante para verificar qual é a melhor estratégia de infecção do patógeno no hospedeiro, o que muitas vezes, implica em um ajuste específico para cada patossistema (De Souza et al., 2003; Muñoz Bodnar et al., 2015). Para os programas de melhoramento genético de plantas que visam o desenvolvimento de plantas com resistência a doenças, os métodos de inoculação artificial são de grande importância, pois encurtam o tempo de avaliação, podem ser executados utilizando plantas jovens, em qualquer época do ano, e viabilizam e reduzem os custos dos programas (De Sousa et al., 2003; Lima et al., 2014).

Para Souza et al. (2013) a solução para uma parcela considerável dos problemas da cultura da aceroleira, principalmente os fitossanitários, depende da continuidade e aprimoramento dos esforços em melhoramento genético, uma vez que esta estratégia é de baixo custo, fácil adoção e não implica em

riscos ambientais e sanitários. Entretanto, os programas de melhoramento genético com acerola no Brasil tem se preocupado basicamente em melhorar a produtividade, teor de vitamina C e precocidade das plantas (Paiva et al., 1999; Gonzaga Neto, 1999).

Dessa forma, os objetivos deste estudo foram avaliar a agressividade de isolados de *Lasiodiplodia*, determinar um método de inoculação e avaliação no patossistema e avaliar a resistência de 34 acessos de aceroleira a um isolado de *Lasiodiplodia* agressivo.

5.3. Material e métodos

5.3.1. Isolados

Três isolados fúngicos obtidos de aceroleiras com morte descendente, previamente caracterizados filogeneticamente como pertencente ao gênero *Lasiodiplodia* foram usados nos testes preliminares para a seleção do isolado a ser usado nas avaliações de resistência dos cultivares e acessos de aceroleiras pertencente ao Banco de Germoplasma (BAG) da Embrapa Semiárido. Os isolados foram repicado para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), sob de fotoperíodo de 12 h de luz a $25 \pm 1^\circ$ C em câmara BOD, permanecendo nestas condições por sete dias para posterior utilização nos experimentos.

5.3.2. Velocidade de crescimento micelial e agressividade de *Lasiodiplodia* spp.

A avaliação da velocidade média de crescimento micelial consistiu na medição do diâmetro do micélio em dois sentidos opostos, a cada 24 h, sendo utilizada a média destes para cada repetição. As avaliações finalizaram quando

o micélio atingiu a borda da placa em um dos tratamentos. A velocidade média de crescimento dos isolados foi determinada pela fórmula adaptada de Lilly & Barnett (1951).

$$V_{mc} = (Ct_2 - Ct_1) / T$$

onde,

V_{mc} = velocidade média de crescimento (cm/dia);

Ct_1 = crescimento no primeiro intervalo de tempo (cm);

Ct_2 = crescimento no segundo intervalo de tempo (cm);

T = intervalo de tempo considerado (dia).

Três repetições desse experimento foram realizadas, entre junho e outubro de 2015. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com dez repetições. Sendo os tratamentos constituídos de cada um dos três isolados de *Lasiodiplodia*.

Para avaliar a agressividade dos isolados, mudas de aceroleira da cultivar Junko, com aproximadamente 90 dias de idade após a enxertia, foram inoculadas pelo método do Furador, usando discos de meio de cultura BDA contendo micélio do patógeno com sete dias de crescimento (Alfenas & Ferreira, 2007). O disco de micélio foi introduzido em um furo no caule da muda de aceroleira, aproximadamente no meio do enxerto (Figura 2, apêndice). A profundidade do furo foi de aproximadamente 2 mm, feito com o auxílio de um furador de metal. Imediatamente após o furo, o meio de cultura com e sem o fungo (testemunha) foi colocado dentro do ferimento, em seguida colocou-se um pedaço de algodão umedecido (com água destilada) abaixo do corte e cobriu-se externamente com Parafilme® (LIMA et al., 2012). Após a inoculação, as mudas foram mantidas a 25 °C no escuro por 48 h. Em seguida, as mudas foram mantidas em um viveiro de mudas com tela de sombreamento 50% até

as avaliações. Neste período, as plantas foram irrigadas em intervalos de 48 h, elevando a umidade do substrato para capacidade de campo baseado no peso dos vasos.

As plantas inoculadas foram avaliadas quanto ao comprimento da lesão 30 dias após a inoculação com o auxílio de um paquímetro, para isso foram realizados cortes longitudinais retirando a casca do caule das mudas a partir do local onde foi feita a inoculação, dessa forma foi medido o comprimento da lesão no sistema vascular da planta. Posteriormente, os fungos foram reisolados e comparados à cultura original para a comprovação da patogenicidade, seguindo o último dos postulados de Koch. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com dez repetições. Os tratamentos consistiram de três isolados e uma testemunha sem inoculação. O experimento foi repetido duas vezes.

Os dados obtidos foram primeiramente avaliados quanto à normalidade e homogeneidade, sendo em seguida submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas utilizando o teste de Tukey ($P < 0,05$). Os dados de comprimento da lesão dos isolados foram transformados para \sqrt{x} . As análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico SISVAR, versão 5.3 (Ferreira, 2011) e no programa R (R Core Team, 2014).

5.3.3. Métodos de inoculação

O isolado considerado mais virulento do experimento anterior foi utilizado para este experimento. Nesta etapa, foram avaliados três métodos de inoculação do fungo, sendo este o do Furador, o corte em Bisel e Desponte (Figura 2, apêndice). Na execução deste experimento foram inoculadas mudas de aceroleira das cultivares Junko e Okinawa de aproximadamente um ano de

enxertada. Para isso, quatro plantas foram inoculadas com e sem o fungo para cada método de inoculação. Este experimento foi montado em fatorial com seis tratamentos de inoculação, duas variedades e quatro repetições (clones de cada acesso).

Cada planta foi inoculada pelo método de inoculação de discos de micélio do patógeno (Alfenas & Ferreira, 2007). Para o método do Furador, o isolado previamente cultivado em BDA foram retirados em disco de 4 mm de diâmetro do micélio fúngico e introduzido em um furo no caule da muda de aceroleira, aproximadamente no meio do enxerto. A profundidade do furo foi de aproximadamente 2 mm, feito com o auxílio de um furador de metal (Figura 2 do apêndice). Imediatamente após o furo, o meio de cultura com e sem o fungo foi colocado dentro do ferimento, em seguida colocou-se um pedaço de algodão umedecido (com água destilada) abaixo do corte e cobriu-se externamente com fita de Parafilme® (LIMA et al., 2012). As plantas inoculadas foram mantidas em uma sala de inoculação, com temperatura máxima de 32°C e mínima de 23°C, no escuro durante as primeiras 48h após a inoculação. Posteriormente as mudas inoculadas foram encaminhadas para um viveiro de mudas com tela de sombreamento 50% de plástico preto, onde ficaram até serem feitas as avaliações. Neste período, as plantas foram irrigadas em intervalos de 48 h, elevando a umidade do substrato para capacidade de campo baseado no peso dos vasos.

