

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Agrárias
Programa de Pós-graduação em Ciências Florestais

Ruth Monte Alto Souza Aguiar

Lasiodiplodia spp. **associadas a danos em sementes, mudas e árvores de *Caryocar***
brasiliense Camb.

Montes Claros

2023

RUTH MONTE ALTO SOUZA AGUIAR

Lasiodiplodia spp. **ASSOCIADAS A DANOS EM SEMENTES, MUDAS E ÁRVORES
DE *Caryocar brasiliense* Camb.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Ciências Florestais.

Orientadora: Nilza de Lima Pereira Sales

Coorientadora: Letícia Renata Carvalho

Montes Claros

2023

Aguiar, Ruth Monte Alto Souza.

A2831 Lasiodiplodia spp. associadas a danos em sementes, mudas e árvores de Caryocar
2023 brasiliense Camb.[manuscrito] / Ruth Monte Alto Souza Aguiar. Montes Claros, 2023.
95 f.: il.

Dissertação (mestrado) - Área de concentração em Ciências Florestais.
Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientadora: Nilza de Lima Pereira Sales

Banca examinadora: Leandro Silva de Oliveira, André Costa da Silva.

Inclui referências: f. 28-32; 56-60; 79-82.

1. Pequii -- Teses. 2. Viveiros florestais -- Teses. 3. Microrganismos --
Identificação -- Teses. 4. Microrganismos patogênicos -- Teses. I. Sales, Nilza de
Lima Pereira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias.
III. Título.

CDU: 582.81:632

ELABORADA PELA BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA DO ICA/UFGM
Nádia Cristina Oliveira Pires / CRB-6/2781



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 14 dias do mês de setembro do ano de dois mil e vinte e três, às 14:00 horas, sob a Presidência da Professora Nilza de Lima Pereira Sales, D. Sc. (Orientadora – UFMG/ICA) e com a participação dos Professores Leandro Silva de Oliveira, D. Sc. (UFMG/ICA) e André Costa da Silva, D. Sc. (UFRGS), reuniu-se, presencialmente, a Banca de Defesa de Dissertação de Ruth Monte Alto Souza Aguiar, aluna do Curso de Mestrado em Ciências Florestais. Após a avaliação da referida aluna, a Banca Examinadora procedeu à publicação do resultado da defesa da Dissertação intitulada: "*Lasiodiplodia* spp. associadas a danos em sementes, mudas e árvores de *Caryocar brasiliense* Camb.", sendo a aluna considerada aprovada. E, para constar, eu, Professora Nilza de Lima Pereira Sales, Presidente da Banca, lavrei a presente ata que depois de lida e aprovada, será assinada por mim e pelos demais membros da Banca examinadora.

OBS.: A aluna somente receberá o título após cumprir as exigências do ARTIGO 74 do regulamento do Curso de Mestrado em Ciências Florestais, conforme apresentado a seguir:

Art. 74 – Para dar andamento ao processo de efetivação do grau obtido, o candidato deverá, após a aprovação de sua Dissertação e da realização das modificações propostas pela banca examinadora, se houver, encaminhar à secretaria do colegiado do Curso, com a anuência do orientador, no mínimo 3 (três) exemplares impressos e 1 (um) exemplar eletrônico da dissertação, no prazo de 60 (sessenta) dias.

Montes Claros, 14 de setembro de 2023.



Documento assinado eletronicamente por Nilza de Lima Pereira Sales, Professora do Magistério Superior, em 06/10/2023, às 10:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 3º do [Decreto nº 10.343, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Leandro Silva de Oliveira, Professor do Magistério Superior, em 06/10/2023, às 11:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 3º do [Decreto nº 10.343, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Andre Costa da Silva, Usuário Externo, em 06/10/2023, às 12:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 3º do [Decreto nº 10.343, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 2688451 e o código CRC BBC9FE2A.

Dedico aos meus pais, irmãs, marido e filho,
por todo amor, apoio, compreensão e
incentivo para prosseguir.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser minha força e meu guia a todos os momentos da minha vida;

Aos meus pais, Simonete e Valdeir, pelo apoio e incentivo. Por não medirem esforços para a concretização dos meus sonhos;

Às minhas irmãs, Helen e Victória, por toda a amizade e por acreditarem em mim;

Ao meu marido, Danilo, pelo companheirismo, e ao meu filho, Benjamin, por todo amor;

À toda família Mont' Alto, por vibrarem as minhas conquistas;

À tia Iza e tio Wilson, por serem pais ao longo desses sete anos;

À minha orientadora Nilza, por todos os ensinamentos, paciência e amizade, e a minha coorientadora Letícia por todo o apoio acadêmico e pessoal;

Aos meus companheiros de laboratório e amigos, Patrícia, Luiz Pedro, Lin, Cris e Thais por todos os momentos. Sem vocês eu não conseguiria;

Aos amigos que a UFMG me trouxe, Lud, Saulo e Ávila, por todo apoio e amizade;

Ao Lucas Verciane, por toda ajuda com o desenvolvimento do trabalho;

Ao Instituto de Ciências Agrárias da UFMG por toda a infraestrutura cedida e por permitir a realização desse trabalho;

À FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudos;

E a todos que, de alguma, forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

Lasiodiplodia spp. **ASSOCIADAS A DANOS EM SEMENTES, MUDAS E ÁRVORES**
DE *Caryocar brasiliense* Camb.

RESUMO

O *Caryocar brasiliense* Camb. é uma importante frutífera nativa do Cerrado brasileiro, seu fruto é muito utilizado na culinária regional, sendo fonte de renda e alimento para as comunidades tradicionais e extrativistas da região. Tem sido evidenciada a redução de plantas de pequiyeiros em ecossistemas naturais e, dentre vários fatores dessa mortalidade, tem-se a ocorrência de doenças bióticas, como a seca de ponteiros e morte descendente. O patógeno *Lasiodiplodia theobromae* foi identificado, por meio das suas características morfológicas, como agente causador da seca de ponteiros e morte descendente em pequiyeiros no norte de Minas Gerais. Objetivou-se com este estudo identificar os microrganismos associados a doenças bióticas em pequiyeiro de diferentes estádios de desenvolvimento e realizar a caracterização morfocultural e molecular de *Lasiodiplodia* spp. a fim de subsidiar o manejo e a conservação da espécie. No primeiro estudo, foi realizado um diagnóstico de campo, avaliando-se a ocorrência de sintomas de doenças bióticas. Realizaram-se análises laboratoriais para identificação dos agentes bióticos a partir de material vegetal sintomático, isolando os microrganismos e identificando-os. Avaliou-se a sanidade das sementes de *C. brasiliense* e testou-se a patogenicidade de *L. theobromae* em mudas de pequiyeiro. No segundo estudo foi avaliado o índice de velocidade de crescimento micelial, a coloração da colônia e tipo de micélio, além da dimensão dos conídios dos seis isolados de *Lasiodiplodia* spp. cultivados em meio de cultura BDA e MEA. Estudos filogenéticos basearam-se nas sequências das regiões ITS1-5.8S-ITS2 rDNA e na sequência parcial do gene fator de alongação (EF-1 α). Resultados do primeiro estudo evidenciaram que em todos os locais de estudo, observaram-se sintomas de manchas foliares e seca de ponteiros. Os fungos *Pestalotiopsis* sp., *Colletotrichum* sp. e *Lasiodiplodia* sp. tiveram maior frequência nas análises realizadas em laboratório associados aos sintomas de manchas foliares, seca de ponteiros, respectivamente. Constatou-se *Lasiodiplodia* sp. associada às sementes de *C. brasiliense*. O fungo *Lasiodiplodia* spp. se mostrou patogênico ao pequiyeiro. No segundo estudo, verificou-se que os diferentes meios de cultura não influenciaram nos aspectos culturais e morfológicos dos isolados. Os conídios apresentaram dimensões médias de 21,1 $\times$ 12,2 cultivados em BDA e 21,9 $\times$ 12,5 cultivados em MEA. As regiões gênicas utilizadas nas análises filogenéticas não confirmaram, com precisão, a identidade dos isolados.

Palavras-chave: Pequiyeiros; doenças bióticas; seca de ponteiros; viveiro florestal.

Lasiodiplodia spp. **ASSOCIATED WITH DAMAGES IN SEEDS, SEEDLINGS, AND TREES OF *Caryocar brasiliense* Camb.**

ABSTRACT

The *Caryocar brasiliense* Camb. is an important native fruit tree in the Brazilian Cerrado, and its fruit is widely used in regional cuisine, serving as a source of income and food for traditional and extractive communities in the region. The reduction of pequi plants in natural ecosystems has been observed, and among various factors contributing to this mortality, biotic diseases such as shoot blight and downward dieback have been identified. The pathogen *Lasiodiplodia theobromae* was identified through its morphological characteristics as the causative agent of shoot blight and downward dieback in pequi trees in northern Minas Gerais. The objective of this study was to identify microorganisms associated with biotic diseases in pequi trees at different stages of development and to perform the morphocultural and molecular characterization of *Lasiodiplodia* spp. to support the management and conservation of the species. In the first study, a field diagnosis was conducted, assessing the occurrence of symptoms of biotic diseases. Laboratory analyses were performed to identify biotic agents from symptomatic plant material, isolating and identifying the microorganisms. The seed health of *C. brasiliense* was evaluated, and the pathogenicity of *L. theobromae* was tested on pequi seedlings. In the second study, the mycelial growth rate index, colony color, and mycelium type, as well as the dimensions of conidia from six isolates of *Lasiodiplodia* spp., were evaluated when cultivated on BDA and MEA culture media. Phylogenetic studies were based on the sequences of the ITS1-5.8S-ITS2 rDNA regions and the partial sequence of the elongation factor gene (EF-1 α). Results from the first study showed that symptoms of leaf spots and shoot blight were observed at all study sites. The fungi *Pestalotiopsis* sp., *Colletotrichum* sp., and *Lasiodiplodia* sp. were most frequently associated with leaf spot and shoot blight symptoms, respectively. *Lasiodiplodia* sp. was identified in association with *C. brasiliense* seeds, and the fungus *Lasiodiplodia* spp. proved to be pathogenic to pequi trees. In the second study, it was observed that different culture media did not influence the cultural and morphological aspects of the isolates. The conidia had average dimensions of 21.1 $\times$ 12.2 when cultivated on BDA and 21.9 $\times$ 12.5 when cultivated on MEA. The gene regions used in phylogenetic analyses did not accurately confirm the identity of the isolates.

Keywords: Pequi trees; biotic diseases; shoot blight; forest nursery.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Locais de coleta de materiais vegetais de <i>Caryocar brasiliense</i> sintomáticos, localizados nos municípios de Januária, Japonvar e Montes Claros, norte de Minas Gerais.....	35
Figura 2 - Manchas irregulares nos folíolos de mudas e árvores de pequizeiros do norte de Minas Gerais.....	41
Figura 3 - Manchas foliares em mudas e árvores de pequizeiros do norte de Minas Gerais. (A) seca e encarquilhamento das bordas dos folíolos, (B) seca e manchas marrons no folíolo, (C) manchas circulares marrons avermelhadas no folíolo, (D) manchas irregulares nos folíolos, (E) manchas irregulares nos folíolos e pecíolo, (F) manchas circulares marrons avermelhadas no folíolo, (G) manchas enegrecidas nas bordas do folíolo, (H) manchas nos pecíolos.....	42
Figura 4 - <i>Blotter test</i> com pirênios de <i>Caryocar brasiliense</i> Camb. Presença de conidiomas na superfície dos pirênios (setas vermelhas).....	50
Figura 5 - Mudas de <i>Caryocar brasiliense</i> durante o teste de patogenicidade. Mudanças com sintomas de murcha após 7 dias de inoculação (A, B, C). (A) Muda inoculada com isolado LP02; (B) Muda inoculada com isolado LP05; (C) Muda inoculada com isolado LP07; (D) Testemunha sem fermento; (E) Testemunha com fermento.....	52
Figura 6 - Distribuição (por município) dos isolados de <i>Lasiodiplodia</i>	64
Figura 7 - Variabilidade morfológica entre isolados de <i>Lasiodiplodia</i> spp. associados a <i>Caryocar brasiliense</i> . (A) 3 dias após crescimento micelial total da placa (B) 7 dias após crescimento micelial total da placa.....	70
Figura 8 - Conídios imaturos (A) e maduros (B) de <i>Lasiodiplodia</i> spp. isolados de <i>Caryocar brasiliense</i> Camb. Detalhes de coloração marrom escura, septos longitudinais e transversais característicos do patógeno (B).....	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Descrição dos isolados de <i>Lasiodiplodia</i> sp. utilizados no teste de patogenicidade em mudas de <i>Caryocar brasiliense</i> Camb.	39
Quadro 2 - Fungos isolados a partir de sintomas de manchas foliares e seca de ponteiros em mudas e árvores de pequizeiros do norte de Minas Gerais	45
Quadro 3 - Porcentagem de ocorrência de microrganismos associados às sementes de <i>Caryocar brasiliense</i> , com e sem endocarpo, submetidos aos métodos de <i>Blotter</i> e meio Malt Extract Agar, respectivamente.	49
Quadro 4 - Descrição dos isolados de <i>Lasiodiplodia</i> sp. obtidos de pequizeiros no Cerrado do Norte de Minas Gerais	64
Quadro 5 - Iniciadores “primers” selecionados para a identificação da espécie para os estudos filogenéticos	67
Quadro 6 - Características culturais de isolados de <i>Lasiodiplodia</i> spp. em relação à cor da colônia e formação de picnídios nos meios de cultura BDA (Batata-dextrose-agar) e MEA (Agar-extrato-de-malte).....	71
Quadro 7 - Identificação das sequências EF1- α e ITS através da comparação de sequências depositadas no GenBank usando o BLAST	74

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Porcentagem de manchas nas bordas dos folíolos, manchas irregulares e circulares no limbo foliar, manchas nos pecíolos e seca de ponteiros em mudas e árvores jovens de pequizeiros em viveiros e plantio, no norte de Minas Gerais.43

Gráfico 2 - Porcentagem de manchas foliares, seca de ponteiros e plantas mortas de pequizeiros em viveiros e plantio, no norte de Minas Gerais.....44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Índice de velocidade de crescimento micelial (mm/dia) dos isolados de *Lasiodiplodia* sp. cultivados nos meios de cultura BDA (Batata-dextrose-agar) e MEA (Agar-extrato-de-malte)69

Tabela 2 - Medidas de comprimento e largura de conídios de isolados de *Lasiodiplodia* spp. de *Caryocar brasiliense* Camb.....71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDA	Batata-Dextrose-Ágar
BLASTn	Basic Local Alignment Search Tool nucleotide
DNA	Ácido desoxirribonucleico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ITS	Internal transcribed spacer region
IVCM	Índice de velocidade de crescimento micelial
MEA	Malt-extract-agar
PVC	Policloreto de vinila
NCBI	National Center for Biotechnology Information
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossomal
TEF	Transcription elongation factor

LISTA DE NOTAÇÕES OU SÍMBOLOS

α Alfa

β Beta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral.....	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.1 Pequizeiro.....	18
3.2 Importância do pequizeiro	19
3.3 Doenças em pequizeiros	20
3.4 <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	23
3.5 REFERÊNCIAS	26
4 ARTIGOS	31
Artigo 1 – Fungos associados às sementes e sintomas de doenças em mudas e árvores de <i>Caryocar brasiliense</i> Camb. no cerrado no norte de Minas Gerais	31
1 INTRODUÇÃO	34
2 MATERIAIS E MÉTODOS	35
2.1 Coleta de amostras	35
2.2 Análises laboratoriais	38
2.3 Teste de sanidade de sementes.....	38
2.4 Teste de Patogenicidade	39
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
3.1 Sintomatologia em mudas e árvores de pequizeiros	41
3.2 Diagnose em laboratório.....	45
3.3 Sanidade de sementes.....	49
3.4 Patogenicidade de <i>Lasiodiplodia</i> sp.	52
4 CONCLUSÃO	53
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

Artigo 2 – Caracterização cultural, morfológica e molecular de isolados de *Lasiodiplodia* spp. associados a *Caryocar brasiliense* Camb.59

1 INTRODUÇÃO62

2 MATERIAL E MÉTODOS.....63

2.1 Obtenção de isolados e culturas monohifais63

2.2 Caracterização cultural e morfológica dos isolados.....65

2.3 Caracterização molecular67

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO68

3.1 Caracterização cultural e morfológica dos isolados.....68

3.2 Caracterização molecular dos isolados74

4 CONCLUSÃO75

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS77

6 ANEXOS81

Anexo A – Isolados utilizados nas análises filogenéticas.81

Anexo B – Dendrograma filogenético da máxima verossimilhança da região ITS de três isolados de *Lasiodiplodia* spp., juntamente com as sequências de isolados de *Lasiodiplodia* spp. provenientes do GenBank.....87

Anexo C – Dendrograma filogenético da máxima verossimilhança da região TEF de três isolados de *Lasiodiplodia* spp., juntamente com as sequências de isolados de *Lasiodiplodia* spp. provenientes do GenBank.....89

Anexo D – Dendrograma filogenético da máxima verossimilhança das regiões ITS e EF1- α de três isolados de *Lasiodiplodia* spp., juntamente com as sequências de isolados de *Lasiodiplodia* spp. provenientes do GenBank91

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS93

1 INTRODUÇÃO

O *Caryocar brasiliense* Camb., conhecido popularmente como pequi, pertencente à família *Caryocaraceae*, é uma espécie nativa encontrada em todo o cerrado brasileiro (ALMEIDA; SILVA, 1994), sendo eleita a árvore símbolo do Cerrado e do estado de Minas Gerais (MACEDO, 2005; AMBIENTE BRASIL, 2001).

O pequi possui grande importância econômica, social e cultural na região norte mineira, principalmente devido a exploração dos seus frutos que, por meio do seu extrativismo, processamento e comercialização nos mercados, associações e cooperativas, contribuem com a geração de empregos e renda da população local (AFONSO *et al.*, 2014). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2021), a extração de pequi no Brasil, no ano de 2021, foi em torno de 74 mil toneladas, sendo o estado de Minas Gerais responsável por aproximadamente 54% dessa produção.

O pequizeiro, em seu habitat natural, não modificado, é distribuído em agrupamentos mais ou menos densos em meio à vegetação (LORENZI, 2008). Porém, quando este ambiente é degradado, há a possibilidade de aumento na disseminação de doenças (LORENZI, 2008). Na literatura, são citadas como as principais doenças em pequizeiros a podridão de raízes (*Cylindrocladium clavatum* Hodges & L.C. May), a morte descendente e seca de ponteiros (*Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl), a podridão dos frutos (*Lasiodiplodia* sp., *Phomopsis* sp.), a antracnose (*Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds), e o mal-do-cipó (*Phomopsis* sp.) (SANTOS *et al.*, 2013; BARROSO, 2021; LOPES *et al.*, 2006; MACEDO, 2005; JUNQUEIRA *et al.*, 2021).

Alguns estudos demonstraram que vem ocorrendo mortalidade do pequizeiro em diferentes regiões do norte de Minas Gerais (LEITE *et al.*, 2012b), e uma possível redução da população da espécie, fato que tem preocupado extrativistas, pesquisadores, e profissionais de órgãos ambientais (BARROSO, 2021), tais fatores prejudicam as comunidades dependentes dessa espécie. Muitos aspectos parecem estar relacionados à vulnerabilidade do pequizeiro, como a coleta excessiva, que reduz a existência de indivíduos jovens no campo, além da incidência de pragas e

doenças (LEITE *et al.*, 2012b, LEITE *et al.*, 2012a, LEITE *et al.*, 2013, SILVA *et al.*, 2017).

Para a identificação de problemas bióticos, afetando uma comunidade vegetal, é necessária a utilização de metodologias de diagnose que auxiliem nesse levantamento. A diagnose de doenças de plantas é uma importante tarefa para a identificação correta do agente causal e, a realização de um manejo eficaz das doenças. O sucesso de uma estratégia de manejo é definida por fatores que envolvem o conhecimento da planta, das doenças que incidem sobre ela e dos possíveis patógenos envolvidos (SILVEIRA; GRAICHEN, 2012).

Geralmente, as doenças em plantas são diagnosticadas pelos sintomas e sinais dos patógenos nos tecidos do hospedeiro. Em alguns casos, é necessária a realização da diagnose em laboratório, por meio dos isolamentos e caracterização morfológica, e patogênica dos microrganismos. A biotecnologia vem para complementar os métodos convencionais de diagnose, sendo uma excelente ferramenta para o diagnóstico de patógenos que apresentam dificuldades de serem identificados pelos métodos tradicionais, como as espécies crípticas, que são morfológicamente semelhantes, porém são geneticamente distintas. Logo, a combinação das técnicas de biologia molecular com os métodos convencionais é necessária para uma melhor compreensão da diversidade microbiana (BARROCAS *et al.*, 2009; DAS *et al.*, 2014).

Em 2021, um trabalho realizado por Barroso (2021), desenvolvido no laboratório de Patologia Florestal do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG, constatou múltiplos fatores atuando sobre os pequizeiros da Área de proteção ambiental (APA) situada na Bacia do rio Pandeiros, norte de Minas Gerais. Dentre eles, a ocorrência de doenças bióticas, insetos considerados pragas, redução da população jovem e atuação de mudanças climáticas (BARROSO, 2021). Os sintomas mais característicos observados por Barroso (2021) em pequizeiros adultos de ecossistemas naturais foram a seca de ponteiros e morte descendente. O patógeno *L. theobromae* foi identificado, por meio das suas características

morfológicas, e constatado como causador destes sintomas, por meio da comprovação de sua patogenicidade em mudas desta espécie.

Apesar do fungo *Lasiodiplodia theobromae* ser relatado na literatura como causador da seca de ponteiros e morte descendente em pequizeiros, sua identificação foi realizada somente por meio das suas características morfológicas (BARROSO, 2021; REZENDE *et al.*, 2000; JUNQUEIRA *et al.*, 2021). E, por se tratar de uma espécie críptica, são necessárias análises moleculares para verificar, efetivamente, qual ou quais espécies de *Lasiodiplodia* estão causando doenças em pequizeiros.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi realizar um levantamento dos principais sintomas de doenças bióticas ocorrendo em pequizeiros, em diferentes estádios de desenvolvimento e em diferentes locais da região norte mineira. Verificar a ocorrência de *Lasiodiplodia* sp. associada a estes sintomas, comprovar se todos os isolados deste fungo, obtidos dos diferentes materiais vegetais dos pequizeiros, são patogênicos; e realizar a sua identificação, por meio das características morfo-moleculares.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar um levantamento dos principais sintomas de doenças bióticas ocorrendo em pequizeiros em diferentes estádios de desenvolvimento, e verificar a ocorrência do patógeno *Lasiodiplodia* sp. associado a estes sintomas.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar manchas foliares, seca de ponteiros e morte descendente em plantas de pequizeiros;
- Identificar o patógeno *Lasiodiplodia* sp. associado a sintomas de doenças em pequizeiros em diferentes estádios de desenvolvimento;
- Verificar a ocorrência de *Lasiodiplodia* sp. em sementes de pequizeiros;
- Realizar a caracterização cultural, morfológica, molecular e de patogenicidade do fungo *Lasiodiplodia* sp. associado ao pequizeiro.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Pequizeiro

O *Caryocar brasiliense* Camb., conhecido popularmente como pequi, pequiá, piqui, pequiá-bravo, amêndoa-de-espinho, grão-de-cavalo, pequiá-pedra, é uma espécie arbórea nativa do Cerrado brasileiro que pertencente à família *Caryocaraceae* (MACEDO, 2005). O nome *Caryocar* tem origem grega, onde os termos *caryon* (núcleo) e *Kara* (cabeça) referem-se ao formato do fruto e, o termo indígena pequi refere-se à casca espinhenta, alusão aos espinhos presentes no endocarpo do fruto (MACEDO, 2005).

O gênero *Caryocar* abrange 16 espécies, a com maior ocorrência no Brasil é o *C. brasiliense*, entretanto também são encontradas no país as espécies *C. coriaceum*, *C. crenatum* (LOPES *et al.*, 2006). O pequi tem boa adaptabilidade aos diferentes solos e condições de crescimento do Cerrado, ambientando-se bem tanto nos Cerrados densos quanto nos Cerrados ralos (SANTANA; NAVES, 2007; NAVES *et al.*, 2010). Porém, a espécie apresenta maior predominância nas regiões com boa luminosidade, com solos profundos, bem drenados e menos férteis (SANTANA; NAVES, 2007; NAVES *et al.*, 2010). Ocorre em áreas de Cerrado dos estados da Bahia, Ceará, Pará, Maranhão, Distrito Federal, Goiás, Tocantins, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo e, por isso, é considerado a árvore símbolo do Cerrado (MACEDO, 2005).

O pequizeiro é uma planta perene, semidecídua, heliófita, seletiva xerófila que, quando adulta, pode atingir aproximadamente 10 metros de altura (ALMEIDA, SILVA, 1994; SANTOS *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2013). Apresenta tronco tortuoso, com casca rugosa, espessa, acinzentada e áspera (MACEDO, 2005). Suas folhas são opostas, trifolioladas, pilosas e com bordas recortadas (MACEDO, 2005, LOPES *et al.*, 2006; CARVALHO, 2009). As flores são grandes, com pétalas de coloração brancas ou branco-amareladas, e sépalas de coloração verde-amarelada, hermafroditas, com vários estames (LOPES *et al.*, 2006). Apresenta floração nos meses de julho a novembro, com frutificação em novembro, podendo prolongar-se

até o mês fevereiro (ALMEIDA *et al.*, 1998). Sua polinização é realizada por morcegos, mariposas, pássaros, abelhas e vespas (MACEDO, 2005). O pequi é uma drupa, contendo até quatro caroços (putâmens), de coloração verde, depresso-globoso; o exocarpo (casca) verde-amarelado; o mesocarpo (polpa) amarelo-claro, carnoso, rico em óleo e com odor característico; o endocarpo (envoltório da semente) rígido, coberto por uma camada de acúleos; e no interior do endocarpo, a amêndoa (semente) (OLIVEIRA *et al.*, 2008; LOPES *et al.*, 2006).

3.2 Importância do pequizeiro

Dentre as frutíferas nativas do Cerrado, o pequizeiro destaca-se principalmente pela ampla utilização de seus frutos que, devido ao seu sabor, são bastante apreciados e comercializados (VIEIRA *et al.*, 2005). A apreciação de seu fruto pelas populações regionais assegura sua expressão na economia, sociedade e cultura do território norte mineiro (SILVA; TUBALDINI, 2013). O pequizeiro é uma espécie típica do Cerrado, sendo eleito em 2001 como a “Árvore Símbolo do Estado de Minas Gerais” (SANTOS *et al.*, 2004; AMBIENTE BRASIL, 2001). A importância dessa espécie está explícita pela Portaria Federal 54 de 05 de março de 1987 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA (Antigo Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal – IBDF), que impede o corte e comercialização de sua madeira em território nacional (BRASIL, 1987).

A exploração sustentável dessa espécie tem grande potencial, bem como, sua utilização em sistemas agroflorestais, enriquecimento de áreas de Cerrado, recuperação de áreas degradadas e na arborização de pastagens, sendo uma excelente alternativa para combater a degeneração do Cerrado, aumentar a oferta de frutos, reduzir os impactos do extrativismo sem prejudicar o ecossistema (LOPES *et al.*, 2006). Quando se faz a preservação do pequizeiro de forma correta, não somente proibindo o seu corte, mas preservando a espécie e as demais no seu entorno, preserva-se também o Cerrado como um todo (LOPES *et al.*, 2006).

Em época de safra, diversas famílias realizam a coleta de frutos no campo para venda em vilas, beira de estradas, ruas das cidades regionais e de capitais (MACEDO, 2005). A cadeia produtiva desta espécie permite a geração de emprego e renda para milhares de pessoas em diversos municípios (FONSECA *et al.*, 2017). No município de Japonvar, norte de Minas Gerais, a venda de pequi pode ser considerada a principal fonte de renda anual para a população que vive das lavouras e dos frutos nativos (SANTOS *et al.*, 2013). O pequi, considerado como a carne do Cerrado, é fundamental na alimentação, principalmente da população carente, devido ao baixo custo e elevado valor nutricional e proteico (MACEDO, 2005).

O pequizeiro possui ampla utilização, nas indústrias alimentícias os seus frutos, na indústria farmacológica e de cosméticos os seus óleos e vitaminas, e na medicina popular, utilizando suas propriedades antioxidantes, antifúngicas e anti-inflamatórias (SANTOS *et al.*, 2004). A extração de pequi no Brasil no ano de 2021, foi em torno de 74 mil toneladas (IBGE, 2021), sendo o estado de Minas Gerais o maior produtor e consumidor de pequi (LIMA *et al.*, 2007).

Apesar de evidenciar a importância do pequizeiro e de seus frutos, é necessária uma mudança na forma de exploração da espécie. Sua exploração é predominantemente extrativista e pode futuramente gerar a erosão genética, pois devido aos preços, maior parte dos frutos de boa qualidade advinda de genótipos superiores são coletados, impedindo a regeneração natural e a perpetuação da espécie em campo (SANTOS *et al.*, 2004; VIEIRA, PACHECO, LOPES, 2005; SANTOS *et al.*, 2013).

3.3 Doenças em pequizeiros

O pequizeiro, assim como outras espécies nativas do Cerrado, está sujeito, a doenças que podem atingir todas as fases de desenvolvimento da planta, reduzindo sua produtividade (JUNQUEIRA *et al.*, 2021). O *C. brasiliense*, em seu habitat natural, é observado em agrupamentos mais ou menos densos, distribuídos em meio

a vegetação (LORENZI, 2008). Quando esse ambiente é degradado há um aumento no risco de disseminação de doenças nos pequizeiros.

As principais doenças do pequizeiro citadas na literatura são a podridão de raízes (*Cylindrocladium clavatum* Hodges & L.C. May), a morte descendente e seca de ponteiros (*Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl), a podridão dos frutos (*Lasiodiplodia* sp., *Phomopsis* sp.), a antracnose (*Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds), o mal-do-cipó (*Phomopsis* sp.) e a murcha-de-Ceratocystis (*Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halst.) (SANTOS *et al.*, 2013; LOPES *et al.*, 2006; MACEDO, 2005).

A podridão de raízes, causada pelo patógeno *C. clavatum*, é uma doença caracterizada pelo apodrecimento, morte ou retardamento no desenvolvimento da planta (CARVALHO, 2009). Este fungo ataca as raízes das mudas, causando o seu mau desenvolvimento, amarelecimento e queda de folhas. Além da presença de lesões escuras no coleto, seguida do apodrecimento das raízes, resultando na morte da planta (JUNQUEIRA *et al.*, 2021; CARVALHO, 2009). Na literatura são citadas como forma de prevenção da doença, o uso de sacos de polietileno perfurados de forma a evitar o acúmulo de água, o excesso de sombreamento e realizar regas controladas (MACEDO, 2005).

A morte descendente ou seca dos ponteiros, causada pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae*, é uma doença comum em pequizeiros adultos (MACEDO, 2005; SANTOS *et al.*, 2013). Os primeiros sintomas são caracterizados pelas folhas secas, permanecendo assim, por até três meses (CARVALHO, 2009). Nos galhos e ramos novos são observadas rachaduras e lesões escuras, e na casca dos ramos, galhos e troncos afetados, observa-se um tecido escuro e necrosado, iniciando da copa para a base da árvore (MACEDO, 2005; CARVALHO, 2009). O patógeno *L. theobromae* é disseminado principalmente pelo vento, chuva, água de irrigação e inseto, tornando seu controle bastante difícil, além da diversidade de plantas hospedeiras (LIMA *et al.*, 2013). Em um estudo recente realizado na Área de Proteção Ambiental (APA) do rio Pandeiros, no norte de Minas Gerais, constatou-se a mortalidade e redução da população de pequizeiros adultos em decorrência da

seca de ponteiros e morte descendente, entre outros fatores, associados ao patógeno *L. theobromae* (BARROSO, 2021). Como forma de controle, é recomendado cortar e incinerar os galhos secos, e nas extremidades, aplicar sulfato de cobre (1 kg), cal hidratada (4 kg) diluídos em 6 litros de água (MACEDO, 2005; CARVALHO, 2009).

Lasiodiplodia theobromae também é associada à podridão dos frutos de pequizeiros, assim como patógeno *Phomopsis* sp. (CARVALHO, 2009). Doença caracterizada pelo apodrecimento dos frutos antes e após a colheita se inicia com lesões escuras deprimidas ao longo da casca ou região do pedúnculo dos frutos, posteriormente evoluindo para podridão mole e escura, podendo atingir toda a casca do fruto e o endocarpo, sendo capaz de prejudicar o sabor do fruto, tornando-o amargo (MACEDO, 2005; CARVALHO, 2009).

A antracnose, ocasionada pelo fungo *Colletotrichum acutatum*, tem como sintoma principal a presença de lesões irregulares de coloração marrom nos folíolos e lesões escuras na casca dos frutos (ANJOS *et al.*, 2002). A doença é favorecida por alta umidade, tendo maior desenvolvimento em períodos chuvosos e temperatura entre 25 e 30°C (CARVALHO; AMARAL, 2018). Em locais onde não há ocorrência da doença, é considerado que o inóculo primário seja proveniente de mudas contaminadas (CARVALHO; AMARAL, 2018). Já em locais previamente contaminados, o inóculo é o solo e restos culturais, considerando que o fungo consegue sobreviver nessas condições por aproximadamente nove meses (CARVALHO, AMARAL, 2018). Deve-se realizar o controle da doença com a remoção de materiais vegetais contaminados (frutos, flores e folhas) para evitar a disseminação do patógeno (CARVALHO; AMARAL, 2018).

O mal-do-cipó, causado pelos fungos *Phomopsis* sp. e *Cerotelium giacometti* é considerada a mais grave doença do pequizeiro, principalmente por ocorrer tanto em plantas adultas quanto em mudas no viveiro (QUEIROGA *et al.*, 2016). Em mudas, os sintomas são o estiolamento, deformações e lesões nos ramos e folhas mais novas, evoluindo para a seca das mudas e paralisação do crescimento (CARVALHO, 2009). Em plantas adultas, os sintomas caracterizam-se pelo

alongamento dos entrenós do caule (internódios) e estiolamento dos ramos novos, fazendo-os tornar flexíveis, retorcidos e com aspecto de cipó, em alguns casos ocorre dilatação das extremidades dos ramos e escurecimento da casca (MACEDO, 2005). Pode ocorrer, com o tempo, a partir do estiolamento dos ramos, o secamento da planta, sendo possível atingi-la por completo provocando sua morte (CARVALHO, 2009). Como forma de prevenir, é aconselhado evitar a coleta de material vegetal (sementes e galhos para enxertia) com contaminação do patógeno (CARVALHO, 2009). Se caso for observado no viveiro a incidência da doença, recomenda-se a retirada imediata das mudas com sintomas (QUEIROGA *et al.*, 2016; MACEDO, 2005). Para as plantas adultas, recomenda-se a retirada e queima dos galhos afetados, e nos ferimentos, aplicar 4 kg de cal hidratada e 1 kg de sulfato de cobre diluído em 6 litros de água (CARVALHO, 2009).

A murcha-de-Ceratocystis, descrita por Silva *et al.*, (2017), acometendo pequizeiros no município de Montes Claros, norte de Minas Gerais, é uma doença caracterizada inicialmente pelo amarelecimento, escurecimento e murchamento das folhas dos ramos laterais (SILVA *et al.*, 2017). E, quando em estádios avançados, perda da maior parte das folhas e morte da planta (SILVA *et al.*, 2017). Além disso, o xilema lenhoso das árvores afetadas podem apresentar faixas irregulares com lesões escuras (SILVA *et al.*, 2017). Uma das formas de prevenção da doença é a produção de mudas de forma correta, evitando-se o enovelamento das raízes, que facilita a ocorrência da doença (JUNQUEIRA *et al.*, 2021).

Outros patógenos citados na literatura como causadores de doenças em pequizeiros são o fungo *Capillaurem caryovora* gen. sp. nov. associado ao cancro do pequizeiro, ocorrendo em plantas no sul de Minas Gerais (FERREIRA *et al.*, 2019), e o *Chrysosporthe* sp. causando sintomas semelhantes ao *Capillaurem* sp. (JUNQUEIRA *et al.*, 2021).

3.4 *Lasiodiplodia theobromae*

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* (Patouillard) Griffon & Maublanc é um fitopatógeno importante, que infecta cerca de 500 espécies de plantas, causando diferentes sintomas, sendo disseminado em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo (PUNITHALINGAM, 1976; CARDOSO *et al.*, 1998). É um fungo cosmopolita, polígalo e oportunista, com reduzida especialização patogênica (PUNITHALINGAM, 1980 apud LIMA *et al.*, 2013).

Em geral, é associado a processos patogênicos em plantas previamente estressadas, que foram submetidas a processos naturais ou provocados por pragas e práticas culturais (PUNITHALINGAM, 1976; TAVARES *et al.*, 1994). Este fungo demonstra capacidade de colonizar os tecidos da planta sem exibir sintomas de infecção, típico comportamento endofítico (CARDOSO *et al.*, 2009), entretanto com a evolução do fungo da condição de endofitismo para o parasitismo, devido às condições de pressões ambientais, principalmente nas regiões semiáridas (TAVARES, 2002), observa-se o aumento dos sintomas causados por *L. theobromae*.

Este aumento dos sintomas é evidenciado com o crescente relato desse patógeno nas frutíferas tropicais, causando grandes perdas no processo de produção e na pós-colheita, sendo uma ameaça à fruticultura (LIMA *et al.*, 2013). Os tipos e extensões dos danos causados por este fungo, se dão em função do hospedeiro, podendo ser deterioração de sementes, “*damping off*”, murcha, seca, definhamento, formação de cancro em caules de espécies arbóreas e podridão de frutos e raízes (PUNITHALINGAM, 1976).

Este patógeno é associado a vários sintomas em frutíferas, como seca de ponteiros e morte descendente na mangueira (MARQUES *et al.*, 2013), resinose e podridão preta da haste no cajueiro e cajazeiro (LIMA *et al.*, 2014), podridão seca em videira (PEIXINHO *et al.*, 2017), morte descendente na aceroleira (TAVARES, 1995), podridão peduncular no mamoeiro (NETTO *et al.*, 2014), seca-de-ponteiro e morte-descendente no pequiizeiro (BARROSO, 2021; JUNQUEIRA *et al.*, 2021), dentre outras doenças nos citros, bananeira, coqueiro, cacaueiro, cupuaçuzeiro e seringueira (TAVARES, 2002).

Lasiodiplodia sp. se desenvolve em temperaturas entre 25 a 35 °C, podendo causar danos dentro de amplitudes maiores (SULTANA *et al.*, 2018; NETTO *et al.*, 2014). Em meio de cultura, as características morfológicas e a taxa de crescimento micelial de *L. theobromae* são variadas (SANGEETHA *et al.*, 2012). As colônias apresentam coloração variando do branco ao preto, passando por tonalidades de cinza, com micélio ralo ou abundantes e conídios com dimensões variando de 18,10 a 30,94 µm de comprimento e 10,64 a 15,86 µm de largura (SANGEETHA; ANANDAN; RANI, 2012; LIMA *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2014; SULTANA *et al.*, 2018; AHMED *et al.*, 2019). Os conídios são inicialmente hialinos, com paredes finas e assetadas, com formato cilíndrico a subovoide; na maturidade tornam-se marrom-escuros, com paredes espessas, septados e estrias longitudinais irregulares (SANGEETHA *et al.*, 2012; SULTANA *et al.*, 2018; AHMED *et al.*, 2019).

3.5 REFERÊNCIAS

AFONSO, S. R.; ANGELO, A. H.; ALMEIDA A. N. Caracterização da produção de Pequi em Japonvar, MG. **Revista Floresta**, v. 45, n. 1, p. 49-56, 2014.

AHMED, M. Z. *et al.* Molecular characterization of *Lasiodiplodia theobromae* associated with citrus gummosis from major citrus growing areas of Punjab, Pakistan. **JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences**, v. 29, n. 4, 2019.

AMBIENTE BRASIL. **Árvores símbolo de Minas Gerais será conhecida no dia 20 de novembro**. Curitiba: Ambiente Brasil, 2001. Disponível em: <https://noticias.ambientebrasil.com.br/clipping/2001/11/19/2782-arvore-simbolo-de-minas-gerais-sera-conhecida-no-dia-20-de-novembro.html>>. Acesso em: 27 out 2021

ALMEIDA, S. P. *et al.* Cerrado: Espécies vegetais úteis. Planaltina, **EMBRAPA-CPAC**, 1998. 464 p.