Para os demais métodos a única diferença esteve na forma como foi realizado o ferimento. No método do Bisel um corte em bisel de aproximadamente 5 mm de profundidade foi retirado com auxílio de um bisturi de metal. Para o método do Desponte, um ramo foi destacado manualmente na altura mais próxima ao centro da enxertia (Figura 2 do apêndice).

Nesta etapa, foram avaliados a área da lesão, comprimento da lesão, perímetro da lesão e diâmetro da lesão. Os dados obtidos foram primeiramente avaliados quanto à normalidade e homogeneidade, sendo em seguida submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan ($P < 0,05$) utilizando o programa estatístico SISVAR, versão 5.1., para determinar o melhor método de inoculação. Dados de área da lesão foram transformados utilizando (\sqrt{X}). Foi realizada também análise de correlação entre as variáveis (área da lesão, comprimento da lesão, perímetro da lesão ao redor do ramo e diâmetro da lesão) utilizando o método de Pearson ($|r| > 0,50$) com o auxílio do programa R (R Core Team, 2014). Para comprovação dos resultados dois experimentos foram conduzidos.

A área da lesão, em mm^2 , foi determinada com o auxílio de uma câmera digital e softwares de tratamento de imagens (Quant e o Photoshop CC 2015). O comprimento e a largura da lesão, em mm, foram quantificados com um paquímetro digital e o perímetro da lesão, com o auxílio de uma fita métrica. O perímetro da lesão foi medido fazendo-se um corte transversal do local onde ocorreu a inoculação e de uma visão superior mediu-se o perímetro em que a lesão alcançou do entorno na muda.

5.3.4. Experimento de resistência dos acessos

Para esta etapa foram realizados dois ensaios, nas quais o isolado e método de inoculação, selecionados anteriormente, foram usados para a determinação do nível de resistência de acessos de aceroleira do banco de germoplasma da Embrapa Semiárido. A única diferença na metodologia foi na execução do método de inoculação utilizado, onde a sala de inoculação não foi utilizada e as condições de temperatura não foram controladas, devido ao grande número de mudas avaliadas. Dessa forma as mudas ficaram durante as

primeiras 48h em um galpão coberto, sendo cada planta envolvida com um saco de papel para proporcionar o “escuro” que se usa na metodologia padrão. Neste local, foram monitoradas a temperatura máxima e mínima durante este período sendo registrado temperatura máxima de 33,5°C e mínima de 25°C no primeiro experimento e temperatura máxima de 35,5°C e mínima de 24°C na sua repetição.

Para execução destes experimentos, utilizou-se um delineamento em blocos casualizados, na qual cada acesso de aceroleira testado constituiu um tratamento. Os acessos avaliados foram: ACO 09, ACO 10, ACO 13, ACO 14, ACO 15, ALHA 06, Barbados, BRS Apodi, BRS Cabocla, BRS Cereja, BRS Frutacor, BRS Roxinha, BRS Rubra, BRS Sertaneja, BV 01, Camta, Clone 47, Clone 71/2, Coopama N^o1, Costa Rica, Dominga, Eclipse, Flor Branca, Florida Sweet, Iapar 01, Junko, Mineira, Nikki, Okinawa, Olivier, RECI 01, RECI 02, UEL 01 e Valeria, totalizando 34. Para constituir as repetições foram utilizados quatro clones de cada genótipo de aceroleira, tendo estes aproximadamente 70 dias de enxertados.

As avaliações consistiram de análise do comprimento de cada lesão em cada acesso, quantificados com o uso de um paquímetro digital na região do sistema vascular da planta, como descrito anteriormente. Os acessos foram agrupados em níveis de resistência (ex.: resistentes, moderadamente resistentes e suscetíveis) baseado em análises univariada de agrupamento, Skott-Knott a 5% de probabilidade, sendo os grupos de resistência formados, confirmados por análises de funções discriminantes. Os dados de comprimento médio da lesão foram transformados utilizando (\sqrt{X}) . As análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico SISVAR, versão 5.1 e Minitab, Versão 16.1 (Minitab Inc., 2010).

5.4. Resultados

Os resultados do experimento de crescimento micelial dos isolados de *Lasiodiplodia* permitiram inferir que *L. euphorbicola* foi o mais veloz *in vitro*, crescendo entre 4,7 e 5,6 cm/dia para as três épocas do experimento (Figura 1). Na primeira época do experimento, os três isolados apresentaram crescimento micelial iguais estatisticamente, no entanto, para as outras duas épocas do experimento, o isolado de *L. euphorbicola* se destacou crescendo mais rápido que os demais (Figura 1).

A patogenicidade dos isolados em aceroleiras foi comprovada nas duas repetições de um novo experimento, o qual buscou determinar o isolado de *Lasiodiplodia* mais agressivo (Figura 2). As duas repetições do experimento apresentaram o mesmo padrão de resultados, onde estatisticamente, o isolado de *L. iraniensis* foi o mais agressivo nas mudas, com lesões superiores a 12 cm de comprimento, sendo, em termos médios, quatro vezes superior às lesões do segundo isolado mais agressivo. A agressividade do isolado *L. iraniensis* causou a morte de 90% das mudas de aceroleira inoculadas, sendo possível observar a murcha e seca dos ramos nessas plantas 7 dias após a inoculação. A sintomatologia da doença se caracterizou por um início de murcha nas folhas, seguido pela seca descendente de folhas e ramos mais finos (Figura 3, apêndice). A seca evoluiu em direção à base da planta até atingir a raiz, levando à queda das folhas e uma necrose da raiz. Nos ramos, também foi possível observar rachaduras na casca (fendilhamentos) e formação de cancro próximo ao local de inoculação do patógeno (Figura 3, apêndice).

Para o experimento dos métodos de inoculação, foi possível observar que a área das lesões da doença variou entre as cultivares. Na média geral, considerando os três métodos de inoculação e as duas épocas do experimento,

a doença na cultivar Okinawa apresentou lesões 625% maiores que na cultivar Junko (Tabela 1). Entretanto, em termos médios, os três métodos de inoculação não diferiram entre si, estatisticamente, para os dois cultivares avaliados (Tabela 1).

Para a primeira época do experimento na cultivar Junko, o método do Furador e do Bisel foram superiores estatisticamente ao método do Desponte, gerando lesões 239% maiores com esses métodos. Nesta mesma época do experimento, para a cultivar Okinawa, os melhores métodos foram o do Desponte e, novamente, o do Bisel, gerando lesões 50% maiores que no método do Furador. Neste experimento observou-se também que nos métodos do Desponte e o do Furador a cultivar Junko apresentou lesões menores que a cultivar Okinawa.

Para a segunda época do experimento, os três métodos de inoculação não diferiram significativamente entre si, tanto para a cultivar Junko como o Okinawa. Entretanto, neste experimento observou-se também que para o método do Furador a cultivar Junko apresentou lesões menores estatisticamente que a cultivar Okinawa

A interpretação dos resultados da análise de correlação entre as variáveis área, perímetro, comprimento e largura das lesões, demonstram que há correlação significativa entre todas as variáveis avaliadas, sendo maior a correlação (96,2%) entre a área e o comprimento das lesões (Tabela 2).