ALMEIDA, S. P.; SILVA, J. A. Piqui e buriti: importância alimentar para a população dos cerrados. Palatina, **Embrapa Cerrados-Documents (INFOTECA-E)**, 1994.

ANJOS, J.; CHARCHAR, M. J.; AKIMOTO, A. K. Ocorrência de antracnose causada por *Colletotrichum acutatum* em pequi no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 96-98, 2002.

BARROCAS, E. N. *et al.* Uso de técnicas moleculares para diagnose de patógenos em sementes. Belo Horizonte, **Informe agropecuário**, v. 30, n. 253, p. 24-32, nov./dez. 2009.

BARROSO, P. D. **Redução da população de *Caryocar brasiliense* Camb na APA Pandeiros**. 2021. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) -. Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros – MG, 2021.

BRASIL. **Portaria nº 54, de 05 de Março de 1987**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 13 mar. 1987. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/sophia/cnia/legislacao/IBDF/PT0054-050387.PDF>>. Acesso: 27 out. 2021.

CARDOSO, J. E.; FREIRE, F. C. O.; SÁ, F. T. Disseminação e controle da resinose em troncos de cajueiro decepados para substituição de copa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23, n.1, p.48-50, 1998.

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

CARVALHO, P. E. R. Pequizeiro - *Caryocar brasiliense*. Palatina, **Embrapa Florestas-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2009.

CARVALHO, F.; AMARAL, D. Ocorrência de antracnose em pequizeiro na região do triângulo mineiro, Minas Gerais. **Agrarian Academy**, v. 5, n. 9, 2018.

DAS, S. *et al.* Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v.103, p. 80-100, 2014.

FERREIRA, M. A. *et al.* *Capillaureum caryovora* gen. sp. nov. (Cryphonectriaceae) pathogenic to pequi (*Caryocar brasiliense*) in Brazil. **Mycological Progress**, v. 18, n. 3, p. 385-403, 2019.

FONSECA, G. L.; SANTOS, M. T. P.; ALMEIDA, M. I. S. ASPECTOS ECONÔMICOS DA CADEIA PRODUTIVA DO PEQUI NOS MUNICÍPIOS DA MICRORREGIÃO DE MONTES CLAROS. **Revista Desenvolvimento Social**, v. 21, n. 1, p. 127-141, 2017.

IBGE. **Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura**. Brasília, DF: IBGE, 2021. Disponível em:<<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9105-producao-da-extracao-vegetal-e-da-silvicultura.html>>. Acesso em 19 de Setembro de 2023

JUNQUEIRA N. T. V. *et al.* **Doenças do pequizeiro**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2021.

LEITE, G. L. D. *et al.* Seasonal damage caused by herbivorous insects on *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) trees in the Brazilian savanna. **Revista Colombiana de Entomologia**, v. 38, n. 1, p. 108-113. 2012a.

LEITE, G. L. D. *et al.* Seasonal Abundance of Gallling Insects (Hymenoptera) on *Caryocar brasiliense* (Malpighiales: Caryocaraceae) Trees in the Cerrado. **The Florida Entomologist**, p. 797-809, 2013.

LEITE, G. L. D. *et al.* The mortality of *Caryocar brasiliense* in northern Minas Gerais State, Brazil. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 34, p. 131-137, 2012b.

LIMA, A. *et al.* Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, p. 695-698, 2007.

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

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

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. v. 1, 5. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2008.

LOPES, P. S. N. *et al.* Pequi. In: VIEIRA, R. F.; COSTA, T. S. A.; SILVA, D. B.; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M. **Frutas nativas da região Centro-Oeste**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 320 p.

MACEDO, J. F. **Pequi: do plantio à mesa**. Boletim Técnico, n. 76. Belo Horizonte: EPAMIG, 2005.

MARQUES, M. W. *et al.* Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, v. 61, n. 1, p. 181-193, 2013.

NAVES, R. V. *et al.* **Pequi - Série Frutas Nativas**. Editora FUNEP, Jaboticabal. 2010. 37p.

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

OLIVEIRA, M. E. B. *et al.* Aspectos agronômicos e de qualidade do pequi. Palatina: **Embrapa Agroindústria Tropical-Documentos (INFOTECA-E)**, 2008.

PEIXINHO, G. S.; RIBEIRO, V. G.; AMORIM, E. P. R. Controle da Podridão seca (*Lasiodiplodia theobromae*) em cachos de videira cv. Itália por óleos essenciais e quitosana. **Summa Phytopathologica**, v. 43, p. 26-31, 2017.

PUNITHALINGAM, E. *Botryodiplodia theobromae*. **Description of Pathogenic Fungi and bacteria**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, n. 519, 1976. 3 p.

PUNITHALINGAM, E. **Plant diseases attributed to *Botryodiplodia theobromae***. Vaduz: Pat. J. Cramer, 1980. 123 p

QUEIROGA, V. P. *et al.* **Pequizeiro: Extrativismo na Chapada do Araripe**. Campina Grande:AREPB, 2016. 180f.

REZENDE, D. V. *et al.* Doenças potencialmente importante para o cultivo do pequi no cerrado. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 382, ago. 2000.

SANGEETHA, G.; ANANDAN, A.; RANI, S. U. Morphological and molecular characterisation of *Lasiodiplodia theobromae* from various banana cultivars causing crown rot disease in fruits. **Archives of Phytopathology and Plant protection**, v. 45, n. 4, p. 475-486, 2012.

SANTANA, J. G.; NAVES, R. V. CARACTERIZAÇÃO DE AMBIENTES DE CERRADO COM ALTA DENSIDADE DE PEQUIZEIROS (*Caryocar brasiliense* Camb.) NA REGIÃO SUDESTE DO ESTADO DE GOIÁS. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 33, n. 1, p. 1–10, 2007.

SANTOS, B. R. *et al.* Pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.): uma espécie promissora do cerrado brasileiro. **Boletim Agropecuário da Universidade Federal de Lavras**, Lavras, v. 64, 2004.

SANTOS, F. S. *et al.* A cultura do Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Acta Iguazu**, v.2, n.3, p. 46-57, 2013.

SILVA, A. C. *et al.* First report of *Ceratocystis* wilt caused by *Ceratocystis fimbriata* on *Caryocar brasiliense* trees in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 10, p. 1822-1822, 2017.

SILVA, M. N. S.; TUBALDINI, M. A. S. O ouro do cerrado: a dinâmica do extrativismo do pequi no norte de Minas Gerais. **Revista Georaguaia**, v. 3, n. 2, 2013.

SILVEIRA, R. R; GRAICHEN, F. A. S. AUXÍLIO NA DIAGNOSE DE DOENÇAS DE PLANTAS À COMUNIDADE ACADÊMICA DA UEMS - AQUIDAUANA. **ANAIS DO SEMEX**, v. 5, n. 5, 2012.

SULTANA, R. *et al.* Characterization of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* associated with citrus stem-end rot disease in Bangladesh. **International Journal of Biosciences**. v. 13, n. 5, p. 252-262, 2018.

TAVARES, S. C. H. Doenças da acerola no Brasil. **Petrolina-PE. EMBRAPA/CPATSA**, 1995.

TAVARES, S. C. C. H. Epidemiologia e manejo integrado de *Botryodiplodia theobromae*-situação atual no Brasil e no mundo. In: **Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. Fitopatologia Brasileira, Brasília, DF, v. 27, p. 46-52, ago. 2002.

TAVARES, S. C. C. H.; BARRETO, D. S. B.; AMORIM, L. R. Levantamento do comportamento de *Botryodiplodia theobromae* em videira na região semi-árida. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 13., 1994, Bahia. **Anais**. Salvador: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1994. p. 933-934.

VIEIRA, F. A.; PACHECO, M. V.; LOPES, P. S. N. Método de escarificação de putâmens de *Caryocar brasiliense* Camb. **Revista científica eletrônica de agronomia**, v. 4, 2005.

4 ARTIGOS

Artigo 1 – Fungos associados às sementes e sintomas de doenças em mudas e árvores de *Caryocar brasiliense* Camb. no cerrado no norte de Minas Gerais

Fungos associados às sementes e sintomas de doenças em mudas e árvores de *Caryocar brasiliense* Camb. no cerrado no norte de Minas Gerais

O pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) é uma importante espécie nativa do Cerrado brasileiro, devido à ampla utilização dos seus frutos na culinária regional. Em ecossistemas naturais, tem sido relatado por extrativistas e evidenciada por pesquisadores a redução da população da espécie. Dentre os vários fatores responsáveis pela diminuição das populações de pequi, tem-se a ocorrência de doenças bióticas. O objetivo deste estudo foi realizar um levantamento dos principais sintomas de doenças bióticas ocorrendo em pequis de diferentes estádios de desenvolvimento, verificar a ocorrência de *Lasiodiplodia* sp. associada a estes sintomas e sementes de pequis, e verificar a patogenicidade destes isolados. Para isso, realizou-se o levantamento de sintomas de doenças em dois viveiros e um plantio na região norte de Minas Gerais. Avaliaram-se aproximadamente 150 plantas em cada local de estudo, determinando-se a incidência de manchas foliares e seca de ponteiros. Materiais vegetais com sintomas foram coletados para análises laboratoriais. Realizou-se a análise sanitária das sementes e pirênios, por meio do plaqueamento em MEA e *Blotter test*, respectivamente, e testou-se a patogenicidade de isolados fúngicos em mudas de pequis. Evidenciaram-se que todos os locais apresentavam os sintomas de manchas foliares e seca de ponteiros. As manchas foliares foram predominantes em todos os locais, sendo que 52, 35 e 99% das plantas do viveiro 1, viveiro 2 e plantio apresentaram algum tipo de mancha foliar, respectivamente. A seca de ponteiros ocorreu em cerca de 4, 40 e 16% das plantas avaliadas no viveiro 1, viveiro 2 e plantio, respectivamente. Os fungos *Lasiodiplodia* sp., *Colletotrichum* sp., e *Pestalotiopsis* sp. foram resgatados com maior frequência dos isolamentos de materiais vegetais com sintomas de seca de ponteiros e manchas foliares. Constatou-se a ocorrência de *Lasiodiplodia* sp. nas sementes de pequis e, isolados do fungo se mostrou patogênico ao pequi. Contudo, compreende-se a necessidade de elucidar melhor as formas de transmissão de patógenos do pequi, principalmente de *Lasiodiplodia* sp., a fim de subsidiar o manejo de doenças e a conservação da espécie.

Palavras-chave: Pequi, doenças florestais, manchas foliares, seca de ponteiros.

Fungi associated with seeds and disease symptoms in seedlings and trees of *Caryocar brasiliense* Camb. in the Cerrado in northern Minas Gerais

The pequi tree (*Caryocar brasiliense* Camb.) is an important native species of the Brazilian Cerrado, due to the widespread use of its fruits in regional cuisine. In natural ecosystems, a reduction in the population of this species has been reported by extractivists and highlighted by researchers. Among the various factors responsible for the decline in pequi populations, the occurrence of biotic diseases has been identified. The objective of this study was to survey the main symptoms of biotic diseases occurring in pequi trees at different stages of development, verify the occurrence of *Lasiodiplodia* sp. associated with these symptoms and pequi seeds, and assess the pathogenicity of these isolates. To achieve this, a survey of disease symptoms was conducted in two nurseries and one plantation in the northern region of Minas Gerais. Approximately 150 plants were evaluated at each study site, determining the incidence of leaf spots and shoot blight. Plant materials with symptoms were collected for laboratory analyses. Seed and pyrene health analyses were performed through plating on MEA and Blotter tests, respectively, and the pathogenicity of fungal isolates was tested on pequi seedlings. It was evident that all locations exhibited symptoms of leaf spots and shoot blight. Leaf spots were predominant in all locations, with 52%, 35%, and 99% of plants in nursery 1, nursery 2, and the plantation showing some type of leaf spot, respectively. Shoot blight occurred in approximately 4%, 40%, and 16% of plants evaluated in nursery 1, nursery 2, and the plantation, respectively. The fungi *Lasiodiplodia* sp., *Colletotrichum* sp., and *Pestalotiopsis* sp. were most frequently recovered from isolates of plant materials with symptoms of shoot blight and leaf spots. The occurrence of *Lasiodiplodia* sp. in pequi seeds was confirmed, and isolates of the fungus were found to be pathogenic to pequi. However, there is a need to better understand the transmission methods of pequi pathogens, especially *Lasiodiplodia* sp., to support disease management and species conservation.

Keywords: Pequi, forest diseases, leaf spots, shoot blight.

1. INTRODUÇÃO

O *Caryocar brasiliense* Camb., pertencente à família *Caryocaraceae*, é uma espécie arbórea nativa do Cerrado, que em função dos seus frutos, possui elevada importância econômica, social e cultural (ARAUJO, 1995; SANTOS et al., 2013). O pequizeiro, no norte de Minas Gerais, promove a geração de emprego e renda para as comunidades tradicionais que, por meio do extrativismo, exploram seus frutos (ARAUJO, 1995).

A propagação do pequizeiro é feita majoritariamente de forma seminal, sendo essencial a obtenção de sementes com boa qualidade física, fisiológica e sanitária, para a produção de mudas vigorosas e, posteriormente, plantas saudáveis no campo. Muitos microrganismos podem ser transportados em associação aos tecidos (externos e internos) das sementes florestais, dentre os quais se destacam os fungos (PARISI et al., 2019). Da mesma forma nos viveiros florestais, onde os principais problemas patológicos são causados por fungos.

A detecção e identificação dos fitopatógenos são os procedimentos mais importantes para se definir as medidas de prevenção e controle de doenças em plantas. Uma maior atenção deve ser dada a detecção de patógenos em sementes, plantas matrizes e materiais propagativos, para evitar a introdução dos microrganismos patogênicos em áreas até então não contaminadas (BARROCAS et al., 2009). A elucidação dos mecanismos de transmissão e identificação do inóculo primário de fitopatógenos é imprescindível para selecionar a estratégia de manejo da doença mais adequada (CARDOSO et al., 2009b).

A redução de árvores de pequizeiros nos ecossistemas naturais é um fato que tem preocupado as comunidades tradicionais que têm seu sustento dependente dessa espécie. Vários fatores parecem estar relacionados à mortalidade do pequizeiro (BARROSO, 2021). Doenças como antracnose, mal-do-cipó, seca de ponteiros e morte-descendente têm sido relatadas ocorrendo em árvores e mudas da espécie no norte de Minas Gerais, causadas por diferentes patógenos (LEITE et al., 2012; BARROSO, 2021). O fungo *Lasiodiplodia* sp. foi relatado como causador

da seca-de-ponteiros e morte descendente de pequizeiros na região, sendo um dos fatores responsáveis pela redução das árvores nos ambientes naturais (BARROSO, 2021). Entretanto, não se sabe se este fungo também é responsável por tais sintomas em mudas e árvores, em viveiros e plantios, respectivamente.

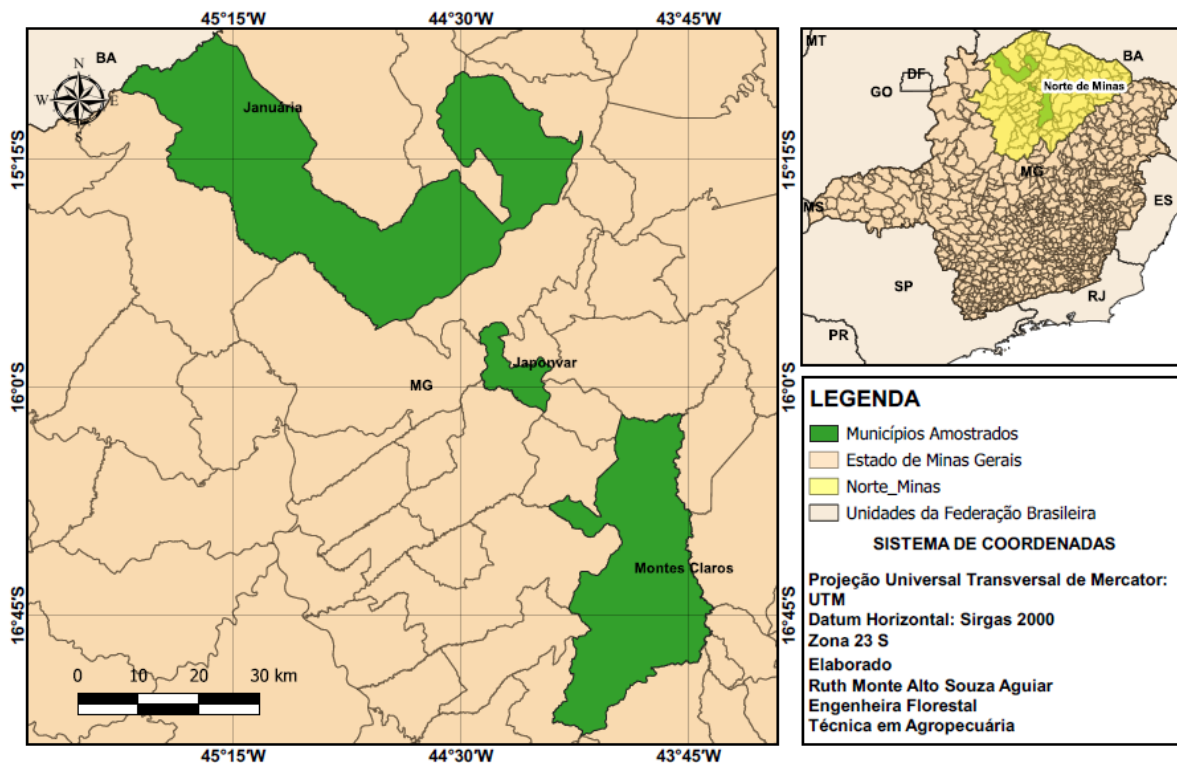
Diante disso, o objetivo deste trabalho foi realizar um levantamento dos sintomas e doenças bióticas ocorrendo nos pequizeiros em diferentes estádios de desenvolvimento e identificar os microrganismos associados; verificar a ocorrência de *Lasiodiplodia* sp. em sementes de pequizeiros e nos diferentes materiais vegetais sintomáticos; e, por fim, confirmar a patogenicidade dos diferentes isolados do fungo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta de amostras

A coleta de materiais de plantas com sintomas de doença foi realizada em dois viveiros de produção de mudas e um plantio de pequizeiro nos municípios de Montes Claros, Januária e Japonvar, respectivamente, situados na região norte do estado de Minas Gerais (FIGURA 1).

Figura 1 - Locais de coleta de materiais vegetais de *Caryocar brasiliense* sintomáticos, localizados nos municípios de Januária, Japonvar e Montes Claros, norte de Minas Gerais.



Fonte: Da autora, 2023.

Em todos os locais foram selecionadas mudas e plantas jovens de pequi analisando-se aspectos fitossanitários como manchas foliares, seca de ponteiros e mortalidade das plantas. Nos viveiros foram selecionadas de forma aleatória aproximadamente 150 mudas para observação dos sintomas, e no plantio foram analisadas todas as 173 plantas.

O viveiro situado no município de Montes Claros, denominado de Viveiro 1, tem sua produção destinada para fins comerciais. Os pirênios utilizados na produção das mudas são oriundos do município de São João da Lagoa, norte de Minas Gerais. No viveiro os pirênios são submetidos a tratamentos para facilitar a germinação, conforme descrito por Mendes (2015). Depois são semeados em sementeiras a pleno sol, preenchidas com solo de ambiente de cerrado, sendo irrigados diariamente. Após emissão da parte aérea, as plântulas são repicadas para sacos plásticos contendo terra de subsolo, e colocadas em bancadas sob sombrite

50% até atingirem idade para comercialização. As mudas são irrigadas diariamente, duas vezes ao dia, por rega manual.

O viveiro do município de Januária, denominado de Viveiro 2, tem sua produção destinada a doações para plantio pela sociedade em geral. Os pirênios utilizados são provenientes dos municípios de Lontra, São João da Ponte, Japonvar e Pandeiros (distrito de Januária). Na área do viveiro, os pirênios são depositados no chão em ambiente aberto, até apresentarem rachaduras no endocarpo, como método para superação de dormência. Depois, os pirênios são semeados em sementeiras, contendo terra de subsolo, onde recebem incidência solar somente num período do dia. Após a emissão da radícula e parte aérea, as plântulas são repicadas para sacos plásticos contendo terra de subsolo, posteriormente, são acondicionadas em bancadas a pleno sol até atingirem idade para sua doação. A irrigação, em todas as etapas de produção, é realizada duas vezes ao dia, pela manhã e ao final da tarde.