Os 34 acessos de aceroleira foram inoculados com o patógeno mais agressivo (*L. iraniensis*), pelo método do Furador (o mais prático e eficiente), sendo determinado o comprimento médio das lesões (variável de mais fácil mensuração). Em todos os acessos inoculados foram observadas lesões necróticas com grandes diferenças no comprimento médio das lesões (Tabela

3). Em termos médios, a primeira época do experimento proporcionou lesões 121% maiores que a segunda, não sendo significativa a análise conjunta das duas épocas do experimento.

Os resultados das análises de agrupamento univariada (Scott-Knott a 5% de probabilidade) definiram dois níveis de resistência na primeira época do experimento e três na segunda, quanto à reação desses cultivares e acessos à *Lasiodiplodia iraniensis* (Tabela 3). Para uma interpretação mais acurada, usando os resultados das duas épocas do experimento, foi feita uma análise discriminante, com os valores de comprimento das lesões, para determinar qual agrupamento de níveis de resistência apresenta maior probabilidade de acerto. Assim, foi determinado que a probabilidade de acerto do agrupamento em dois e três níveis de resistência foram 100 e 91,2%, respectivamente. Assim, por não ter apresentado acessos imunes à doença, foi definido os níveis de resistência, moderadamente resistentes e suscetíveis à morte descendente causada por *L. iraniensis*.

Um total de 35,3% dos acessos avaliados foram classificados como moderadamente resistentes à morte descendente causada por *L. iraniensis* (BV 01, ACO 09, ACO 10, ACO 14, UEL 01, Clone 47, Coopama Nº1, Camta, Barbados, BRS Cabocla, Dominga e Flor Branca), enquanto que 64,7% foram suscetíveis à doença (ACO 13, ACO15, RECI 01, RECI 02, IAPAR 01, Clone 71/2, Alha 06, BRS Sertaneja, BRS Cereja, BRS Apodi, BRS Rubra, BRS Frutacor, BRS Roxinha, Junko, Costa Rica, Okinawa, Nikki, Eclipse, Valéria, Mineira, Oliver, Florida Sweet) (Tabela 3).

5.5. Discussão

A taxa de crescimento micelial é uma variável comumente usada, para várias espécies de fungos, como um indicativo de agressividade de fitopatógenos quando inoculados em plantas. Os resultados apresentados neste trabalho foram igualmente variáveis aos obtidos por Pereira et al. (2006), Lima et al (2012, 2014), Marques et al. (2013) e Correia et al. (2016) para diferentes espécies de *Lasiodiplodia*. Ou seja, é possível um patógeno crescer rapidamente *in vitro* e não ser capaz de causar as maiores lesões quando inoculados em um hospedeiro vivo. Essa diferença de resposta entre os fungos é explicada pela característica intrínseca de cada espécie do patógeno ou das formas de sua preservação antes da instalação dos experimentos (Pereira et al., 2006; Maciel et al., 2015). Para *Lasiodiplodia* esse fato também já foi observado (Lima et al., 2012; Marques et al., 2013), sendo taxa de crescimento micelial, considerada pouco informativa para determinar a agressividade de isolados de *Lasiodiplodia*.

Assim, para o patossistema *Lasiodiplodia*-Aceroleira, a inoculação de plantas, por meio de um método padrão e avaliação do tamanho das lesões após determinado período de tempo seria mais apropriado para determinar a agressividade dos isolados e resistência de cultivares. Todos os isolados avaliados neste trabalho foram patogênicos a aceroleira, mas o isolado de *L. iraniensis* foi o mais agressivo em plantas, causando as maiores lesões e morte de mais de 90% das plantas em poucos dias após a inoculação.

Para determinar um método padrão de inoculação para o patossistema *Lasiodiplodia*-Aceroleira foi considerado os seguintes critérios: facilidade de execução do método, sua rapidez, severidade do método e reprodutibilidade (Pastor-Corrales et al., 1981; Smith et al., 1991; Rezende et al., 2011). Todos

os métodos foram iguais estatisticamente para a variável área da lesão para os dois cultivares avaliados. Entretanto, o método do Furador foi o único que possibilitou a discriminação quanto à área da lesão entre os cultivares nas duas épocas do experimento, além de ter sido o mais rápido, seguro e de simplicidade de execução. Este método também é usado como método padrão para os seguintes patossistemas: Manga e Umbu-Cajá-Fungos Botryosphaeriaceae (Gonçalves et al., 2016), Pistache-*L. americana* e *Neofusicoccum hellenicum* (Chen et al., 2015), Videira-Botryosphaeriaceae (Amponsah et al. 2011; Correia et al. 2016), *Jatropha curcas*-*Lasiodiplodia* (Machado et al. 2014).

Após definir um método de inoculação padrão, buscou-se determinar que variável seria mais apropriada para avaliar os cultivares e acessos de aceroleira quando inoculados com o isolado agressivo de *Lasiodiplodia iraniensis*. A área da lesão é a variável mais precisa e mais utilizada em avaliações de resistência de plantas a doenças, entretanto, o comprimento da lesão é um parâmetro mais fácil e rápido de ser obtido, haja vista que esta variável foi altamente correlacionada com a área da lesão e a maioria das outras variáveis avaliadas no experimento. Outros trabalhos já recomendaram a avaliação da resistência de plantas por meio da avaliação do comprimento de lesões ou a área lesionada, como Chen et al. (2015) para o patossistema Pistache-*L. americana* e *Neofusicoccum hellenicum*; Delgado-Cerrone et al., (2016) para Maçã-*Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum*, *D. intermedia*, *N. luteum*, *D. pseudoseriata*, *N. australe*, *L. theobromae* e Gonçalves et al. (2016), avaliando o comprimento de lesões causadas por vários fungos Botryosphaeriaceae, como *Botryosphaeria mamane*, *Pseudofusicoccum adansoniae*, *P. stromaticum*, *Neofusicoccum parvum*, *N.*

ribis, *L. gonubiensis* e *L. theobromae* em ramos de Umbu-Cajá e frutos de manga.

A avaliação da resistência dos acessos de aceroleira foi realizada com o isolado mais agressivo (*L. iraniensis*), o método de inoculação mais eficiente (método do Furador) e quantificado a variável mais simples de se obter (comprimento das lesões) que apresentou maior correlação com as outras variáveis epidemiológicas analisadas nos experimentos preliminares. Não foi identificado nenhum acesso imune à doença. Porém, foi determinado que os acessos BV 01, ACO 09, ACO 10, ACO 14, UEL 01, Clone 47, Coopama N^o1, Camta, Barbados, BRS Cabocla, Dominga e Flor Branca apresentaram moderada resistência à morte descendente. Um total de 64,7% dos acessos foram classificados como suscetíveis à doença, sendo as suas lesões, em média, 51,3% maiores que as lesões dos cultivares moderadamente resistente.

Nos Estados da Bahia, Ceará, Pernambuco e Paraíba, que respondem por 60% da produção nacional de acerola, os acessos Flor Branca, Okinawa, Junko e BRS Sertaneja são os mais cultivados (Furlaneto & Nasser, 2015; Ritzinger & Ritzinger, 2011; Souza et al., 2013). Dentre estas apenas o acesso Flor Branca se enquadrrou como moderadamente resistente à doença e os acessos BRS Sertaneja e Okinawa esteve entre os que apresentaram as maiores lesões da doença. No estado de São Paulo, o terceiro maior produtor de acerola do Brasil, a cultivar Olivier está entre os dois mais plantados (Furlaneto & Nasser, 2015), sendo este também classificado neste experimento como suscetível à morte descendente.

Na região do Submedio São Francisco, notadamente no polo Petrolina-Juazeiro, a cultivar Junko, classificado como suscetível à morte descendente, é o mais plantado, dentre outro fatores, por ser uma planta produtiva, robusta, de

porte médio, alto teor de vitamina C (superior a $2.500 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) e boa conservação pós-colheita (Souza et al., 2013). Entretanto, a cultivar Flor Branca, também plantado nesta região, mostrou-se moderadamente resistente a essa doença e torna-se uma alternativa para os produtores dessa região que tem problemas com essa doença. Além disso, a Flor Branca apresenta como características positivas a regularidade de produção, boa produção de pólen e alto teor de vitamina C (superior a $1.500 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) (Souza et al., 2013).

Portanto, para essas e outras regiões que apresentarem áreas com epidemias de morte descendente causada por *Lasiodiplodia* spp., a utilização de cultivares mais resistente se torna uma alternativa, como, por exemplo, a cultivar BRS cabocla, que além da resistência horizontal à morte descendente, apresentam boas características agrônômicas, como alto teor de sólidos solúveis (superior a $8,0 \text{ }^\circ\text{Brix}$) e frutos grande, maiores que 10 g (Souza et al., 2013).

Estes resultados destacam a vulnerabilidade fitossanitária da maioria dos clones de acerola cultivados no Brasil. Este fato reforça a necessidade do desenvolvimento de programas de melhoramento para a cultura, notadamente para reduzir os danos causados por doenças que tem como agentes causais fungos da família Botryosphaeriaceae. Apesar de não ter sido encontrado neste estudo acessos de aceroleiras com imunidade à doença, acessos como os BV 01, ACO 09, ACO 10, ACO 14, UEL 01, Clone 47, Coopama N°1, Camta, Barbados, BRS Cabocla, Dominga e Flor Branca, apresentaram resistência horizontal à doença e podem ser usados como fontes de resistência para o desenvolvimento de cultivares de aceroleira.

5.6. Referências

- Alfenas, A.C., Ferreira, F.A., Mafia, R.G., Gonçalves, R.C., 2007. Isolamento de fungos fitopatogênicos. *Métodos em fitopatologia*. Viçosa: Ed. UFV, 53-90.
- Cardoso, J.E., Bezerra, M.A., Viana, F.M.P., Sousa, T.R.M.D., Cysne, A.Q., Farias, F.C., 2009. Ocorrência endofítica de *Lasiodiplodia theobromae* em tecidos de cajueiro e sua transmissão por propágulos. *Summa phytopathologica*, 35(4), 262-266.
- Chen, S., Li, G., Liu, F., Michailides, T.J., 2015. Novel species of Botryosphaeriaceae associated with shoot blight of pistachio. *Mycologia*, 107(4), 780-792.
- Correia, K.C., Silva, M.A., Morais, M.A., Armengol, J., Phillips, A.J.L., Câmara, M.P.S., Michereff S.J., 2016. Phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of table grape in the main Brazilian exporting region. *Plant Pathology*, 65(1), 92-103.
- De Assis, S.A., Fernandes, F.P., Martins, A.B.G., De Faria Oliveira, O.M.M., 2008. Acerola: importance, culture conditions, production and biochemical aspects. *Fruits*, 63(02), 93-101.
- De Paiva, J.R., Alves, R.E., Correa, M.P.F., Freire, F.D.C.O., Sobrinho, R.B., 1999. Seleção massal de acerola em plantio comercial. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34(3), 505-511.
- De Sousa, C.S., De Souza, C.S., Haber, L.L., De Santana, D.G., Arruda, A.S., Takatsu, A., 2003. Método de inoculação de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pelo sistema radicular para avaliação rápida de resistência de repolho a podridão negra. *Bioscience Journal*, 19 (1), 53-56.

- Delgado-Cerrone, L., Mondino-Hintz, P., Alaniz-Ferro, S., 2016. Botryosphaeriaceae species associated with stem canker, die-back and fruit rot on apple in Uruguay. *European Journal of Plant Pathology*, 1-19.
- Farr, D.F., Rossman, A.Y., 2016. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Em: <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/> acessado em 6 de junho de 2016.
- Ferreira, D.F., 2011. Sisvar: Computer statistic analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)*, 35(6), 1039-1042.
- Freire, F.C.O., Cardoso, J.E., 2003. Doenças da aceroleira. In: Freire, F.C.O., Cardoso, J.E., Viana, F.M.P. Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial. *Embrapa Informações Tecnológicas: Brasília*, 59-81.
- Furlaneto, F.P.B., Nasser, M.D., 2015. Panorama da cultura da acerola no estado de São Paulo. *Pesquisa & Tecnologia*, 12(1), 1-6
- Gonçalves, F.J.T., Freire, F.D.C.O, Lima, J.S., Melo, J.G.M., Câmara, M.P.S., 2016. Pathogenicity of endophytic Botryosphaeriaceae species in plants of the Caatinga of Ceará State in mango and *Spondias* sp. *Summa Phytopathologica*, 42(1), 43-52.
- Gonzaga Neto, L., 1999. Melhoramento genético da aceroleira na Embrapa Semi-Árido. *Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro. Petrolina: Embrapa Semiárido*.
- Júnior, A.F.N., Fischer, I.H., Bragança, C.A., Júnior, N.S.M., Amorim, L., 2016. Identification of Botryosphaeriaceae species that cause stylar-end rot of guavas and characterisation of the disease monocycle. *European Journal of Plant Pathology*, 144(2), 271-287.
- Lilly, V.G., Barnett, H.L., 1951. Physiology of the fungi. *McGraw-Hill, New York*.