O plantio, situado na comunidade de Mangaí, no município de Japonvar, tem por finalidade o consumo e a comercialização dos frutos. Foi implantado há aproximadamente 13 anos atrás, com sementes dos frutos coletados na própria região. Após o despulpamento dos frutos, de acordo com informações da proprietária os pirênios foram amontoados no chão, em ambiente aberto, até começarem a apresentar rachaduras e aspecto de “mofado” (estruturas fúngicas) na sua superfície. Depois foram semeados, por meio de semeadura direta, em covas rasas, em número de cinco pirênios por cova. Não foram realizadas irrigações nem adubações no decorrer do desenvolvimento do plantio.

As sementes analisadas foram coletadas de quatro matrizes situadas em zona rural do município de Montes Claros - MG. Para isso, frutos foram colhidos, após amadurecimento, descascados e despulpados. Os pirênios foram secos à temperatura ambiente e armazenados em sacos plásticos, acondicionados em geladeira ($8 \pm 2^\circ\text{C}$) por 7 dias, até a montagem do teste. Coletaram-se cerca de 150 pirênios.

2.2 Análises laboratoriais

As amostras coletadas e identificadas por local foram separadas de acordo com os sintomas, fotografadas e armazenadas para posteriores análises laboratoriais.

Foram realizados procedimentos de isolamentos diretos e indiretos, conforme descrito por Alfenas e Mafia (2016). Para o isolamento indireto, os fragmentos do material vegetal foram desinfestados com uma solução de álcool 70% por 30 segundos, solução de hipoclorito de sódio a 2% por 2 minutos, e três lavagens com água destilada esterilizada. Os fragmentos foram inoculados em placas de Petri com meio de cultura MEA (Malt Extract Agar), que foram posteriormente acondicionadas em câmara de crescimento com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas, por sete dias.

O isolamento direto foi realizado transferindo-se as estruturas de fungos desenvolvidas sobre os materiais vegetais em câmara úmida, para placas de Petri com o meio de cultura MEA. Após o isolamento as placas foram acondicionadas em câmara de crescimento com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas, por sete dias. Depois do crescimento das culturas e produção de estruturas reprodutivas, procedeu-se a identificação pela morfologia das colônias e caracterização das estruturas formadas por meio de observação de lâminas ao microscópio óptico.

2.3 Teste de sanidade de sementes

Foram analisados, no teste de sanidade, os pirênios (semente + endocarpo) e, apenas sementes de pequiyeiros. Avaliaram-se 48 pirênios pelo método do papel de filtro (*blotter test*), conforme Tempe (1970). Para isso, estes foram desinfestados com álcool 70% por 5 minutos, com hipoclorito de sódio 5% por 15 minutos e, em seguida, lavadas três vezes em água estéril. Em seguida, foram dispostos quatro pirênios por caixa gerbox, contendo três folhas de papel mata borrão esterilizadas e

umedecidas com ágar-água 1% (1g de ágar em 1000 mL de água), conforme metodologia descrita por Sales e Castro (1994). As caixas gerbox com as sementes foram acondicionadas em câmara de crescimento por 14 dias, sob fotoperíodo de 12 horas e temperatura constante de 25°C. Posteriormente, as caixas foram acondicionadas por mais sete dias em temperatura ambiente até o desenvolvimento dos fungos.

Avaliaram-se 52 sementes, pelo método de plaqueamento em meio MEA. agar). Para isso, removeram-se as sementes do interior dos endocarpos utilizando torno manual de bancada, alicate de bico com abertura invertida e chapa na ponta e moto esmeril de bancada, conforme descrito por Mendes (2015). Em seguida, as sementes foram desinfestadas com álcool 70%, por dois minutos, hipoclorito de sódio 5%, por 5 minutos e, em seguida realizou-se tríplice lavagem em água destilada esterilizada. Foram então colocadas em placas de Petri de 13cm de diâmetro, contendo meio MEA e, foram acondicionadas em câmara incubadora por 15 dias, sob fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25°C. Depois do período de incubação, as sementes foram avaliadas sob microscópio estereoscópico e lâminas de vidro foram montadas com as estruturas fúngicas e observadas ao microscópio óptico, sempre que necessário para a identificação dos microrganismos.

2.4 Teste de Patogenicidade

Para testar a patogenicidade, utilizaram-se seis isolados de *Lasiodiplodia* sp. (QUADRO 1), obtidos de sementes, folhas, pecíolos e ramos de plantas de pequizeiros em diferentes estádios de desenvolvimento e que apresentavam sintomas de doenças (manchas foliares, seca de ramos e ponteiros). Para a obtenção do inóculo, os isolados monohifais foram cultivados em placas de Petri contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), incubados a 25°C, fotoperíodo de 12 horas durante 15 dias.

Quadro 1 - Descrição dos isolados de *Lasiodiplodia* sp. utilizados no teste de patogenicidade em mudas de *Caryocar brasiliense* Camb.

Código	Origem	Idade da Planta	Cidade	Local	Sintomas
LP01	Árvores	>30 anos	Bonito de Minas	Ecossistema natural	Seca de ponteiros
LP02	Árvores	13 anos	Japonvar	Plantio	Manchas foliares
LP03	Árvores	>18 anos	Montes Claros	Plantio	Manchas foliares
LP05	Mudas	5 meses	Januária	Viveiro	Seca de ponteiros
LP07	Mudas	4 meses	Montes Claros	Viveiro	Manchas foliares
LP08	Sementes	-	Montes Claros	Ecossistema natural	-

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Para inoculação, foram utilizadas 32 mudas sadias de pequi com cinco meses de idade, depositando-se um disco de micélio do fungo, de aproximadamente 6mm, sobre um corte transversal e superficial de um centímetro de comprimento, realizado com o auxílio de um estilete no caule das mudas, aproximadamente 5 cm acima do coleto. O ferimento e o inóculo foram cobertos com filme de policloreto de vinila (PVC) evitando-se o ressecamento. As testemunhas constituíram-se de mudas sadias com e sem ferimento, inoculadas com discos de meio de cultura estéril, todas envolvidas com filme de PVC, conforme descrito por Barroso (2021).

As mudas foram acondicionadas em câmara úmida, proporcionada pelo molhamento excessivo do ambiente e envolvimento com sacos plásticos, por 72 horas. Após este tempo, as mudas foram mantidas em casa de vegetação do Setor de Silvicultura do ICA/UFMG, por 30 dias. Nesse período foi realizado o acompanhamento diário das plantas para observar o aparecimento de sintomas como murchas, descolorações, manchas nas folhas, secas de ramos e morte das plantas. Após a detecção dos sintomas, os materiais foram colhidos e levados para proceder o reisolamento do fungo em laboratório e a confirmação dos postulados de Koch.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Sintomatologia em mudas e árvores de pequizeiros

Os pequizeiros avaliados em todos os locais de estudo apresentavam manchas marrom-avermelhadas de vários formatos, e lesões marrom-escuras a enegrecidas nas nervuras primárias e secundárias da face abaxial das folhas e nos pecíolos, assim como constatado por Barroso (2021) em pequizeiros de ecossistemas naturais de Cerrado no norte de Minas Gerais. De modo geral, as manchas foliares eram pequenas, que ao coalescer formavam grandes áreas irregulares (FIGURA 2), isso pode afetar a fotossíntese devido a redução da área das folhas ou, pelo desfolhamento prematuro da planta, sendo prejudiciais principalmente no desenvolvimento durante a produção de mudas (ASSIS, 2006; MACIEL et al., 2022).

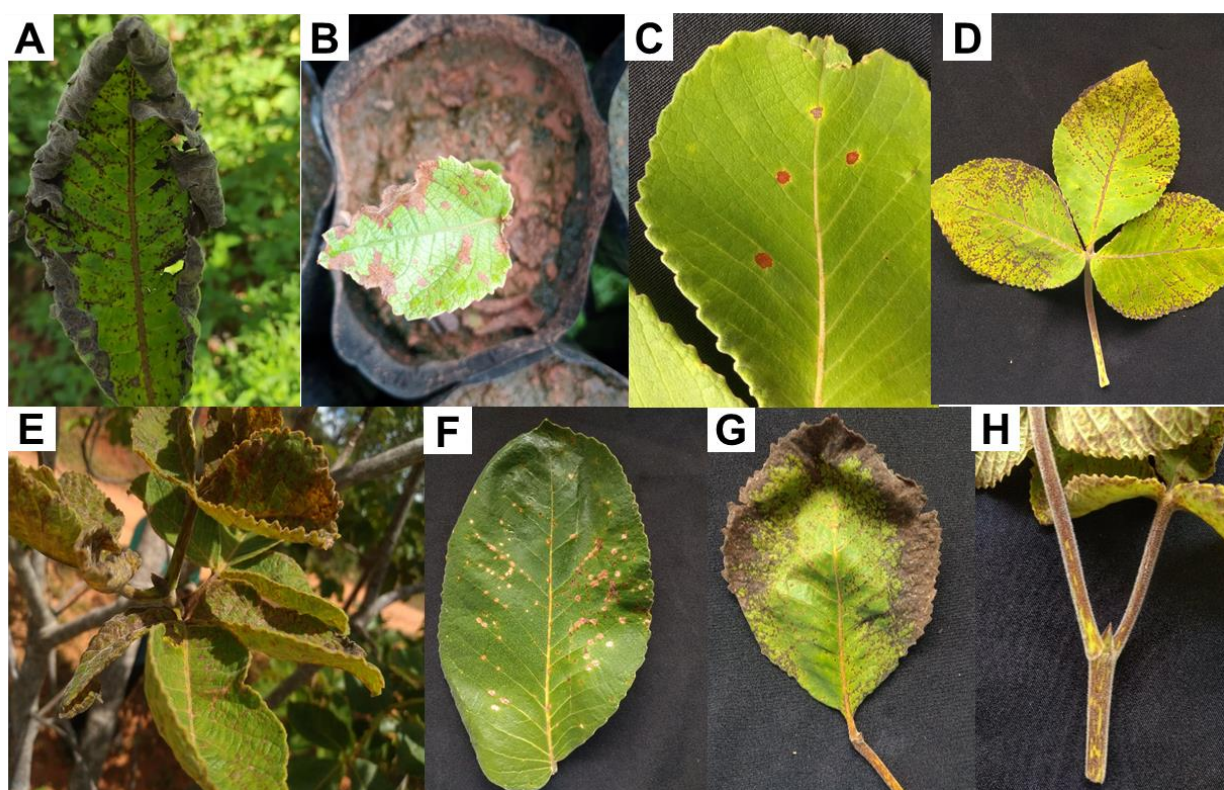
Figura 2 - Manchas irregulares nos folíolos de mudas e árvores de pequizeiros do norte de Minas Gerais.



Fonte: Da autora, 2023

Os sintomas observados foram separados, de acordo com suas características, como manchas nas bordas dos folíolos (FIGURA 3A, 3B, 3G); manchas marrons irregulares (FIGURA 3B, 3D, 3E), manchas circulares e arredondadas, marrom avermelhadas (FIGURA 3C, 3F), manchas nos pecíolos (FIGURA 3H), e seca de ponteiros.

Figura 3 - Manchas foliares em mudas e árvores de pequizeiros do norte de Minas Gerais. (A) seca e encarquilhamento das bordas dos folíolos, (B) seca e manchas marrons no folíolo, (C) manchas circulares marrons avermelhadas no folíolo, (D) manchas irregulares nos folíolos, (E) manchas irregulares nos folíolos e pecíolo, (F) manchas circulares marrons avermelhadas no folíolo, (G) manchas enegrecidas nas bordas do folíolo, (H) manchas nos pecíolos



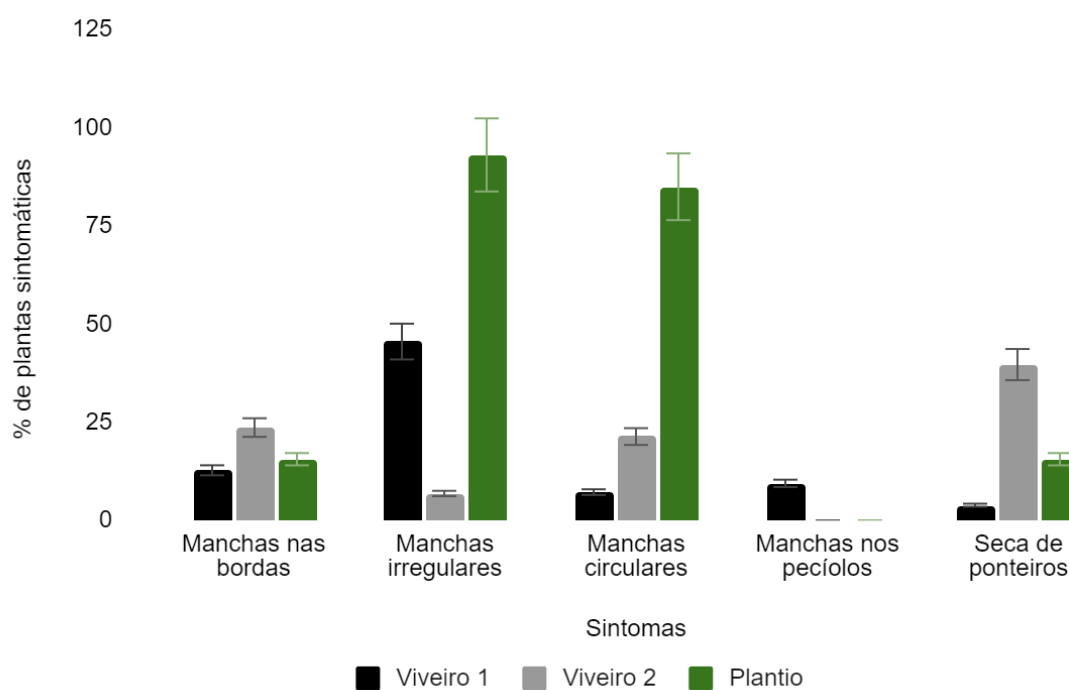
Fonte: Da autora, 2023

As manchas nas bordas dos folíolos, apareceram em aproximadamente, 13, 24 e 16%, das plantas no Viveiro 1 (Montes Claros), Viveiro 2 (Januária) e plantio, respectivamente. As manchas irregulares ocorreram em 46,7 e 93% das plantas, no Viveiro 1, Viveiro 2 e plantio, nesta ordem. Assim como as manchas circulares, que

apareceram mais no plantio (85%), do que nos demais locais de estudo, Viveiro 1 (7%) e Viveiro 2 (21%). O sintoma de manchas no pecíolo foi observado somente no Viveiro 1, em cerca de 9% das plantas (GRÁFICO 1).

A seca de ponteiros também foi evidenciada nos viveiros estudados, sendo 4% no viveiro 1 e 40% no viveiro 2. No plantio, em torno de 16% das plantas apresentavam seca dos ponteiros e em aproximadamente 30% das plantas observou-se o estiolamento dos ramos. O estiolamento e alongamento dos entrenós do pequizeiro são sintomas característicos do mal-do-cipó, doença associada ao patógeno *Phomopsis* sp. que pode ocorrer em árvores no campo e em mudas no viveiro (CARVALHO, 2009).

Gráfico 1 - Porcentagem de manchas nas bordas dos folíolos, manchas irregulares e circulares no limbo foliar, manchas nos pecíolos e seca de ponteiros em mudas e árvores jovens de pequizeiros em viveiros e plantio, no norte de Minas Gerais.



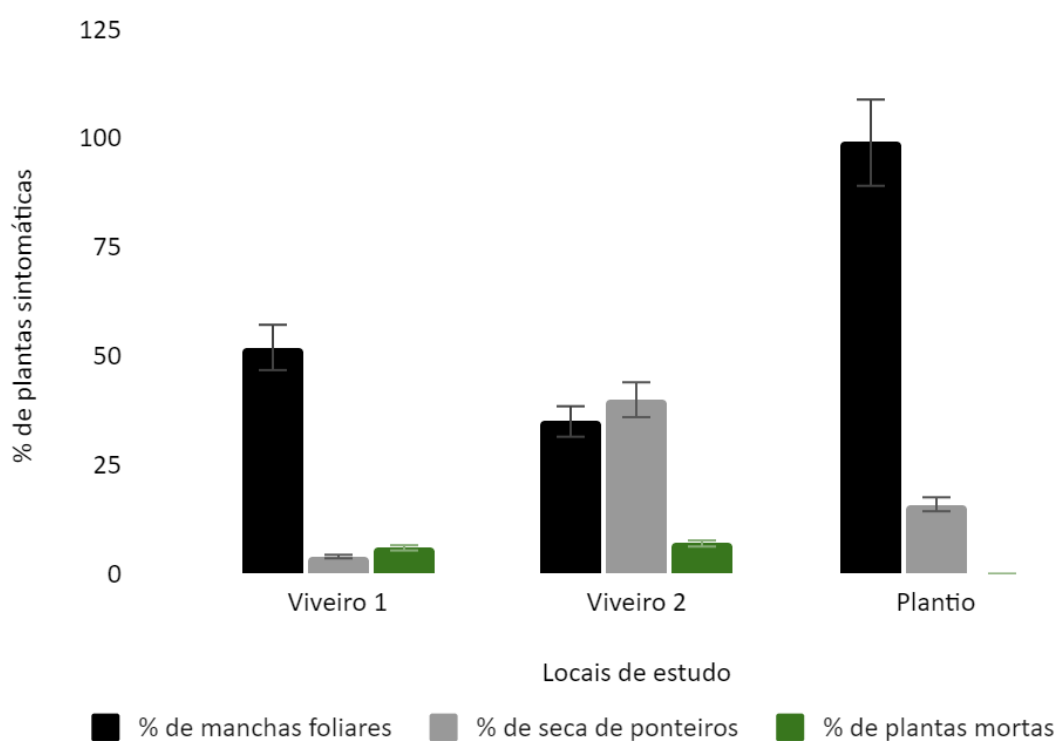
Fonte: Elaborado pela autora, 2023

De modo geral, a proporção de plantas que apresentaram algum tipo de mancha foliar ou nos pecíolos, foi em torno de 52% no viveiro 1, 35% no viveiro 2 e 99% no plantio.

Situação semelhante foi relatada por Barroso (2021), em ecossistemas naturais, onde, árvores jovens apresentaram maior ocorrência de manchas foliares do que árvores mais velhas.

Assim como na avaliação realizada em áreas naturais (BARROSO, 2021), as manchas foliares não apresentaram relação com a seca de ponteiros nas mudas e nas árvores jovens no campo (GRÁFICO 2).

Gráfico 2 - Porcentagem de manchas foliares, seca de ponteiros e plantas mortas de pequizeiros em viveiros e plantio, no norte de Minas Gerais.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

A seca de ponteiros em espécies arbóreas pode ser causada por diversos fatores, sendo fatores bióticos (fungos, bactérias e pragas), déficit nutricionais ou condições climáticas (MARQUES et al., 2013; ARRIEL et al., 2014; LEITE et al., 2014; REIS et al., 2017). Entretanto, no pequizeiro, este sintoma foi associado ao patógeno *L. theobromae*, após a recuperação do fungo dos isolamentos de amostras com sintomas de seca em árvores de ambientes naturais (BARROSO, 2021). Ainda no gráfico 2, é possível observar que a mortalidade das mudas também não se mostrou relacionada aos demais sintomas, podendo estar associada a diferentes fatores bióticos ou abióticos.

3.2 Diagnose em laboratório

Foram identificados, por meio das características morfológicas, 11 gêneros fúngicos isolados de sintomas de manchas foliares, manchas nos pecíolos e seca de ponteiros, conforme descrito no quadro 2.