- Lima, J.S., Alves, E.S., Melo, J.G.M., Moreira, R.C., Martins, M.V.V., Viana, F.M.P., Cardoso, J.E., 2014. Caracterização cultural e patogenicidade de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* em plantas de cajaneira. *Scientia Agraria Paranaensis – SAP*, 13(4), 296-302.
- Lima, J., Moreira, R., Cardoso, J., Martin, M., Viana, F., 2013. Caracterização cultural, morfológica e patogênica de *Lasiodiplodia theobromae* associado a frutíferas tropicais. *Summa Phytopathologica*, 39(2), 81-88.
- Lima, J. S., Cardoso, J. E., Moreira, R. C., Alves, E. S., Melo, J. G. M., 2012. Caracterização cultural de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* e patogenicidade em plantas de aceroleira. *Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas*, 6(1).
- Maciel, C.G., Muniz, M.F.B., Mezzomo, R., Reiniger, L.R.S., 2015. *Lasiodiplodia theobromae* associated with seeds of *Pinus* spp. originated from the northwest of Rio Grande do Sul, Brazil. *Scientia Forestalis*, 43(107), 639-646.
- Marques, M.W., Lima, N.B., de Moraes Jr, M.A., Barbosa, M.A.G., Souza, B.O., Michereff, S.J., et al., 2013. Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. *Fungal Diversity*, 61(1), 181-193.
- Minitab Inc. 2010. Software Minitab 16.1.0. Pennsylvania, US.
- Muñoz Bodnar, A., Gómez, C., Mariel, L., Bernal, A., Szurek, B., López Carrascal, C.E., 2015. Comparing inoculation methods to evaluate the growth of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* on cassava plants. *Acta Biológica Colombiana*, 20(2), 47-55.
- Netto, M.S., Assunção, I.P., Lima, G.S., Marques, M.W., Lima, W.G., Monteiro, J.H., et al., 2014. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. *Fungal Diversity*, 67(1), 127-141.

- Pastor-Corrales, M.A., Beebe, S.E., Correa, F.J., 1982. Comparing 2 inoculation techniques for evaluating resistance in beans to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. In *Proceedings of the fifth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*. [Cali, Colombia]: Centro Internacional de Agricultura Tropical. 16-23.
- Pereira, A.L., Silva, G.S., Ribeiro, V.Q., 2006. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. *Fitopatologia Brasileira*, 31, 572-578.
- Phillips, A.J.L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M.J., Groenewald, J.Z., Crous, P.W., 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, 76, 51-167.
- R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>. 2014.
- Rezende, J.A.M., Massola, N.S., Bedendo, I.P., Krugner, T.L., 2011. Conceito de doença, sintomatologia e diagnose. In: Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, eds. *Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos*. São Paulo: Agronômica Ceres, 1(4). 37-58.
- Ribeiro, I.J.A., 2005. Doenças da mangueira (*Mangifera indica*). In: Kimati, H., Amorim, L., Rezende, J.A.M., Bergamin Filho, A., Camargo, L.E.A., eds. *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. São Paulo: Agronômica Ceres, 2(4), 457-465.
- Ritzinger, R., Kobayashi, A.K., Oliveira, J.R.P., eds, 2003. *A cultura da aceroleira*. Crus das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura.
- Ritzinger, R., Ritzinger, C.H.S.P., 2011. Acerola. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, 32(264), 17-25.

- Saha, A., Mandal, P., Dasgupta, S., Saha, D., 2008. Influence of culture media and environmental factors on mycelial growth and sporulation of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon and Maubl. *Journal of Environmental Biology*, 29(3), 407.
- Silviero, A., Furtado, E.L., Boava, L.P., Barbasso, D.V., Machado, M.A., 2002. Avaliação de métodos de inoculação de *Phytophthora parasitica* em plântulas e plantas jovens de citros. *Fitopatologia Brasileira*, 574-580.
- Smith, G.S., Hutchison, D.J., Henderson, T., 1991. Comparative use of soil infested with chlamydospores to screen for relative susceptibility to *Phytophthora* foot rot in citrus cultivars. *Plant disease*, 75(4), 402-405.
- Souza, F.F., Deon, M., Castro, J.M.C., Rybka, A.C., Freitas, S.T., 2013. Principais variedades de aceroleiras cultivadas no Submédio do Vale do São Francisco. *Embrapa Semiárido-Documentos (INFOTECA-E)*, 255, 1-21.
- Tavares, S.C.C.H., 2002. Epidemiologia e manejo integrado de *Botryodiplodia theobromae* – situação atual no Brasil e no mundo. *Fitopatologia Brasileira*, 27, 46-52.

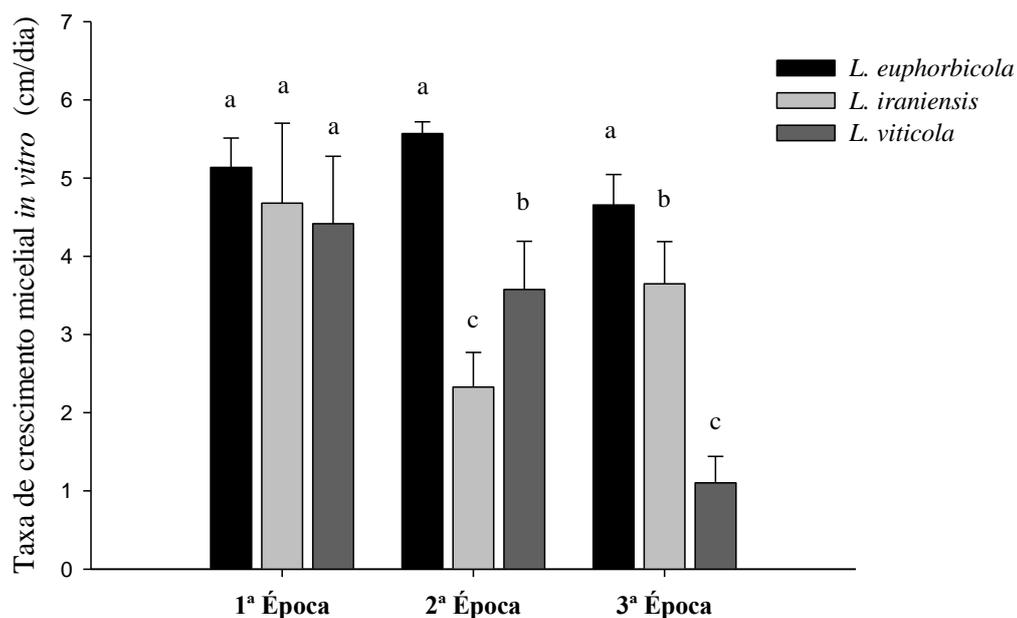


Figura 1 – Taxa de crescimento micelial *in vitro* (cm/dia) de três espécies de *Lasiodiplodia* (*L. euphorbicola*, *L. iraniensis* e *L. viticola*) cultivados sob BDA em câmara tipo BOD com 12h de luz UV próximo e temperatura de 25 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O experimento foi repetido em três épocas.

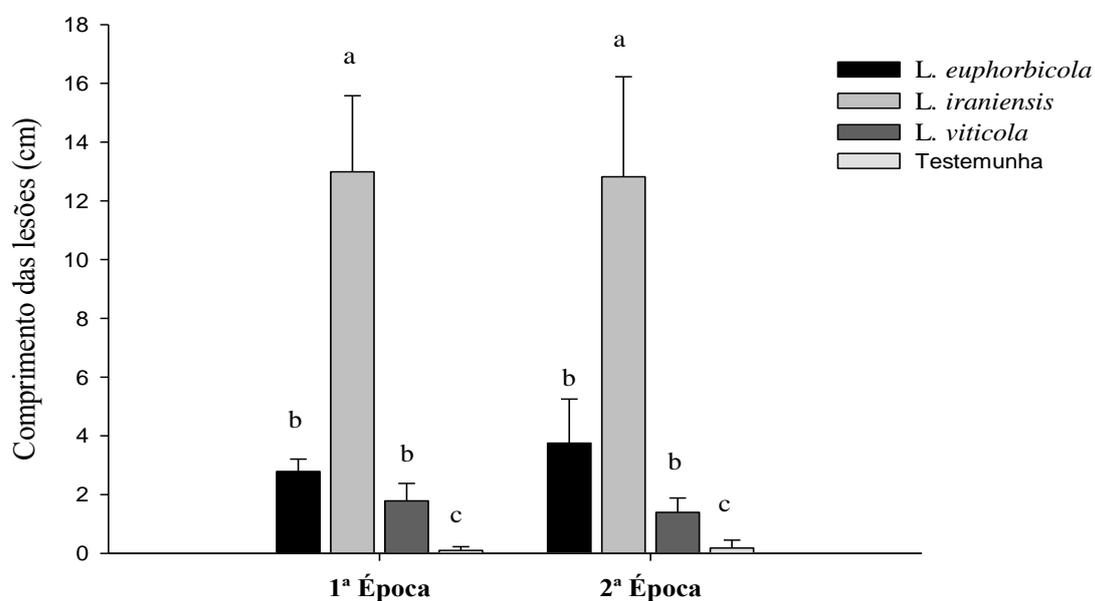


Figura 2 – Comprimento médio das lesões de três espécies de *Lasiodiplodia* (*L. euphorbicola*, *L. iraniensis* e *L. viticola*) em aceroleira cultivar Junko, 30 dias após as inoculações pelo método do Furador. Médias seguidas pela mesma letra em cada época do experimento não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O experimento foi repetido em duas épocas.

Tabela 1 – Área média das lesões (mm²), provocadas por *Lasiodiplodia iraniensis* em mudas de aceroleira (*Malpighia emarginata*) dos cultivares Junko e Okinawa, usando os três métodos de inoculação.

Método de inoculação	Área média das lesões (mm ²)					
	1ª época			2ª época		
	Junko	Okinawa	Média	Junko	Okinawa	Média
Desponte	20,2 bB	238,7 Aa	129,5 A	150,6 aA	515,6 aA	333,0 A
Testemunha	6,2 aBC	9,5 aC	7,9 C	4,8 aB	14,8 aB	9,8 B
Furador	43,9 bA	101,0 aB	72,5 A	81,8 bA	878,8 aA	493,0 A
Testemunha	0,0 aD	1,4 aC	0,7 B	4,2 aB	3,5 aB	3,9 B
Bisel	53,0 aA	171,6 aAB	112,3 A	138,1 aA	603,1 aA	371,0 A
Testemunha	6,9 aCD	3,9 aC	5,4 C	2,4 bB	12,0 aB	7,2 B
Média	21,7 b	87,7 a	-	63,6 b	338,0 a	-
CV (%)	-	-	44,1	-	-	61,3

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, para cada época e método de inoculação, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. CV: Coeficiente de variação.

Tabela 2 – Correlação entre a área (mm²), perímetro (mm), comprimento (mm) e largura (mm) das lesões, provocadas por *Lasiodiplodia iraniensis* em mudas de aceroleira (*Malpighia emarginata*) Junko e Okinawa, usando três métodos de inoculação.

Variável	Área	Perímetro	Comprimento	Largura
Área	1,000**	-	-	-
Perímetro	0,876**	1,000**	-	-
Comprimento	0,962**	0,892**	1,000**	-
Largura	0,520**	0,765**	0,602**	1,000**

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

Tabela 3 – Nível de resistência de acessos de aceroleira à morte descendente causada por *Lasiodiplodia iraniensis*.

Acesso	Comprimento médio das lesões (mm)		Nível de resistência**
	1ª época	2ª época	
BV 01	46,3 aA*	29,0 aA	MR
ACO 09	48,2 aA	47,0 aA	MR
Barbados	51,6 aA	46,4 aA	MR
UEL 01	51,9 aA	30,1 aA	MR
BRS Cabocla	52,1 aA	50,6 aA	MR
ACO 14	52,4 aA	27,9 bA	MR
Dominga	52,7 aA	54,5 aA	MR
ACO 10	55,0 aA	44,5 aA	MR
Clone 47	62,2 aA	49,6 aA	MR
Flor Branca	69,5 aA	45,5 aA	MR
Coopama Nº1	74,0 aA	36,2 bA	MR
Camta	77,9 aA	47,1 aA	MR
Clone 71/2	85,0 aB	47,0 bA	S
ALHA 06	97,2 aB	25,7 bA	S
Junko	99,4 aB	40,6 bA	S
Mineira	56,0 aB	102,4 aC	S
Olivier	85,3 aB	82,7 aB	S
Nikki	93,6 aB	64,3 bB	S
BRS Apodi	96,0 aB	86,9 aB	S
Florida Sweet	99,5 aB	79,2 aB	S
BRS Rubra	100,1 aB	61,9 bB	S
ACO 13	102,5 aB	86,4 bB	S
BRS Roxinha	103,8 aB	81,2 aB	S
BRS Frutacor	109,6 aB	79,5 aB	S
Costa rica	91,8 aB	108,2 aC	S
ACO 15	98,3 aB	99,6 aC	S
Eclipse	99,3 aB	106,0 aC	S
RECI 01	99,5 aB	112,5 aC	S
BRS Cereja	102,4 aB	112,2 aC	S
Valeria	105,5 aB	95,9 aC	S
BRS Sertaneja	108,5 aB	114,3 aC	S
Okinawa	108,8 aB	113,0 aC	S
RECI 02	109,8 aB	99,6 aC	S
IAPAR 01	120,4 aB	110,0 aC	S
MÉDIA	83,6 a	68,6 b	
CV (%)	21,1	26,5	

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Skott-Knott a 5% de probabilidade. CV: Coeficiente de variação. **Nível de resistência dos acessos (MR - Moderadamente resistente; S - Suscetível) obtidos por análise de discriminantes para as duas épocas do experimento.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo representa a primeira pesquisa que adaptou metodologias e formas de avaliação da resistência de aceroleiras à morte descendente causada por fungos da família Botryosphaeriaceae.

A esporulação de fungos desse grupo em folhas de manga e ramos de aceroleira foram igualmente eficientes ao método padrão (acículas de pinus). A importância destes resultados torna-se maior aliado ao fato de que em regiões semiáridas, no Brasil e no mundo, há dificuldades em se obter acículas de pinus, prejudicando os trabalhos taxonômicos com esse importante grupo de fungos.

Também foi padronizado neste estudo uma metodologia eficiente para a inoculação e avaliação da resistência de aceroleira à morte descendente. A comprovação de que o comprimento da lesão é uma variável epidemiológica de fácil obtenção e altamente correlacionada com outras variáveis epidemiológicas tradicionalmente confiáveis, como a área das lesões, associado ao uso do método do Furador tornará rápido e dinâmico a avaliação de populações de aceroleiras, em programas de melhoramento, quanto ao nível de resistência de acessos, ou mesmo na determinação da herança da resistência pela rápida avaliação de populações segregantes.