Quadro 2 - Fungos isolados a partir de sintomas de manchas foliares e seca de ponteiros em mudas e árvores de pequizeiros do norte de Minas Gerais

Local	Sintoma	Tipo de sintoma	Gêneros fúngicos
Viveiro 1	Manchas Foliares	Bordas	<i>Colletotrichum</i> <i>Epicoccum</i> <i>Fusarium</i> <i>Penicillium</i>
		Irregulares	<i>Alternaria</i> <i>Colletotrichum</i> <i>Lasiodiplodia</i> <i>Penicillium</i> <i>Pestalotiopsis</i>
		Circulares	<i>Alternaria</i> <i>Colletotrichum</i> <i>Fusarium</i> <i>Lasiodiplodia</i> <i>Penicillium</i> <i>Pestalotiopsis</i>

Viveiro 2		Pecíolos	<i>Lasiodiplodia</i> <i>Penicillium</i> <i>Phoma</i>
		Seca de ponteiros	<i>Lasiodiplodia</i> <i>Phoma</i>
	Manchas Foliares	Bordas	<i>Aspergillus</i> <i>Colletotrichum</i> <i>Lasiodiplodia</i> <i>Pestalotiopsis</i> <i>Phoma</i>
		Irregulares	<i>Aspergillus</i> <i>Colletotrichum</i> <i>Phoma</i> <i>Phomopsis</i>
		Circulares	<i>Colletotrichum</i> <i>Lasiodiplodia</i> <i>Penicillium</i> <i>Phoma</i> <i>Phomopsis</i>
		Pecíolos	
		Seca de ponteiros	<i>Colletotrichum</i> <i>Lasiodiplodia</i> <i>Phoma</i>
	Plantio	Bordas	<i>Alternaria</i> <i>Aspergillus</i> <i>Bipolaris</i> <i>Fusarium</i> <i>Lasiodiplodia</i> <i>Phomopsis</i>
		Irregulares	<i>Alternaria</i> <i>Lasiodiplodia</i> <i>Pestalotiopsis</i> <i>Phomopsis</i>

	Circulares	<i>Bipolaris</i> <i>Colletotrichum</i> <i>Fusarium</i> <i>Lasiodiplodia</i> <i>Penicillium</i> <i>Pestalotiopsis</i> <i>Phoma</i> <i>Phomopsis</i>
	Pecíolos	
Seca de ponteiros		<i>Alternaria</i> <i>Colletotrichum</i> <i>Lasiodiplodia</i> <i>Pestalotiopsis</i>

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Considerando-se todos os sintomas detectados nos viveiros 1 e 2, os fungos de maior ocorrência foram dos gêneros *Lasiodiplodia* e *Colletotrichum* e no plantio, os gêneros mais incidentes foram *Lasiodiplodia* e *Pestalotiopsis*.

Em todas as repetições do isolamento com material vegetal sintomático de seca dos ponteiros, foi observada a predominância do fungo *Lasiodiplodia theobromae*, identificado morfológicamente, corroborando com Barroso (2021), onde houve a comprovação desse patógeno como causador da seca de ponteiros em pequizeiros. *Lasiodiplodia* é um patógeno que ocorre em várias espécies arbóreas, apresentando diversos sintomas, sendo observados nos diferentes estádios de desenvolvimento da planta, e em frutos e sementes (CARDOSO et al., 2009a; CARDOSO et al., 2009b; LIMA et al., 2013; MARQUES et al., 2013; ROLIM et al., 2022;).

Estudos mostram que *Lasiodiplodia* sp. pode ser disseminado por meios bióticos ou abióticos (CARDOSO; FREIRE; SÁ, 1998; CARDOSO et al., 2009a; CARDOSO et al., 2009b), sendo as mudas contaminadas, consideradas fonte de inóculo primário e as plantas infectadas como fonte secundária (CARDOSO et al., 2010).

Além dos sintomas mais frequentemente encontrados em decorrência desse patógeno, como podridão de raízes (PEIXINHO; RIBEIRO; AMORIM, 2017), morte descendente (MACEDO, 2005), cancrios (PEIXINHO; RIBEIRO; AMORIM, 2017; HUDA-SHAKIRA et al., 2022), gomose (CARDOSO et al., 2004; AHMED et al., 2019) e podridão de frutos (ROSADO et al., 2016), esse patógeno também é causador de manchas foliares em espécie arbórea (ZHU et al., 2014), como observado neste estudo. Frequentemente, constatou-se a presença *Lasiodiplodia* sp. associada às lesões foliares, porém, não se testou sua patogenicidade em folhas de pequizeiros para comprovação do seu comportamento patogênico.

Em cerca de 60% dos isolamentos realizados no laboratório, foi constatada a presença do fungo *Colletotrichum*. Esse patógeno é relatado na literatura como o causador da antracnose em pequizeiro (ANJOS; CHARCHAR; AKIMOTO, 2002), e é uma das principais doenças desse hospedeiro, sendo observada em pequizeiros de diferentes estados brasileiros (ANJOS; CHARCHAR; AKIMOTO, 2002; CARVALHO; AMARAL, 2018; BARROSO, 2021; JUNQUEIRA et al., 2021). A antracnose é caracterizada por lesões marrons escuras de formato irregular nas folhas, aparecendo também nos ramos novos na forma de lesões necróticas escuras (JUNQUEIRA et al., 2021), assim como observado nas mudas e árvores analisadas neste estudo.

No pequizeiro, o fungo *Pestalotiopsis*, é relatado causando manchas foliares em mudas (CARVALHO; ARAUJO, 1994), porém, nos isolamentos realizados nesse estudo, *Pestalotiopsis* foi identificado tanto nos materiais vegetais obtidos de mudas quanto de árvores. Este patógeno é associado a manchas foliares em diversos hospedeiros, como em plantas ornamentais, frutíferas e florestais (SERRA; COELHO, 2007; CARDOSO et al., 2003; SOUZA; SILVA; PEREIRA, 2020).

Phomopsis sp. foi constatado nos isolamentos a partir de materiais vegetais do Viveiro 2 e plantio. Este fungo é relatado como o causador do mal-do-cipó em pequizeiros, atacando árvores e mudas (JUNQUEIRA et al., 2021). Ainda conforme Junqueira et al. (2021), essa doença inicia-se com áreas necróticas nas folhas e brotações novas progredindo para folhas retorcidas e deformadas com crescimento

reduzido e os ramos alongados e estiolados excessivamente. Além do pequi, Charchar, Anjos e Melo (2002) comprovaram a patogenicidade de *Phomopsis* sp. em jatobá (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.), algodão (*Gossypium hirsutum* L.), soja (*Glycine max* L. (Merr.)), café (*Coffea arabica* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.), baru (*Dipteryx alata* Vog.), cagaita (*Eugenia dysenterica* Mart. ex. DC.), mangaba (*Hancornia speciosa* Gomez) e caju-do-campo (*Anacardium humile* Mart.).

Fungos contaminantes dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, o endofítico *Phoma* sp. (POLLI et al., 2013), fungos associados a doenças foliares em espécies arbóreas como *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. (LUCINI; PUTZKE, 2015), *Epicoccum* sp. (BENSO et al., 2020), *Bipolaris* sp. (GONÇALVES; VALLIM; MACEDO, 2022) também foram resgatados nos isolamentos realizados de materiais de todos os locais de estudos, porém, com menor frequência. Entretanto, não se testou a patogenicidade destes fungos para confirmar o seu comportamento patogênico em pequi.

3.3 Sanidade de sementes

Na avaliação sanitária das sementes de pequi, considerando os dois tratamentos (com e sem endocarpo) e os métodos de análise (*Blotter* e MEA), foram detectados gêneros de cinco fungos e um microrganismo desconhecido, semelhante a um actinomiceto (QUADRO 3).

Quadro 3 - Porcentagem de ocorrência de microrganismos associados às sementes de *Caryocar brasiliense*, com e sem endocarpo, submetidos aos métodos de *Blotter* e meio Malt Extract Agar, respectivamente.

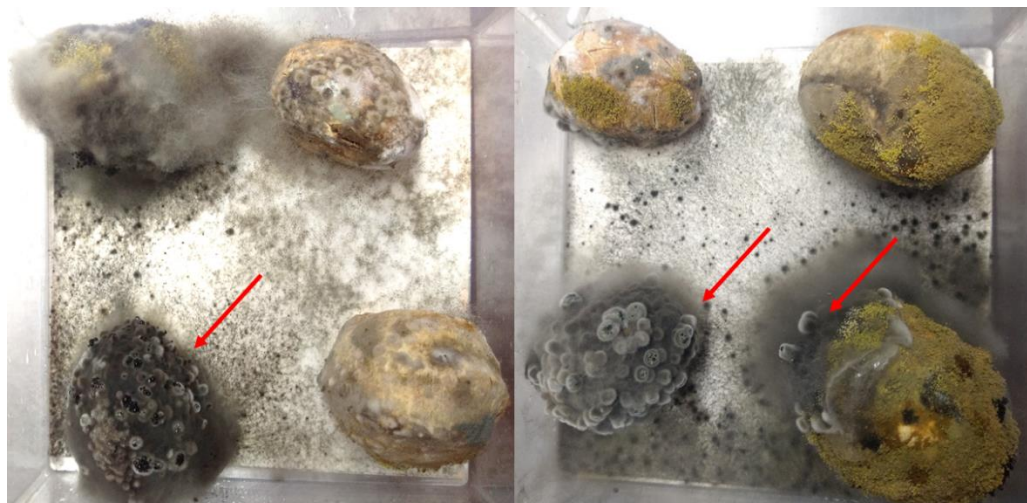
Microrganismos	Semente com endocarpo	Semente sem endocarpo
	<i>Blotter</i>	MEA
<i>Aspergillus</i>	67	88
<i>Lasiodiplodia</i>	69	0
<i>Penicillium</i>	40	8
<i>Trichoderma</i>	23	25
Desconhecido	50	65

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

O gênero *Aspergillus* teve alta incidência nos dois métodos de análise, *Blotter* e MEA, com 67% e 88%, respectivamente. Esse gênero, juntamente com o *Penicillium*, que também ocorreu nas sementes dos dois tratamentos, são fungos de armazenamento, descritos como os principais gêneros de fungos associados a sementes durante o armazenamento em condições inadequadas (NEERGAARD, 1979; DHINGRA, 1985). Tais fungos são encontrados em sementes de espécies florestais (BOTELHO; MORAES; MENTEN, 2008; ARAUJO et al., 2009), normalmente pela contaminação dos frutos quando caem no solo e sua propagação durante o beneficiamento e armazenamento (MAGALHÃES et al., 2008). Ainda conforme os autores, esses fungos comprometem a qualidade fisiológica das sementes, diminuindo sua capacidade germinativa ou levando a morte de embriões. Porém, Oliveira, Davide e Carvalho (2003), avaliando métodos de desinfestação de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert), detectaram que as sementes infectadas por esses fungos não tiveram sua capacidade de germinação afetada.

O fungo *Lasioidiplodia*, também ocorreu com expressiva frequência no *Blotter test*, em 69% das sementes avaliadas (FIGURA 4). Alguns autores relatam a associação patogênica desse fungo em espécies de *Pinus* e *Passiflora*, causando podridão de sementes e *damping-off* (MACIEL et al., 2015; PARISI et al., 2018).

Figura 4 - *Blotter test* com pirênios de *Caryocar brasiliense* Camb. Presença de conidiomas na superfície dos pirênios (setas vermelhas).



Fonte: Da autora, 2023

Cardoso et al. (2009b), avaliando a transmissão de *Lasiodiplodia* sp. em propágulos de cajueiro, expuseram a hipótese da transmissão do patógeno ser via sementes, considerando a incidência da doença, em proporções elevadas, nas árvores em áreas isoladas. No pequizeiro, o fato de o teste de sanidade ter retratado a ocorrência frequente desse patógeno nas sementes reforça essa hipótese, necessitando-se de comprovação da sua transmissão por essa via.

O fungo *Trichoderma*, é comumente encontrado em teste de sanidade de sementes de espécies florestais (OLIVEIRA; DAVIDE; CARVALHO, 2003; LAZAROTTO et al., 2012; MACIEL et al., 2015). Além disso, é utilizado como agente de controle biológico (MEYER et al., 2019). Moura et al. (2022), avaliando o controle biológico de *Trichoderma* sobre a qualidade de sementes de *Astronium urundeuva*, constatou uma maior germinação e vigor de plântulas que haviam sido inoculadas com esse fungo.

Em relação ao microrganismo desconhecido, apresentaram crescimento micelial abundante, inicialmente esbranquiçado até chegar ao cinza-escuro, porém sua identificação não foi possível por não haver crescimento de estruturas que permitissem essa caracterização.

3.4 Patogenicidade de *Lasiodiplodia* sp.

Após 72 horas da inoculação foram observados os primeiros sintomas de murcha das folhas apicais de algumas das repetições inoculadas com os isolados LP02, LP05 e LP07. A sete dias da inoculação, ficaram mais evidentes os aspectos de murcha, necrose do pecíolo e ápice das mudas inoculadas com o isolado LP05 (FIGURA 5). Depois de 10 dias do início do experimento, as mudas inicialmente murchas, se tornaram totalmente secas e quebradiças, com folhas de coloração verde, constatando-se finalmente a morte dessas plantas.

Figura 5 - Mudanças de *Caryocar brasiliense* durante o teste de patogenicidade. Mudanças com sintomas de murcha após 7 dias de inoculação (A, B, C). (A) Muda inoculada com isolado LP02; (B) Muda inoculada com isolado LP05; (C) Muda inoculada com isolado LP07; (D) Testemunha sem ferimento; (E) Testemunha com ferimento.



Fonte: Da autora, 2023.

Apesar de metodologia de inoculação semelhante a usada por Barroso (2021), os sintomas se apresentaram diferentes aos da pesquisa da autora, que conseguiu reproduzir sintomas de seca de ponteiros e morte descendente em todas as repetições de plantas inoculadas com o isolado LP02. No presente estudo, nem todos os isolados e repetições foram capazes de reproduzir sintomas de doenças durante o teste de patogenicidade.

Uma das hipóteses que poderia explicar o fato é que mudas de *Caryocar brasiliense* são produzidas de forma seminal, com sementes provenientes de diferentes matrizes, ocasionando alta variabilidade genética entre elas. Isso poderia ocasionar distintos comportamentos das mudas após a inoculação do patógeno

talvez por diferentes graus de resistência ao patógeno. Mas, novos estudos deverão ser realizados para comprovação do fato.

As testemunhas com e sem ferimento, mais inoculação com disco de meio de cultura estéril, não apresentaram nenhum sintoma ou dano, após 20 dias da inoculação (FIGURA 4). Após 30 dias da inoculação, foi possível confirmar os postulados de Koch, com o reisolamento do patógeno a partir de materiais de plantas com sintomas, que foram inoculadas com os isolados LP02, LP05 e LP07.

4. CONCLUSÃO

Independentemente do estágio de desenvolvimento das plantas, mudas nos viveiros ou árvores jovens no plantio, foram constatados diferentes sintomas de doenças bióticas.

Foram resgatados a partir de materiais de plantas com sintomas e, identificados por meio de características morfológicas, 11 gêneros fúngicos associados a manchas foliares (manchas nas bordas dos folíolos, manchas circulares e irregulares no limbo foliar, e manchas nos pecíolos) e, a secas de ponteiros.

O fungo *Lasiodiplodia* sp. foi resgatado em todos os isolamentos realizados com materiais de origens e sintomas diversos, além, de ser detectado em 70% das sementes de pequizeiros no *Blotter test*.

A metodologia usada permitiu a comprovação de patogenicidade dos isolados LP02, LP05 e LP07, originários de materiais com manchas foliares em árvores jovens no plantio, manchas foliares em mudas no Viveiro 1 e de secas de ponteiros em mudas no Viveiro 2, respectivamente.

O quadro sintomatológico se caracterizou por murcha inicial das folhas, descoloração foliar, seca de folhas, ramos e ponteiros e finalmente, morte das plantas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, M. Z. et al. Molecular characterization of *Lasiodiplodia theobromae* associated with citrus gummosis from major citrus growing areas of Punjab, Pakistan. **JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences**, v. 29, n. 4, 2019.
- ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: Editora UFV. 2 ed., 382p. 2016.
- ANJOS, J.; CHARCHAR, M. J.; AKIMOTO, A. K. Ocorrência de antracnose causada por *Colletotrichum acutatum* em pequiheiro no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 96-98, 2002.
- ARAUJO, A. V. et al. Germinação, vigor e sanidade de sementes de fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.) obtidas de frutos coletados no solo e na planta. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, p. 170-175, 2009.
- ARAUJO, F. D. A review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae): an economically of central Brazilian Cerrados. **Economic Botany**. Bronx, v. 49, p. 40-48, 1995.
- ARRIEL, D. A. A. et al. Wilt and die- back of *Eucalyptus* spp. caused by *Erwinia psidii* in Brazil. **Forest Pathology**, v. 44, n. 4, p. 255-265, 2014.
- ASSIS, L. A. G. **Doenças fúngicas em espécies florestais nativas na Amazônia Central**. 2006. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Florestas Tropicais) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus – AM, 2006
- BARROCAS, E. N. et al. **Uso de técnicas moleculares para diagnose de patógenos em sementes**. Informe agropecuário, Belo Horizonte, v. 30, n. 253, p. 24-32, nov./dez. 2009.
- BARROSO, P. D. **Redução da população de *Caryocar brasiliense* Camb na APA Pandeiros**. 2021. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) -. Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros – MG, 2021.
- BENSO, L. A. et al. Primeiro relato da mancha foliar de *Epicoccum sorghinum* em *Khaya grandifoliola* no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v. 46, p. 273-273, 2020.
- BOTELHO, L. S.; MORAES, M. H. D.; MENTEN, J. O. M. Fungos associados às sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*): incidência, efeito na germinação e transmissão para as plântulas. **Summa phytopathologica**, v. 34, p. 343-348, 2008.

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

CARDOSO, J. E. et al. Interação enxerto e porta-enxerto na incidência da resinose do cajueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 847-854, 2010.

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

CARDOSO, J. E. et al. Relationship between incidence and severity of cashew gummosis in semiarid north- eastern Brazil. **Plant Pathology**, v. 53, n. 3, p. 363-367, 2004.

CARDOSO, J. E. et al. Transmissão de *Lasiodiplodia theobromae*, agente da resinose, em propágulos de cajueiro. **Embrapa Agroindústria Tropical**, 2009b.

CARDOSO, J. E.; FREIRE, F. C. O.; SÁ, F. T. Disseminação e controle da resinose em troncos de cajueiro decepados para substituição de copa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23, n.1, p.48-50, 1998.

CARVALHO, F. J.; AMARAL, D. R. Ocorrência de antracnose em pequizeiro na região do Triângulo Mineiro, Minas Gerais. **Agrarian Academy, Centro Científico Conhecer**, v. 5, n. 9, p. 422-428, 2018.

CARVALHO, P. E. R. Pequizeiro - *Caryocar brasiliense*. **Embrapa Florestas- Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2009.

CARVALHO, Y.; ARAÚJO, L. G. Lesões foliares em mudas de pequizeiro (*Caryocar brasiliensis* Cambess). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, p. 145-149, 1994.

CHARCHAR, M. J. A.; ANJOS, J. R. N.; MELO, J. T. Ocorrência de *Phomopsis* sp. em jatobá no Distrito Federal. Planaltina, DF: **Embrapa Cerrados**, 2002.

DHINGRA, O. D. Prejuízos causados por microorganismos durante o armazenamento de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 71, n.3, p. 139-145, 1985.

FERREIRA, F. A. Patologia Florestal: principais doenças florestais no Brasil. **Embrapa (INFOTECA-E)**, 1989.

GONÇALVES, R. C.; VALLIM, J. H.; MACEDO, P. E. F. Mancha olho de pássaro causada por *Bipolaris heveae* em clones de seringueira no Acre, Brasil. Rio Branco, Acre: **Embrapa Acre**, 2022.

HUDA-SHAKIRAH, A. R. et al. *Lasiodiplodia theobromae* as a causal pathogen of leaf blight, stem canker, and pod rot of *Theobroma cacao* in Malaysia. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 14, 2022.

JUNQUEIRA N. T. V. et al. **Doenças do pequi**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2021.

LAZAROTTO, M. et al. Sanidade, transmissão via semente e patogenicidade de fungos em sementes de *Cedrela fissilis* procedentes da região sul do Brasil. **Ciência Florestal**, v. 22, p. 493-503, 2012.

LEITE, F. P. et al. Manganese accumulation and its relation to " *eucalyptus* shoot blight in the Vale do Rio Doce". **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, p. 193-204, 2014.

LEITE, G. L. D. et al. The mortality of *Caryocar brasiliense* in northern Minas Gerais State, Brazil. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 34, p. 131-137, 2012.

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

LUCINI, F.; PUTZKE, J. Fungos fitopatogênicos em *Handroanthus chrysotrichus* (ipê amarelo–*Bignoniaceae*) cultivadas nos municípios de Santa Cruz do Sul e Venâncio Aires–RS. **Caderno de Pesquisa, série Biologia**, v. 27, n. 1, p. 49-55, 2015.