Além da importância científica, este estudo também representa a primeira pesquisa sobre a resistência das principais cultivares de aceroleira utilizadas no Brasil à morte descendente causada por um isolado agressivo *Lasiodiplodia iraniensis*. Uma resistência do tipo horizontal à morte descendente foi identificada em 12 acessos, como a cultivar BRS Cabocla e Flor Branca. Esses cultivares se tornam uma alternativa para regiões que apresentem epidemias de morte descendente causada por Botryosphaeriaceae e devem ser usadas no programa de melhoramento da aceroleira da Embrapa Semiárido para o desenvolvimento de cultivares resistente a doenças.

7. APÊNDICES

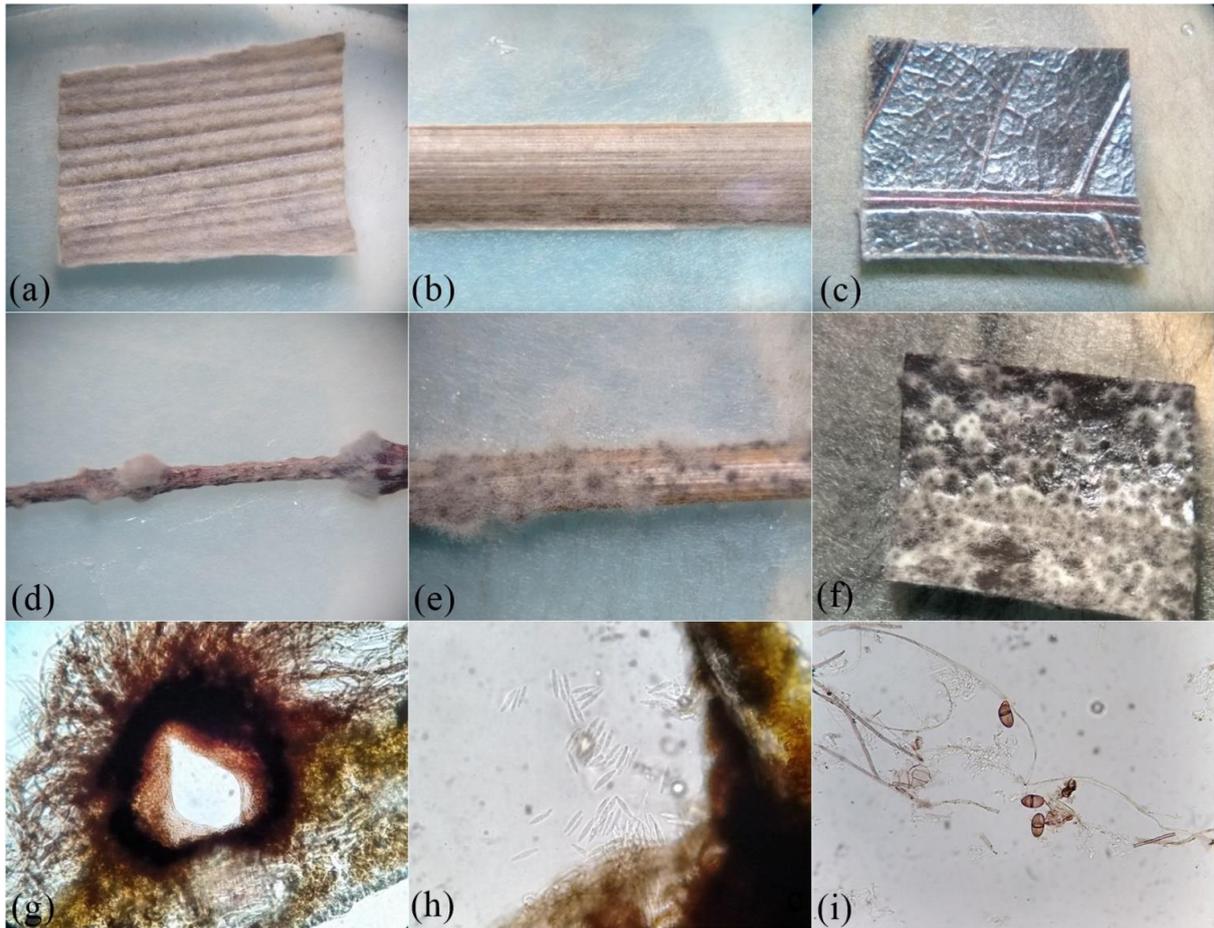


Figura 1 – Experimento de esporulação de fungos do gênero *Lasiodiplodia* e *Botryosphaeria* utilizando diferentes substratos vegetais 30 dias após a montagem. a) Substrato da palha do milho colonizado por *Lasiodiplodia viticola*. b) Nervura central do milho colonizado por *L. euphorbicola*. c) Folha de mangueira colonizada com *L. hormozganensis*. d) Formação de picnídios de *L. hormozganensis* em ramos de Aceroleira. e) Formação de picnídios de *L. iraniensis* em nervura central de milho. f) formação de picnídios de *Botryosphaeria* sp. em folha de mangueira. g) Corte transversal de picnídio de *L. iraniensis*. h) Conídios de *Botryosphaeria* sp.. i) Conídios de *L. iraniensis*.