MACEDO, J. F. **Pequi: do plantio à mesa**. Boletim Técnico, num 76. Belo Horizonte: EPAMIG, 2005.

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**, v. 43, n. 107, p. 639-646, 2015.

MACIEL, C. G. et al. Ocorrência de *Phomopsis* sp. em mudas de *Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch. **Ciência Florestal**, v. 32, p. 1095-1105, 2022.

MAGALHÃES, H. M. et al. Qualidade sanitária de sementes de coquinho-azedo (*Butia capitata*) no Norte de Minas Gerais. **Ciência Rural**, v. 38, p. 2371-2374, 2008

MARQUES, A. S. A. et al. Seca dos ponteiros da goiabeira causada por *Erwinia psidii*: níveis de incidência e aspectos epidemiológicos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, p. 488-493, 2007.

MARQUES, M. W. et al. Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, v. 61, n. 1, p. 181-193, 2013.

MENDES, D. S. T. **Germinação e armazenabilidade de sementes de pequi**. 2015. 72 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Universidade Federal de Minas Gerais. Montes Claros, MG. 2015

MEYER, M. C. et al. **Trichoderma**: Uso na agricultura. Brasília, DF: EMBRAPA, 2019.

MOURA, I. N. B. M. et al. Controle biológico com *Trichoderma* sp. sobre a qualidade de sementes de *Astronium urundeuva* (M. ALLEMÃO) ENGL. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 15, n. 1, p. 113-123, 2022.

NEERGAARD, P. **Seed Pathology**. London: MacMillan Press, 1191p., 1979.

OLIVEIRA, L. M.; DAVIDE, A. C.; CARVALHO, M. L. M. Avaliação de métodos para quebra da dormência e para a desinfestação de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert. **Revista Árvore**, v. 27, p. 597-603, 2003.

PARISI, J. J. et al. Pathogenicity and transmission of fungi detected on *Passiflora alata* seeds. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, 2018.

PARISI, J. J. D. et al. Patologia de sementes florestais: danos, detecção e controle, uma revisão. **Summa Phytopathologica**, v. 45, p. 129-133, 2019.

PEIXINHO, G. S.; RIBEIRO, V. G.; AMORIM, E. P. R. Controle da Podridão seca (*Lasiodiplodia theobromae*) em cachos de videira cv. Itália por óleos essenciais e quitosana. **Summa Phytopathologica**, v. 43, p. 26-31, 2017.

POLLI, A. D. et al. Atividade Antagonística dos Fungos Endofíticos *Phoma* sp. e *Alternaria* sp. Isolados de Folhas de *Sapindus saponaria* contra o fitopatógeno *Fusarium solani*. **BBR- Biochemistry and Biotechnology Reports**. v. 2, n. 3, p. 320-323, 2013.

REIS, G. G. et al. Dieback, leaf area index and yield of young eucalypt clones plantation in the brazilian savannah region. **Revista Árvore**, v. 41, 2017.

ROLIM, J. M. et al. FUNGI OF THE BOTRYOSPHERACEAE FAMILY CAUSE DIFFERENT LEVELS OF STEM CANKER ON PECAN TREES (*Carya illinoensis*) IN BRAZIL. **Revista Árvore**, v. 46, 2022.

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.

SALES, N. L. P.; CASTRO, H. A. Efeito da população fúngica sobre a germinação das sementes e o desenvolvimento inicial de plântulas de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nichols e barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), Lavras, v. 18, n.1, p. 83-89, 1994.

SANTOS, F. S. et al. A cultura do Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Acta Iguazu**, v.2, n.3, p. 46-57, 2013.

SERRA, I. M. R. S.; COELHO, R. S. B. Mancha de pestalotiopsis em helicônia: caracterização da doença e potenciais fontes de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 44-49, 2007.

SOUZA, T. M.; SILVA, D. J. G.; PEREIRA, J. PRIMEIRA OCORRÊNCIA DE *Pestalotiopsis neglecta* CAUSANDO MANCHA FOLIAR EM *Cariniana legalis*. **Semana de Agronomia da UESB (SEAGRUS)-ISSN 2526-8406**, v. 2, n. 1, 2020.

TEMPE, J. **Handbook on seed health testing: routine methods for determining the health condition of seed in the seed testing station**. Proceeding of the International Seed Testing Association. v.35, n. 1, 1970.

ZHU, H. et al. First report of leaf spot of tea oil Camellia (*Camellia oleifera*) caused by *Lasiodiplodia theobromae* in China. **Plant Disease**, v. 98, n. 10, p. 1427-1427, 2014.

Artigo 2 – Caracterização cultural, morfológica e molecular de isolados de *Lasiodiplodia* spp. associados a *Caryocar brasiliense* Camb.

Caracterização cultural, morfológica e molecular de isolados de *Lasiodiplodia* spp. associados a *Caryocar brasiliense* Camb.

RESUMO

Um fungo morfológicamente semelhante a *Lasiodiplodia theobromae* foi comprovado como causador de seca de ponteiros e morte descendente em pequizeiros no cerrado da região norte de Minas Gerais. Porém, pouco se conhece sobre a diversidade de isolados obtidos nas diferentes fases de desenvolvimento da planta. Portanto, o objetivo deste estudo foi realizar a caracterização cultural, morfológica e molecular de isolados de *Lasiodiplodia* spp. obtidos de sementes, mudas e árvores de *Caryocar brasiliense*. O desenvolvimento das colônias, crescimento micelial, coloração, tipo de micélio e dimensão de conídios dos diferentes isolados foram avaliados em dois meios de cultura, BDA e MEA. Estudos filogenéticos basearam-se nas sequências das regiões ITS1-5.8S-ITS2 rDNA e na sequência parcial do gene fator de elongação (EF-1 α). Os diferentes meios de cultura não influenciaram os aspectos culturais e morfológicos dos isolados. As dimensões dos conídios variaram de 15,7 – 25,6 $\times$ 8,6 – 15,3, cultivados em meio de cultura BDA e 14,8 – 27,5 $\times$ 8,9 – 16,3 cultivados em meio de cultura MEA. A análise dos fragmentos dos genes ITS e EF-1 α não foram suficientes para confirmar com precisão a identidade dos isolados de *Lasiodiplodia*, apresentando dualidade de identidade para um mesmo isolado. Estudos adicionais de caracterização são necessários para entender a complexidade da biologia do patógeno e subsidiar estratégias eficientes de manejo da doença e a conservação do pequizeiro.

Palavras-chave: Pequizeiros, seca de ponteiros, *Botryosphaeriaceae*, análises filogenéticas.

Cultural, morphological and molecular characterization of *Lasiodiplodia* spp. isolates associated with *Caryocar brasiliense* Camb.

ABSTRACT

A fungus morphologically similar to *Lasiodiplodia theobromae* has been confirmed as the causative agent of tip dieback and downward death in pequi trees in the Cerrado region of northern Minas Gerais. However, little is known about the diversity of isolates obtained at different stages of plant development. Therefore, the objective of this study was to perform cultural, morphological, and molecular characterization of *Lasiodiplodia* spp. isolates obtained from seeds, seedlings, and trees of *Caryocar brasiliense*. The development of colonies, mycelial growth, color, type of mycelium, and conidial dimensions of the different isolates were evaluated on two culture media, PDA (Potato Dextrose Agar) and MEA (Malt Extract Agar). Phylogenetic studies were based on the sequences of the ITS1-5.8S-ITS2 rDNA regions and the partial sequence of the elongation factor gene (EF-1 α). Different culture media did not influence the cultural and morphological aspects of the isolates. Conidial dimensions ranged from 15.7 to 25.6 $\times$ 8.6 to 15.3 when cultured on PDA and from 14.8 to 27.5 $\times$ 8.9 to 16.3 when cultured on MEA. The analysis of ITS and EF-1 α gene fragments was not sufficient to confirm the identity of *Lasiodiplodia* isolates accurately, showing dual identity for the same isolate. Further characterization studies are needed to understand the complexity of the pathogen's biology and support effective disease management strategies and the conservation of pequi trees.

Keywords: Pequi trees, tip dieback, *Botryosphaeriaceae*, phylogenetic analyses.

1. INTRODUÇÃO

O Pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) é uma espécie nativa do Cerrado com elevada importância na região norte de Minas Gerais, devido principalmente à comercialização dos seus frutos que contribui com a renda das comunidades tradicionais e extrativistas da região. Dentre as doenças citadas na literatura e de ocorrência no pequizeiro, tem-se a morte descendente e seca de ponteiros, que é encontrada com frequência em pequizeiros nativos e cultivados, atacando plantas de todas as idades (JUNQUEIRA et al., 2021). Relatada como sendo causada por *Lasiodiplodia theobromae*, a doença é caracterizada pelo secamento dos ramos novos e das folhas, sentido copa base, progredindo para a morte das plantas, sintoma típico de “dieback” (JUNQUEIRA et al., 2021).

Os fungos pertencentes à ordem *Botryosphaeriales*, como o gênero *Lasiodiplodia*, possuem distribuição mundial com uma ampla gama de hospedeiros (BURGESS et al., 2019). São conhecidos pelas doenças que causam em espécies arbóreas, como patógenos primários ou latentes que residem nos tecidos de hospedeiros assintomáticos (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007). As recentes revisões dos *Botryosphaeriales* constam 11 famílias, 90 gêneros e aproximadamente 6.482 espécies (INDEX FUNGORUM, 2023), sendo a *Botryosphaeriaceae* a maior família dentro dessa ordem (SLIPPERS et al., 2017; INDEX FUNGORUM, 2023).

Espécies da família *Botryosphaeriaceae* são associadas a diversos hospedeiros, atuando como patógenos primários ou secundários, e endofíticos que, quando em condições de estresse da planta hospedeira podem, se tornar patogênicos (PUNITHALINGAM, 1976; SLIPPERS; WINGFIELD, 2007). Muitas espécies dessa família representam complexos de espécies crípticas, ou seja, são morfologicamente semelhantes, porém são geneticamente distintas (PHILLIPS et al., 2013).

Espécies de *Lasiodiplodia* estão presentes em todo o mundo, no Brasil, espécies desse gênero são relatadas ocorrendo em diferentes culturas arbóreas como bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) (NAKASONE et al., 2020); cajaraneira

(*Spondias cytharea* Sonn.) (LIMA et al., 2014), cajazeira (*Spondias mombin* L.), gravioleira (*Annona muricata* L.), umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda) (LIMA et al., 2013), mamoeiro (*Carica papaya* L.) (NETTO et al., 2014), videira (*Vitis* sp.) (PEIXINHO; RIBEIRO; AMORIM, 2017), coqueiro (*Cocos nucifera* L.) (ROSADO et al., 2016), cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) (CARDOSO et al., 2010), mangueira (*Mangifera indica* L.) (MARQUES et al., 2013) e aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.) (LIMA et al., 2012). Atualmente, o gênero possui 85 espécies descritas, com base em dados genéticos e características morfológicas (INDEX FUNGORUM, 2023). Entretanto, a maior parte dessas espécies são consideradas crípticas dentro do complexo *L. theobromae* (ALVES et al., 2008; CRUYWAGEN et al., 2017).

Devido a ocorrência de *Lasiodiplodia* sp. associado a sintomas de doenças em pequizeiros de diferentes estádios de desenvolvimento, e a ampla diversidade genética do fungo, estudos mais detalhados sobre este gênero são necessários para melhor compreensão da sua diversidade populacional, e consequentemente da variabilidade genética dos isolados fitopatogênicos existentes em uma população hospedeira ou região, informações que são importantes para o melhoramento genético da espécie hospedeira e manejo de doenças.

Diante disso, este trabalho objetivou realizar a caracterização cultural, morfológica e molecular de isolados de *Lasiodiplodia* spp. obtidos de sementes, mudas e árvores de *Caryocar brasiliense*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção de isolados e culturas monohifais

Foram obtidos seis isolados de *Lasiodiplodia* sp. a partir de materiais com diferentes sintomas em mudas e árvores. Foram coletados nos municípios de Montes Claros, Januária, Bonito de Minas e Japonvar, todos inseridos na região norte de Minas Gerais, além de sementes (QUADRO 4; FIGURA 6). Os isolamentos foram realizados no Laboratório de Patologia Florestal do Instituto de Ciências

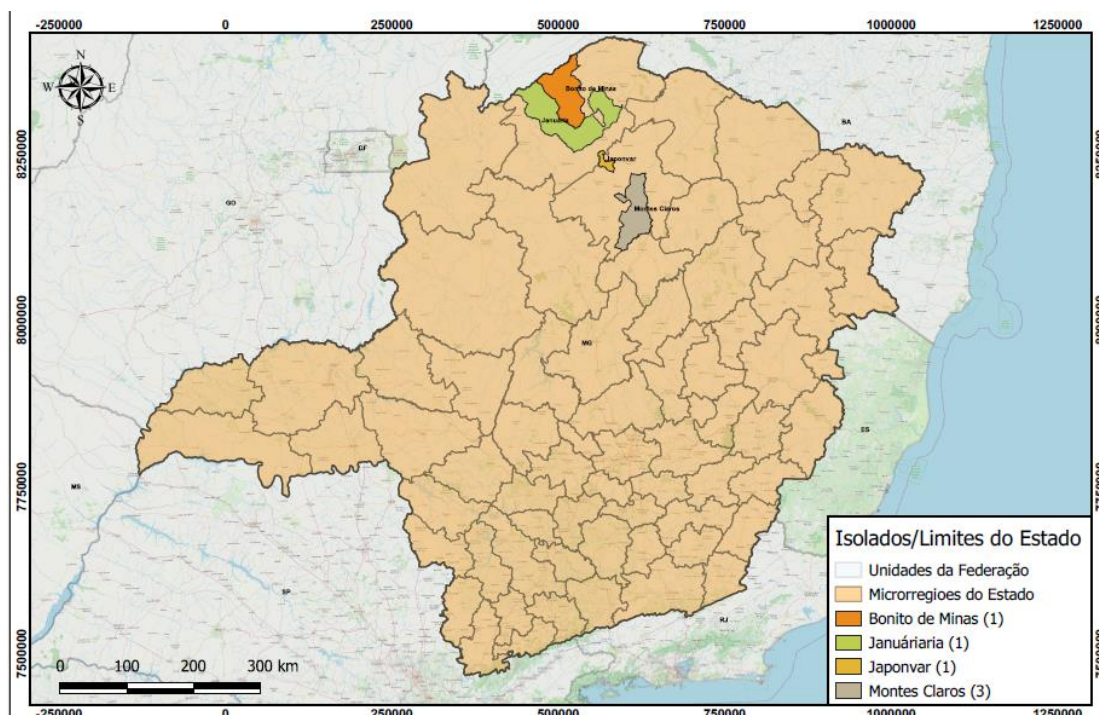
Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo método de isolamento direto ou indireto, conforme Alfenas e Mafia (2016).

Quadro 4 - Descrição dos isolados de *Lasiodiplodia* sp. obtidos de pequizeiros no Cerrado do Norte de Minas Gerais.

Código	Tipo de Hospedeiro	Idade da Planta	Cidade	Local	Sintomas
LP01	Árvores	>30 anos	Bonito de Minas	Ecossistema natural	Seca de ponteiros
LP02	Árvores	13 anos	Japonvar	Plantio	Manchas foliares
LP03	Árvores	>18 anos	Montes Claros	Plantio	Manchas foliares
LP05	Mudas	5 meses	Januária	Viveiro	Seca de ponteiros
LP07	Mudas	4 meses	Montes Claros	Viveiro	Manchas foliares
LP08	Sementes	-	Montes Claros	Ecossistema natural	-

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Figura 6 - Distribuição (por município) dos isolados de *Lasiodiplodia*.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Para obtenção das culturas monohifais, discos de micélio das culturas puras dos isolados foram repicados para placas de Petri contendo meio BDA (39g de Batata-dextrose-agar em 1000 mL de água). Após 24 horas, um segmento individual de hifa foi seccionado, e com auxílio de uma agulha esterilizada, foi transferido para uma nova placa de Petri com meio BDA e acondicionado a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas em câmara de crescimento.

2.2 Caracterização cultural e morfológica dos isolados

Para a caracterização cultural dos isolados, transferiu-se discos de micélio de 5mm de diâmetro, das culturas puras previamente cultivadas, para o centro de placas de Petri contendo o meio de cultura a ser testado, BDA (39g de Batata-dextrose-agar em 1000 mL de água) e MEA (20g de Extrato-Malte-Ágar em 1000mL de água) e, posteriormente, foram incubadas sob fotoperíodo de 12 horas a 25 °C.

Na avaliação do crescimento micelial, foram medidos os diâmetros das colônias com o auxílio de uma régua milimétrica, em dois sentidos perpendiculares, a cada 24 horas. As medições foram finalizadas quando o micélio da colônia cobriu toda a placa, determinando-se a velocidade média de crescimento do fungo (mm/dia). O cálculo de velocidade do crescimento é dado pela fórmula, conforme descrito por Oliveira (1991):

$$IVCM = \frac{\sum(D - Da)}{N}$$

Onde:

IVCM= Índice de velocidade de crescimento micelial;

D= Diâmetro médio atual da colônia;

Da= Diâmetro Médio da Colônia do dia anterior;

N= número de dias após montagem do experimento (repicagem do fungo).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 6×2 (6 isolados versus 2 meios de cultura), com 4 repetições, totalizando 12 tratamentos e 48 parcelas, sendo cada repetição composta por uma placa. Os dados foram submetidos à análise de variância, por meio do software R Studio, comparando-se as médias pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de significância.

Aspectos macromorfológicos como produção de picnídio e coloração da colônia também foram avaliados para a caracterização cultural dos isolados. A produção de picnídios foi analisada por meio da visualização dessas estruturas com auxílio de microscópio estereoscópico, em cada isolado, após 15 dias de cultivo. Para a caracterização da coloração das colônias, utilizou-se a carta de Munsell (2009) como parâmetro, avaliando-se a coloração predominante das colônias de cada isolado 15 dias após a repicagem.

Culturas monohifais dos isolados foram examinadas por meio de microscópio óptico Zeiss Axio Lab A.1 associado ao programa computacional para análises

morfométricas das estruturas por meio das imagens. As dimensões dos conídios (largura e comprimento) foram medidas após 35 dias de cultivo, em 30 repetições.

2.3 Caracterização molecular

A extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) dos isolados fúngicos, a amplificação, o sequenciamento e as análises filogenéticas foram realizadas por um laboratório especializado. Para a identificação dos isolados foi realizada a amplificação e o sequenciamento das regiões “internal transcribed spacer region” (ITS) e fator de alongação (TEF1- α) (QUADRO 5).

Quadro 5 - Iniciadores “primers” selecionados para a identificação da espécie para os estudos filogenéticos

Região gênica	Primer	Sequência	Sentido	Temperatura e tempo de anelamento	Referência
Fator de alongação (TEF1- α)	EF1-688F	5'- CGGTCACTT GATCTACAA GTGC-3'	Senso	55 °C - 1'	Ji <i>et al.</i> , 2017
	EF1-1251R	5'- CCTCGAACT CACCAGTAC CG-3'	Anti-senso	55 °C - 1'	Ji <i>et al.</i> , 2017
5.8S e 28S rDNA (ITS)	ITS1	5'- TCCGTAGGT GAACCTGCG G-3'	Senso	52 °C - 1'	Ji <i>et al.</i> , 2017
	ITS2	5'- TCCTCCGCTT ATTGATATGC -3'	Anti-senso	52 °C - 1'	Ji <i>et al.</i> , 2017

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

As sequências obtidas foram analisadas e editadas no software Geneious Prime® versão 2022.2.2 (<https://www.geneious.com/prime/>). Todas as sequências passaram por análises e foram alinhadas utilizando as sequências obtidas pelas fitas senso e antisenso (*forward* e *reverse*), quando necessário. A identificação inicial dos isolados foi realizada utilizando o algoritmo Basic Local Alignment Search Tool nucleotide (BLASTn) alocado na plataforma do National Center for Biotechnology

Information (NCBI), com outros isolados depositados no banco de dados do GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). O alinhamento das sequências obtidas neste estudo e GenBank foi realizado por meio do software MEGA, versão 11.0, utilizando-se o método ClustalW.