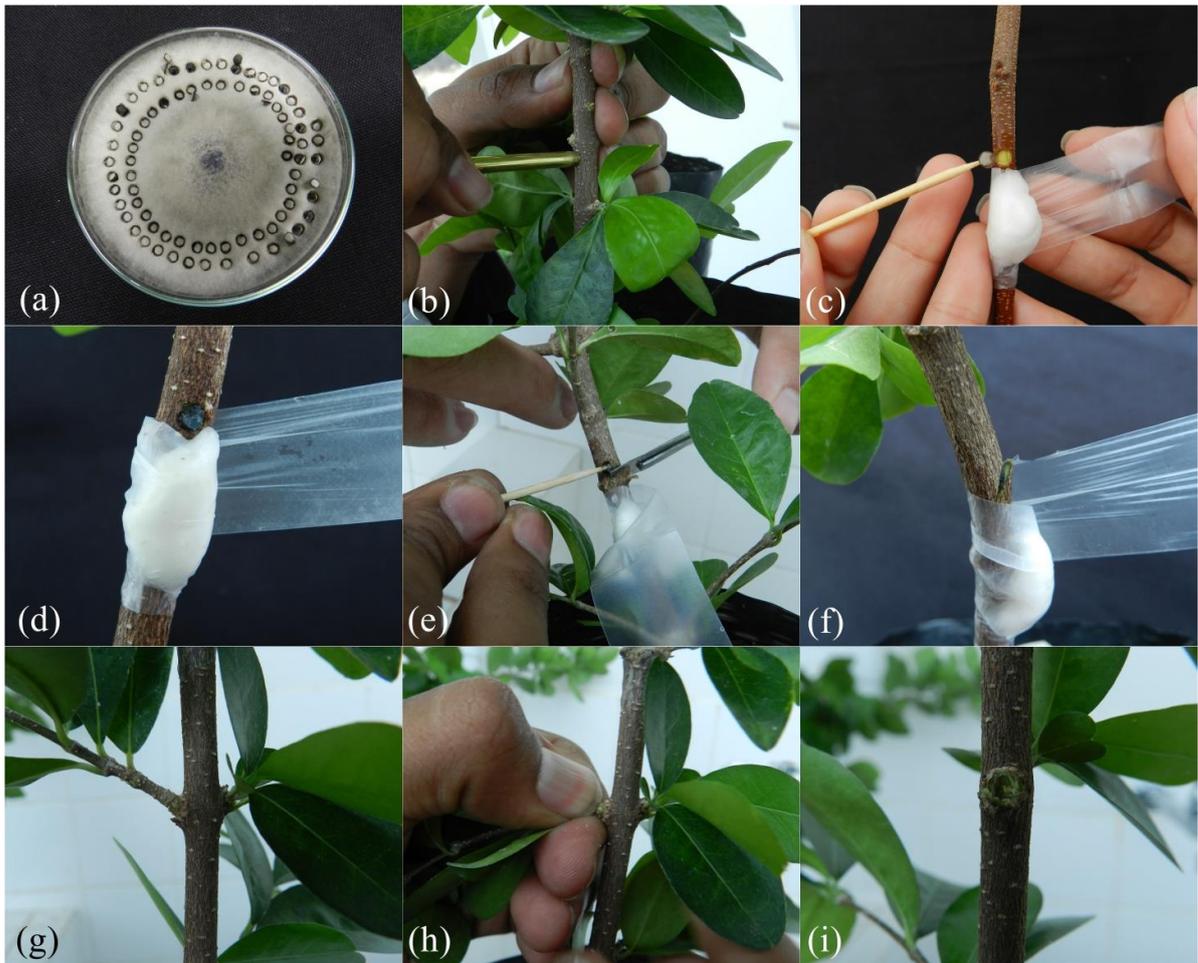


Figura 2 - Experimento de métodos de inoculação em mudas de aceroleira. a) Retiradas de discos de micélio da borda de placas para a inoculação. b-d) inoculação pelo método do Furador. b) Utilização do furador metálico para causar ferimentos em mudas de acerola. c) Inoculação com disco de micélio em ferimento feito por furador. d) Peça de algodão umedecido (com água destilada) colocado abaixo do ferimento e coberto externamente com fita de Parafilm®. e-f) Inoculação pelo método do Bisel. e) Realização do corte em bisel para inoculação. f) Corte em bisel após a inoculação. g-i) Método do Desponte. g) Escolha do ramo para desponte. h) Desponte do ramo escolhido. i) Ferimento após o desponte.

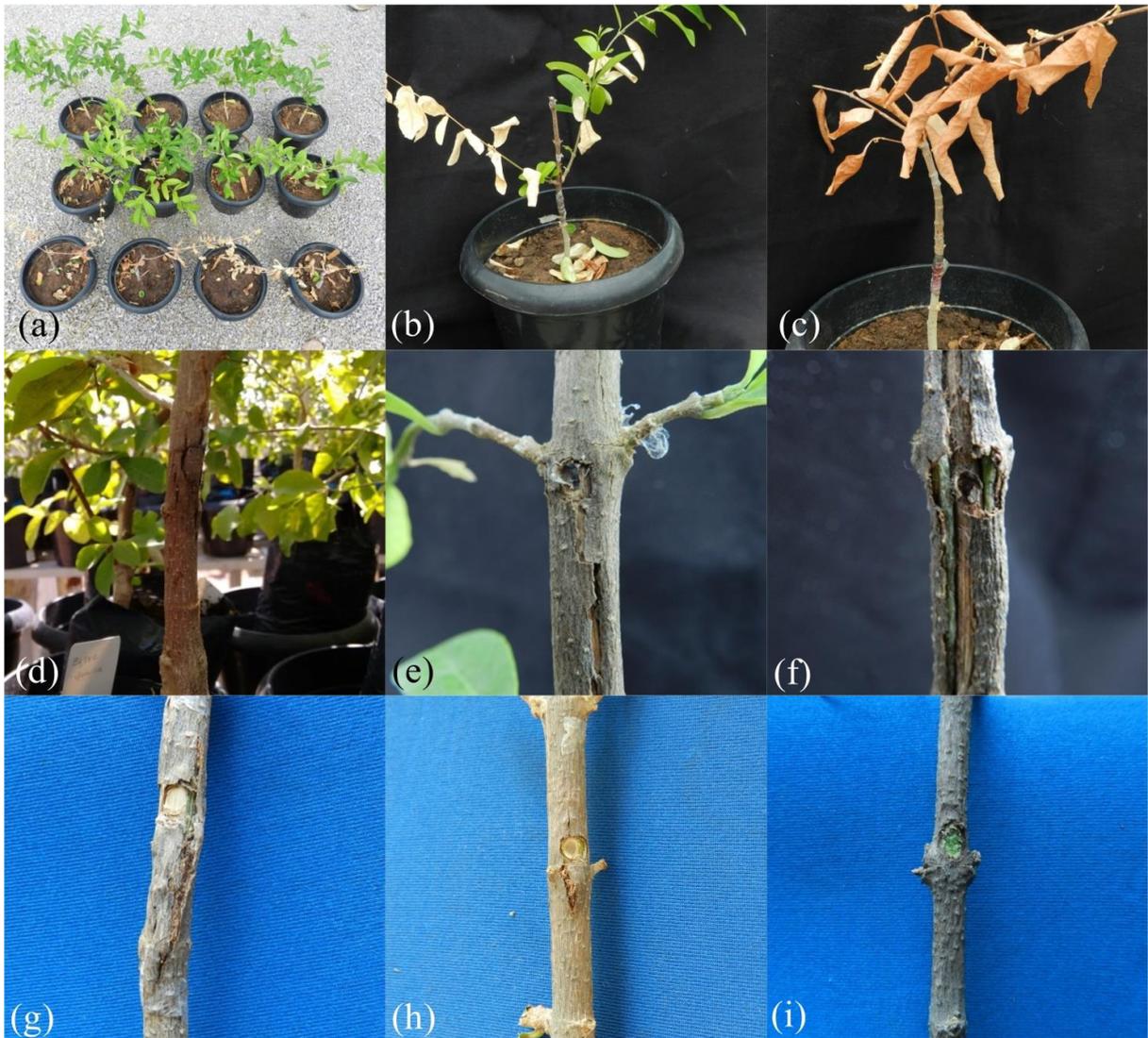


Figura 3 – Experimento de resistência de acessos de aceroleira à reação a *Lasiodiplodia iraniensis*. a) Variabilidade genética entre clones de aceroleira quanto à reação a *Lasiodiplodia iraniensis*. b) Sintoma de morte descendente em mudas de aceroleira. c) Muda de aceroleira morta pela ação de *Lasiodiplodia iraniensis* após 30 dias de inoculação. d-e) Rachadura da casca (fendilhamentos) provocada pelo fungo *Lasiodiplodia iraniensis*. f) Muda de aceroleira iniciado a recuperação do ataque do fungo. g-h) Sintoma de cancro causada por *Lasiodiplodia iraniensis*. i) Cicatrização de mudas de aceroleira moderadamente resiste 30 dias após a inoculação artificial com *Lasiodiplodia iraniensis*.