Fusicoccum fabicercianum foi utilizado como *outgroup* para compor a raiz da árvore filogenética, sendo esta espécie adequada para a análise, pois as espécies pertencem à mesma família, Botryosphaeriaceae, mas são claramente separadas pela morfologia dos conídios, que apresenta parede espessa e menor razão comprimento e largura (LUQUE *et al.*, 2005; PHILLIPS *et al.*, 2005). As sequências (ITS e EF-1 α) foram avaliadas de maneira concatenada e individualmente.

Para a síntese da árvore filogenética, foi considerada a seleção de todos os acessos de *Lasiodiplodia* spp., de outros países e hospedeiros, disponíveis no NCBI. O método selecionado para a análise foi o da Máxima Verossimilhança, os valores foram calculados e o modelo foi escolhido de acordo com o Akaike Information Criterion (AIC).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização cultural e morfológica dos isolados

Para o crescimento micelial, não houve interação significativa a 5%, entre os fatores isolados e meios de cultura, apresentando apenas diferenças entre os isolados (TABELA 1). Resultados semelhantes foram observados por Fovo, Dostaler e Bernier (2017), onde, avaliando a influência dos meios de cultura BDA, MEA e V8 e temperaturas no crescimento micelial de *Lasiodiplodia* sp., isolados de *Ricinodendron heudelotii* (Baill.) Heckel, também não detectaram diferenças estatísticas entre os tratamentos.

Os isolados LP02 e LP05 apresentaram maiores valores do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), sendo iguais estatisticamente, seguidos pelo isolado LP08 que se diferenciou estatisticamente dos demais, e os isolados

LP01, LP07 e LP03 que apresentaram os menores valores de IVCM e não diferiram estatisticamente entre si (TABELA 1).

Tabela 1 - Índice de velocidade de crescimento micelial (mm/dia) dos isolados de *Lasiodiplodia* sp. cultivados nos meios de cultura BDA (Batata-dextrose-agar) e MEA (Agar-extrato-de-malte)

ISOLADO	IVCM
LP02	43,8 A
LP05	41,7 A
LP08	38,3 B
LP01	33,8 C
LP07	32,0 C
LP03	30,4 C
CV(%)	7,73

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

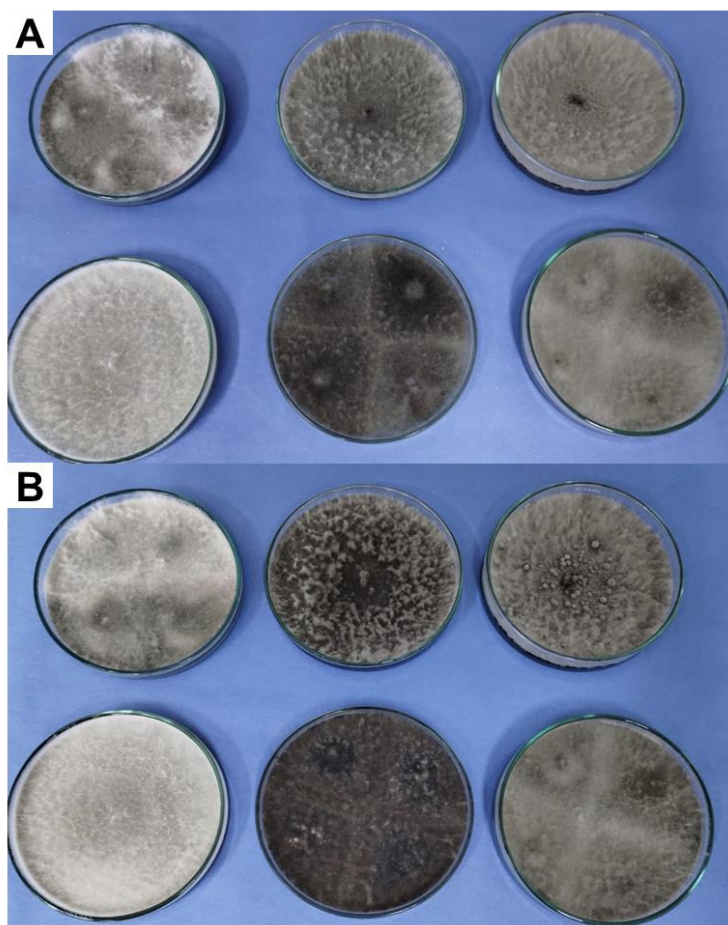
Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

As variações de crescimento micelial entre os isolados são resultados do aproveitamento dos mesmos sobre os meios de cultura que são utilizados (OLIVEIRA et al., 2010), demonstrando que os isolados LP02 e LP05, que apresentaram maiores valores de IVCM, tiveram maior aproveitamento das substâncias fornecidas pelos meios de cultura, desenvolvendo-se mais rapidamente. Valores semelhantes de crescimento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* crescidos em meio BDA foram observados por Lima et al. (2013), Lima et al. (2014), Pereira et al. (2006), e de *Lasiodiplodia pseudotheobromae* crescida em meio MEA observados por Netto (2014).

O isolado LP08 apresentou IVCM de 38,3 mm/dia, aproximando das taxas médias de crescimento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* encontrada por Maciel et al. (2015) e Halfeld-Vieira, Nechet e Souza (2007), isolados de pinus (*Pinus elliottii* e *Pinus taeda*), citros (*Citrus* sp.), coqueiro (*Cocos nucifera* L.) e acácia (*Acacia mangium* Willd.), respectivamente. Os demais isolados apresentaram um IVCM variando de 30,4 a 33,8 mm/dia. Taxas semelhantes também foram constatadas por Lima (2011) em isolados de cajueiro com sintomas de podridão preta da haste e resinose. De modo geral, as colônias de todos os isolados nos meios de cultura BDA e MEA apresentaram crescimento vigoroso, cobrindo totalmente a placa entre 72 a 120 horas de cultivo.

Todos os isolados apresentaram, inicialmente, micélio aéreo esbranquiçado, onde, após três dias passaram a apresentar tonalidades de cinza, e, com 7 a 10 dias tornaram-se colônias enegrecidas (FIGURA 7).

Figura 7 - Variabilidade morfológica entre isolados de *Lasiodiplodia* spp. associados a *Caryocar brasiliense*. (A) 3 dias após crescimento micelial total da placa (B) 7 dias após crescimento micelial total da placa



Fonte: Da autora, 2023.

Assim como neste estudo, outros autores notaram uma variação na coloração de colônias de *L. theobromae*, isolados de diferentes hospedeiros e regiões, sempre se iniciando branca ou branca acinzentada, passando por tons de cinza, até tornar-se preta (PUNITHALINGAN, 1976; PEREIRA et al., 2006; MARQUES et al., 2013; NETTO et al., 2014; NAM et al., 2016; RAMJEGATHESH et al., 2019; HUDA-

SHAKIRAH et al., 2022). Variações nas características morfológicas das colônias também foram observadas por Pereira et al. (2006) e Lima et al. (2014), avaliando, entre outras, as características morfológicas do patógeno *L. theobromae* isolados do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), mangueira (*Mangifera indica* L.), maracujazeiro (*Passiflora edulis* L.), coqueiro (*Cocos nucifera* L.), mamoeiro (*Carica papaya* L.) e cajarana (*Spondias cytherea* Sonn.), respectivamente. Apenas os isolados LP01, 02, 03 e 07 cultivados em MEA e LP03 e LP07 em BDA apresentaram a formação de picnídios no período avaliado (QUADRO 6).

Quadro 6 - Características culturais de isolados de *Lasiodiplodia* spp. em relação à cor da colônia e formação de picnídios nos meios de cultura BDA (Batata-dextrose-agar) e MEA (Agar-extrato-de-malte)

Meios Isolados	Cor da Colônia*		Formação de picnídios**	
	BDA	MEA	BDA	MEA
LP01	7.5YR4/0	7.5YR5/0	-	+
LP02	2.5Y4/0	7.5YR3/0	-	+
LP03	7.5YR5/0	2.5Y4/0	+	+
LP05	2.5Y5/0	7.5YR3/0	-	-
LP07	7.5YR4/0	7.5YR5/0	+	+
LP08	10YR4/1	2.5Y2/0	-	-

* Classificação pela carta de Munsell

** (-) = não formou picnídios; (+) formou picnídios

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Foram observados conídios imaturos, no isolado LP02 cultivado no meio BDA, e maduros nos isolados LP01, 03 e 07, cultivados no meio BDA e MEA. Os conídios eram inicialmente hialinos, de paredes finas e asseptados, de formato ovoide a elipsoide, forma que se mantêm quando maduros. As dimensões dos conídios maduros e imaturos de *Lasiodiplodia* spp. estão descritas na tabela 2.

Tabela 2 - Medidas de comprimento e largura de conídios de isolados de *Lasiodiplodia* spp. de *Caryocar brasiliense* Camb.

Meios Isolados	Comprimento × Largura (µm)	
	BDA	MEA
LP01	16,1-23,6 × 8,6-14,7	14,8-23,2 × 8,9-12,9
LP02	15,7-24,7 × 10,4-14,0	-
LP03	19,1-25,5 × 11,1-15,3	18,9-27,5 × 11,9-15,4
LP05	-	-
LP07	19,7-25,6 × 10,5-14,7	19,1-26,3 × 9,9-16,3
LP08	-	-

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Os conídios imaturos observados no isolado LP02, são hialinos, asseptados, com paredes duplas, de formatos elipsoides e ovóides (FIGURA 6), com tamanho variando de 15,7 a 24,7 µm de comprimento por 10,4 a 14,0 µm de largura. Os conídios imaturos de *Lasiodiplodia* sp. observados por Huda-Shakirah et al (2022), isolados do cacaueiro, apresentaram médias aproximadas às observadas neste estudo. Os isolados LP01, 03 e 07 apresentaram conídios maduros de coloração castanho claro a escuro, com um septo e estrias longitudinais (FIGURA 8), e dimensões médias variando 19,9-22,6 µm × 11,4-12,9 µm cultivados no meio de cultura BDA, e 19,5-23,6 µm × 11,0-13,6 µm cultivados no meio MEA.

Figura 8 - Conídios imaturos (A) e maduros (B) de *Lasiodiplodia* spp. isolados de *Caryocar brasiliense* Camb. Detalhes de coloração marrom escura, septos longitudinais e transversais característicos do patógeno (B).



Fonte: Da autora, 2023.

O isolado LP03 apresentou os menores valores para a relação comprimento/largura, tanto para o meio BDA (1,73 μm), quanto para o MEA (1,65 μm). Borges (2014), realizando a etiologia do cancro na teca e a caracterização patogênica e molecular da *Lasiodiplodia* sp., observou os mesmos valores para a relação C/L de isolados obtidos da cajazeira e serigueleira. O isolado LP01 apresentou valores médios para a relação comprimento/largura (C/L), 1,75 μm e 1,78 μm , em BDA e MEA, respectivamente, valores semelhantes aos observados por Ramjegathesh et al. (2019) e Costa et al. (2010) em isolados obtidos da mangueira e coqueiro, nessa ordem. O isolado LP07 apresentou os maiores valores para a relação comprimento/largura, 1,79 μm em meio de cultura BDA e 1,83 μm em meio de cultura MEA, assim como os valores observados por Alves et al. (2008).

Essa relação comprimento/largura expressa a forma do conídio, onde quanto maior o valor dessa relação, mais afinado é o conídio, ou seja, elipsoide. E quanto menor esse valor, mais arredondado é, ou seja, ovoide (LIMA et al., 2013). Neste estudo, ficou evidente que houve uma variação nas dimensões e, consequentemente, nas formas dos conídios dos isolados de *Lasiodiplodia* spp., independente do meio de cultura em que foram cultivados. Apesar disso, as dimensões observadas estão em concordância com as descritas por Punithalingam (1976).

3.2 Caracterização molecular dos isolados

Somente para os isolados LP01, 02 e 03 foi possível realizar a caracterização molecular, pois, para os demais isolados, houve uma impossibilidade de realizar o sequenciamento. Os isolados LP01, LP02 e LP03 foram identificados por meio da análise filogenética da sequência parcial das regiões ITS e EF1- α , onde foram submetidas a uma comparação inicial com as sequências já depositadas no NCBI usando o algoritmo BLAST.

A porcentagem de semelhança entre os isolados e as sequências disponíveis no banco de dados variou de 98,74 a 100%, identificando quatro espécies do gênero *Lasiodiplodia*, como, *Lasiodiplodia* sp., *L. brasiliensis*, *L. hormozganensis* e *L. theobromae* (QUADRO 7). Sendo uma dessas espécies, *Lasiodiplodia* sp., possivelmente nova.

Quadro 7 - Identificação das sequências EF1- α e ITS através da comparação de sequências depositadas no GenBank usando o BLAST

Isolado	EF-1 α	Similaridade (%)	ITS	Similaridade (%)
LP01	<i>L. brasiliensis</i>	100	<i>L. theobromae</i>	100
LP02	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	98,87	<i>L. theobromae</i>	99,63
LP03	<i>L. hormozganensis</i>	98,74	<i>L. theobromae</i>	100

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Os *amplicons* obtidos com os *primers* das regiões ITS e EF1- α produziram sequências de aproximadamente 500 bp e 550 bp, respectivamente. A matriz dos genes combinados consistiu em 2084 caracteres totais no alinhamento, incluindo gaps, divididos entre as regiões ITS (1371pb) e TEF1- α (713pb). Os isolados foram separados do grupo externo (*Fusicoccum fabicercianum*) com um valor de 100% bootstrap.

Após as análises filogenéticas das regiões ITS e EF1- α , percebeu-se que os isolados que inicialmente tinham sido identificados como *L. theobromae*, devido às características morfológicas, foram identificadas como diferentes espécies para o mesmo isolado com a mesma identidade de nucleotídeos (QUADRO 6). Assim como o observado por Borges (2014), onde, realizando a caracterização molecular da *L.*

theobromae, obtidas de diferentes hospedeiros, a utilização dessas regiões gênicas não foram suficientes para agrupar de forma correta os isolados, sendo preciso a utilização de outros genes menos conservados para conseguir a real identidade dos isolados.

Em estudos anteriores, sobre espécies da família *Botryosphaeriaceae*, utilizava-se somente um gene para a identificação das espécies, entretanto, percebeu-se que para algumas espécies crípticas, como espécies de *Lasiodiplodia*, havia certa dificuldade em distingui-las com base em genealogias de um único gene, sendo necessária a combinação de outras regiões de genes (SLIPPERS et al., 2004; PAVLIC et al., 2007). Van Der Linde et al. (2011), conduzindo estudos filogenéticos com espécies de *Lasiodiplodia*, utilizando as regiões ITS e TEF-1 α , não obtiveram boa resolução de clado, corroborando com este estudo. Isso evidencia a necessidade de inclusão de mais regiões gênicas nas análises filogenéticas de espécies de *Lasiodiplodia*, para obter maior precisão na identificação, como observado por Rosado et al. (2016), utilizando as regiões ITS, TEF-1 α e β -tubulina (tub2), e Huda-Shakirah et al. (2022) utilizando as regiões ITS, TEF-1 α , Tub2 e RNA polimerase II (rpb2).

Com isso, observa-se a necessidade de estudos mais detalhados, com mais regiões de genes, para uma identificação mais precisa das quais espécies associadas às doenças nos pequizeiros e, portanto subsidiar a definição do manejo de doenças em viveiros, plantios e áreas naturais, reduzindo a mortalidade e possibilitando a conservação da espécie.

4. CONCLUSÃO

Foi possível isolar o fungo com características culturais e morfológicas de *Lasiodiplodia* a partir de materiais com sintomas de manchas foliares e seca de ponteiros em viveiros, áreas naturais e plantios, e também de sementes de pequizeiro.

Todos os isolados de *Lasiodiplodia* spp. obtidos de pequizeiros de diferentes estádios de desenvolvimento e locais da região norte de Minas Gerais apresentaram variações nos aspectos culturais e morfológicos.

Os meios de cultura utilizados não influenciaram no crescimento micelial, onde os isolados LP02 e LP05, apresentando maior IVCm.

Todos os isolados apresentaram coloração da colônia inicialmente branca, tornando-se cinza-escuro a preta.

As dimensões dos conídios variaram de 15,7 – 25,6 × 8,6 – 15,3, cultivados em meio de cultura BDA e 14,8 – 27,5 × 8,9 – 16,3 cultivados em meio de cultura MEA, dentro do padrão para espécies do gênero *Lasiodiplodia*.

As regiões ITS e TEF não foram suficientes para realizar uma identificação e caracterização molecular precisa das espécies de *Lasiodiplodia* do trabalho, por isso, estudos que incluem mais regiões gênicas nas análises filogenéticas de espécies de *Lasiodiplodia* são necessários para obter maior precisão na identificação das espécies.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: Editora UFV. 2 ed., 382p. 2016.

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

BORGES, R. C. F. **Etiologia do cancro da teca e caracterização patogênica e molecular de *Lasiodiplodia theobromae***. 2014. 98 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília – DF. 2014.

BURGESS, T. I. et al. Current status of the *Botryosphaeriaceae* in Australia. **Australasian Plant Pathology**, v. 48, p. 35-44, 2019.

CARDOSO, J. E. et al. Interação enxerto e porta-enxerto na incidência da resinose do cajueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 847-854, 2010.

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

CRUYWAGEN, E. M. et al. Phylogenetic species recognition and hybridisation in *Lasiodiplodia*: a case study on species from baobabs. **Fungal Biology**, v. 121, n. 4, p. 420-436, 2017.

FOVO, J. D.; DOSTALER, D.; BERNIER, L. Influence of culture media and temperature on growth and sporulation of *Lasiodiplodia theobromae*, *Pestalotiopsis microspora* and *Fusarium oxysporum* Isolated from *Ricinodendron heudelotii* in Cameroon. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 6, p. 3098-3112, 2017.

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: Embrapa-CPAFRR, 2007. 14 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 02).

HUDA-SHAKIRAH, A. R. et al. *Lasiodiplodia theobromae* as a causal pathogen of leaf blight, stem canker, and pod rot of *Theobroma cacao* in Malaysia. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 8966, 2022.

INDEX FUNGORUM. **Species Fungorum**. 2023. Disponível em: <<https://www.indexfungorum.org/names/names.asp>>. Acesso em: 17 de outubro de 2023.

JUNQUEIRA N. T. V. et al. **Doenças do pequiizeiro**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2021.

LIMA, J. S. et al. Caracterização cultural de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* e patogenicidade em plantas de aceroleira. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 6, n. 1, 2012.

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

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

LIMA, J. S. **Diversidade cultural, morfológica e patogênica de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* associados a frutíferas tropicais**. 2011. 58 f. Dissertação (Mestrado Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE. 2011.

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

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**, 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.

MUNSELL Soil Color Charts. [S. I.]: Macbeth Division of Kollinorgen Instruments Corporations, 2009.

NAKASONE, A. K. et al. Ocorrência de *Lasiodiplodia pseudotheobromae* em bacurizeiro (*Platonia insignis*). **Summa Phytopathologica**, v. 46, p. 58-59, 2020.

NAM, M. H. et al. First report of dieback caused by *Lasiodiplodia theobromae* in strawberry plants in Korea. **Mycobiology**, v. 44, n. 4, p. 319-324, 2016.

NETTO, M. S. B. **Espécies de *Lasiodiplodia* associadas à podridão peduncular em mamão no nordeste do Brasil**. 2012. 60 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife – PE, 2012.

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

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.)**. 1991. 111 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras – MG. 1991.

OLIVEIRA, J. et al. Estudos do crescimento micelial sobre isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 5, 2010, Recife. **Resumos...** Recife: UFRPE, 2010. p. 3.

PAVLIC, D. et al. Botryosphaeriaceae occurring on native *Syzygium cordatum* in South Africa and their potential threat to Eucalyptus. **Plant Pathology**, v. 56, n. 4, p. 624-636, 2007.

PEIXINHO, G. S.; RIBEIRO, V. G.; AMORIM, E. P. R. Controle da Podridão seca (*Lasiodiplodia theobromae*) em cachos de videira cv. Itália por óleos essenciais e quitosana. **Summa Phytopathologica**, v. 43, p. 26-31, 2017.

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.

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

PHILLIPS, A. J. L. et al. The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. **Studies in mycology**, v. 76, n. 1, p. 51-167, 2013.

PUNITHALINGAM, E. *Botryodiplodia theobromae*. **Description of Pathogenic Fungi and bacteria**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, n.519, 1976. 3 p.

RAMJEGATHESH, R. et al. Characterization of *Lasiodiplodia theobromae* causing leaf blight disease of coconut. **Journal of Plantation Crops**, v. 47, n. 2, p. 62-71, 2019.

RODRIGUES, R. **Caracterização morfológica e patológica de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., agente causal das podridões de tronco e raízes da videira**. 2003. 68 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agrônômico de Campinas, Campinas – SP. 2003.

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.

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

SLIPPERS, B. et al. Diversity in the *Botryosphaeriales*: Looking back, looking forward. **Fungal biology**, v. 121, n. 4, p. 307-321, 2017.

SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J. *Botryosphaeriaceae* as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. **Fungal biology review**, v. 21, n. 2-3, p. 90-106, 2007.

VAN DER LINDE, J. A. et al. *Lasiodiplodia* species associated with dying *Euphorbia ingens* in South Africa. **Southern Forests: a Journal of Forest Science**, v. 73, n. 3-4, p. 165-173, 2011.

6. ANEXOS

Anexo A – Isolados utilizados nas análises filogenéticas.

Isolado	Hospedeiro	Origem	Coletor	Acesso GenBank	
				ITS	EF-1 α
LP01	<i>Caryocar brasiliense</i>	Brasil	Autor	-	-
LP02	<i>Caryocar brasiliense</i>	Brasil	Autor	-	-
LP03	<i>Caryocar brasiliense</i>	Brasil	Autor	-	-
CBS:136434	-	-	-	MT587421.1	MT592133.1
GuoLD01961	<i>Aquilaria crassna</i>	Ásia	Yu Wang	KY783442.1	KY848600.1
LAS199	Árvores de mangue	África do Sul	J Alexander Osorio	KU587957.1	KU587947.1
LAS158	Árvores de mangue	África do Sul	J Alexander Osorio	KU587956.1	KU587946.1
MFLUCC17-2591	Vagens de sementes e frutas	Tailândia	Jayasiri, S. C.	NR_163344.1	MK340867.1
C376	Vagens de sementes e frutas	Tailândia	Jayasiri, S. C.	MK347777.1	-
CFC-1124	<i>Citrullus lanatus</i>	Brasil	Alves, C.P.S.S.	OL890692.1	CFC-1124
ON623895.1	Banana	Brasil	Almeida, M.M.M.	ON599012.1	BAN82
CMW41470	Árvores de mangue	África do Sul	Osorio, J.A.	KP860833.1	KP860678.1
CMW42480	Árvores de mangue	África do Sul	Osorio, J.A.	KP860832.1	KP860677.1
IBL366	Árvores frutíferas	Brasil	Coutinho, I.B.	KT154760.1	KT008006.1
IBL40	Árvores frutíferas	Brasil	Coutinho, I.B.	KT154762.1	KT154755.1
MFLU:21-0003	Árvores	Tailândia	Wu,N.	MW760854.1	MW815630.1
GZAAS 21-0014	Árvores	Tailândia	Wu,N.	-	MW815629.1
CGMCC 3.18061	-	China	Zhang, Y.	KX499889.1	KX499927.1
CGMCC 3.18067	-	China	Zhang, Y.	KX499901.1	KX499939.1

Continuação...

MFLUCC 16-0376	Pandanaceae	China e Tailândia	Saowaluck Tibpromma	MH275066.1	MH412773.1
CFCC 51998	<i>Cinnamomum camphora</i>	China	Jiang, N.	MG866029.1	MH236800.2
CFCC 51997	<i>Cinnamomum camphora</i>	China	Jiang, N.	MG866028.1	MH236799.2
B310	Videiras	Itália	Carlucci, A.	KM675758.1	KM822729.1
B177	Videiras	Itália	Carlucci, A.	KM675756.1	KM822727.1
CGMCC:3.19594	-	China	Wang, Y.	MK802166.1	-
UOM11	<i>Vitex negundo</i>	Índia	Sunayana, N.	AB873032.1	-
20b	<i>Mangifera indica</i>	Porto Rico	Quimbata, A.M.	-	OL455925.1
GuoLD01755	-	China	Lin, S.	KY783443.1	KY848601.1
GuoLD01906	-	China	Lin, S.	KY783437.1	KY848596.1
CMW54191	<i>Eucalyptus</i>	Indonésia	Jami, F.	MT934428.1	MT920453.1
MAR29	Árvores	África do Sul	Mehl, J.W.M.	KY052995.1	KY024663.1
MFLUCC 18-1121	Plantas da floresta Magnólia	Tailândia	de Silva, N.I. and Hyde, K.D.	MK501838.1	MK584572.1
GB180	<i>Anacardium occidentale</i>	África Ocidental	Monteiro, F.	MT981878.1	MW315827.1
CMM2463	<i>Prickly pear</i>	Brasil	Conforto, C.	-	KY569613.1
CUZFLexi2	Videiras	Turquia	Akgul, D.S	MK045640.1	MK050969.1
CUZFLexi1	Videiras	Turquia	Akgul, D.S	MK045639.1	MK050968.1
BRIP58865	Plantas de herbário	Austrália	Tan, Y.P.	MH057180.1	MH102243.1
CMW24126	Espécies agrícolas	África do Sul	Mehl, J.W.M.	KU997373.1	KU997112.1
BE59	<i>Citrus</i>	China	Xiao, X.	MW880673.1	-
CDZM 322	-	China	Wang, Y.	OL863158.1	OM243809.1
CCMF-CNPA0555	<i>Ricinus communis</i>	Brasil	Custodio, F.A.	MG787091.1	MG806912.1

Continuação...

CCMF-CNPA0603	<i>Ricinus communis</i>	Brasil	Custodio, F.A.	MG787092.1	MG806913.1
BE111	<i>Citrus</i>	China	Xiao, X.	MW880676.1	-
BE50	<i>Citrus</i>	China	Xiao, X.	MW880675.1	-
CGMCC3.17975	<i>Hyalina</i> sp.	China	Zhang, Y	KX499879.1	KX499917.1
PAN 30202	-	Índia	Prasher, I.B. and Singh, G.	NR_155317.1	-
IBP 1	-	Índia	Prasher, I.B. and Singh, G.	KM376151.1	-
F0619	-	Panamá	Hernandez-Torres, K.	OP684132.1	-
L6	-	México	Betancourt-Arangure, A.	OP725650.1	-
GuoLD01673	-	China	Lin, S. and Zhang, Y.	KY783472.1	KY848610.1
CBS:138554	-	China	Zhang, W.	MT587429.1	-
DSYWK03	<i>Caryota mitis</i>	China	Zhu, H.	KJ885546.1	KM066118.1
DSYWK05	<i>Caryota mitis</i>	China	Zhu, H.	KP297435.1	KP297437.1
MFLU 17-2617	Habitat marinho	-	Dayarathne, M.C.	NG_068405.1	-
SWUZJG 06	-	China	Wu, D.	MZ453038.1	MZ485240.1
LAK1	Mirtilo	Perú	Rodriguez-Galvez, E.	MK860749.1	MN082385.1
GuoLD01818	-	China	Lin, S. and Zhang, Y.	KY783471.1	KY848609.1
GuoLD01963	-	China	Lin, S. and Zhang, Y.	KY783450.1	KY848603.1
CMW54165	<i>Eucalyptus</i>	Indonésia	Jami, F.	MT934413.1	MT920442.1
CMW54162	<i>Eucalyptus</i>	Indonésia	Jami, F.	MT934411.1	MT920440.1
BE52	<i>Citrus</i>	China	Xiao, X.	MW880683.1	-
BE49	<i>Citrus</i>	China	Xiao, X.	MW880682.1	-
AGQMy0006	Palmeira	México	Douanla-Meli, C.	MW274146.1	MW604229.1

Continuação...

AGQMy0002	Palmeira	México	Douanla-Meli, C.	-	MW604230.1
GuoLD01752	-	China	Lin, S. and Zhang, Y.	KY783438.1	KY848597.1
CMM3833	<i>Jatropha curcas</i>	Brasil	Machado, A.R.	KF234557.1	KF226718.1
MFLUCC	Plantas da floresta	Tailândia	de Silva, N.I. and Hyde, K.D.	MK499387.1	MK568537.1
17a	<i>Mangifera indica</i>	Porto Rico	Quimbata, A.M.	OL375401.1	OL455922.1
17b	<i>Mangifera indica</i>	Porto Rico	Quimbata, A.M.	OL375402.1	OL455923.1
CR-12	-	Índia	Pawle, G.	MH790209.1	-
CR-11	-	Índia	Pawle, G.	MH790207.1	-
SM 15 SGNP	-	Índia	Dubey, R.	ON685316.1	-
13-1215	<i>Mirtilo americano</i>	Estados Unidos	Wiseman, M.S.	KU578252.1	KU720487.1
13-1214	<i>Mirtilo americano</i>	Estados Unidos	Wiseman, M.S.	KU578251.1	KU720486.1
AGQMy0014	Palmeira	México	Douanla-Meli, C.	MW274151.1	MW604234.1
AGQMy0015	Palmeira	México	Douanla-Meli, C.	MW274150.1	MW604233.1
GuoLD01889	-	China	Lin, S. and Zhang, Y.	KY783441.1	KY848614.1
CBS124060	-	Países Baixos	Yang, T.	KX464148.1	KX464642.1
JADK10	Videiras	Marrocos	Kenfaoui, J.	OK087687.1	-
CMM1472	<i>Mangifera indica</i>	Brasil	Marques, M.W.	JX464040.1	JX464061.1
WAC12540	-	Austrália	Burgess, T.I.	DQ103548.1	DQ103569.1
WAC12539	-	Austrália	Burgess, T.I.	DQ103547.1	DQ103568.1
CGMCC 3.19023	Mirtilo	China	Zhao, L.	MH330319.1	MH330329.1
CGMCC 3.19024	Mirtilo	China	Zhao, L.	MH330320.1	MH330328.1
GuoLD01846	-	China	Lin, S. and Zhang, Y.	KY783454.1	KY848616.1
CBS164.96	-	Portugal	Phillips, A.	AY640255.1	AY640258.1

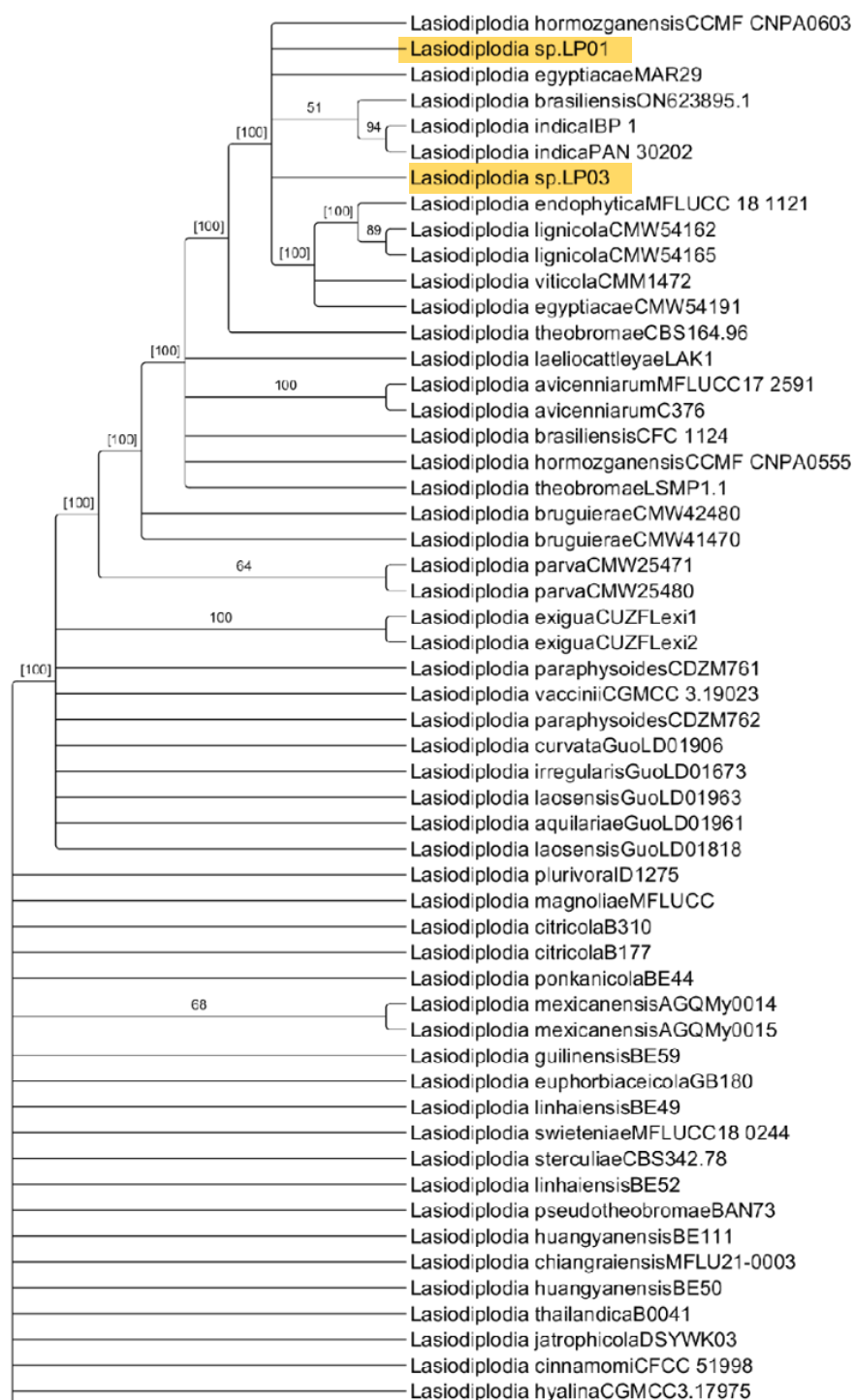
Continuação...

CMW25472	<i>Grevillea robusta</i>	Quênia	Njuguna, J.W.	-	FJ904889.1
CBS116459	-	Portugal	Alves, A.	EF622077.1	EF622057.1
LSMP1.1	Banana	Nigéria	Kolombia, Y.A.	MZ413346.1	MZ420177.1
CGMCC3.19597	Mirtilo	China	Wang, Y.	-	OM158758.1
CGMCC3.19596	Mirtilo	China	Wang, Y.	-	OM158757.1
B0041	-	Tailândia	Trakunyingcharoen, T.	KM006433.1	KM006464.1
GuoLD01857	-	China	Lin, S. and Zhang, Y.	KY783466.1	KY848619.1
CBS120512	-	China	Zhang, W.	MT587434.1	MT592147.1
MFLUCC18-0244	Vagens de sementes e frutas	Tailândia	Jayasiri, S. C.	MK347789.2	MK340870.1
CMM3872	<i>Jatropha curcas</i>	Brasil	Machado, A.R.	NR_147350.1	KF226721.1
CMM4046	<i>Jatropha curcas</i>	Brasil	Machado, A.R.	KF234560.1	KF226723.1
CBS342.78	-	Países Baixos	Yang, T.	KX464140.1	KX464634.1
CBS127106	-	China	Zhang, W.	-	MT592146.1
CBS118740	-	Portugal	Phillips, A. J.	-	EU673304.1
WAC12538	-	Austrália	Burgess, T. I.	DQ103556.1	DQ103574.1
CBS121771	<i>Acacia mellifera</i>	África do Sul e Namíbia	van der Walt, F. J. J.	EU101308.1	EU101353.1
CGMCC_3.18051	-	China	Dou, Z.	MK510560.1	MK510671.1
CBS117454	<i>Citrus</i>	China	Xiao, X.	MT587432.1	MT592144.1
BE44	<i>Citrus</i>	China	Xiao, X.	MW880685.1	-
STE-U 5803	Árvore	China	Xiao, X.	EF445362.1	EF445395.1
ID1275	Madeira	África do Sul	Halleen, F.	MT649616.1	MT666044.1
MFLUCC16-0265	Pandanaceae	Tailândia	Tibpromma, S.	MH275068.1	-

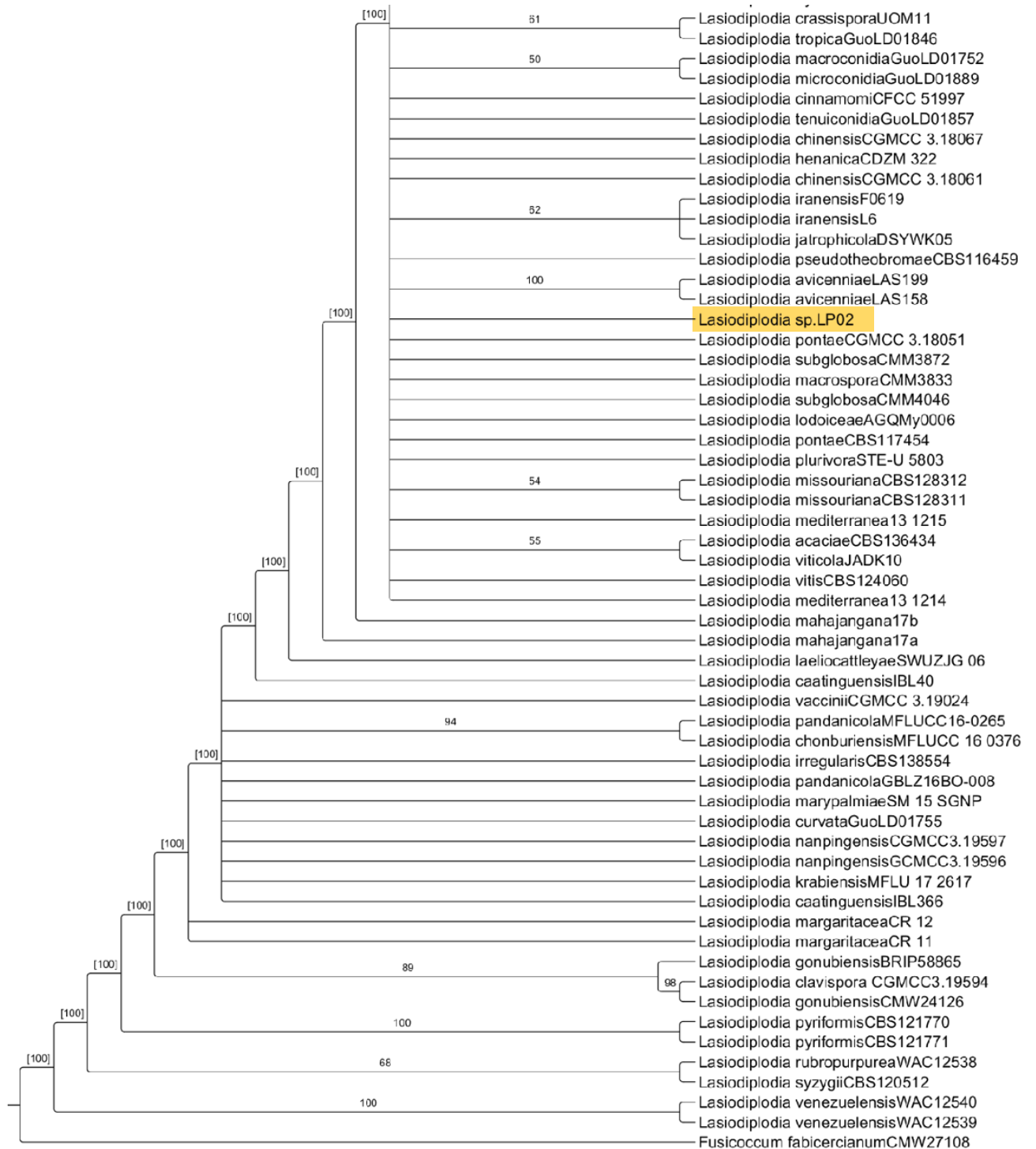
Continuação...

GBLZ16BO-008	Lichia	China	Ling, J.-F.	MN540679.1	-
CGMCC3.19597	-	China	Wang, Y.	MK802168.1	-
GCMCC3.19596	-	China	Wang, Y.	MK802167.1	-
CBS128312	-	Países Baixos	Vu, D.	MH864854.1	-
CBS128311	-	Países Baixos	Vu, D.	MH864853.1	-
CMW25471	-	Suécia	Njuguna, J.W.	JF682852.1	FJ904884.1
CMW25480	-	Suécia	Njuguna, J.W.	JF682851.1	FJ904885.1
CDZM762	-	China	Wang, Y.	OL863166.1	OM243819.1
CDZM761	-	China	Wang, Y.	OL863165.1	OM243818.1

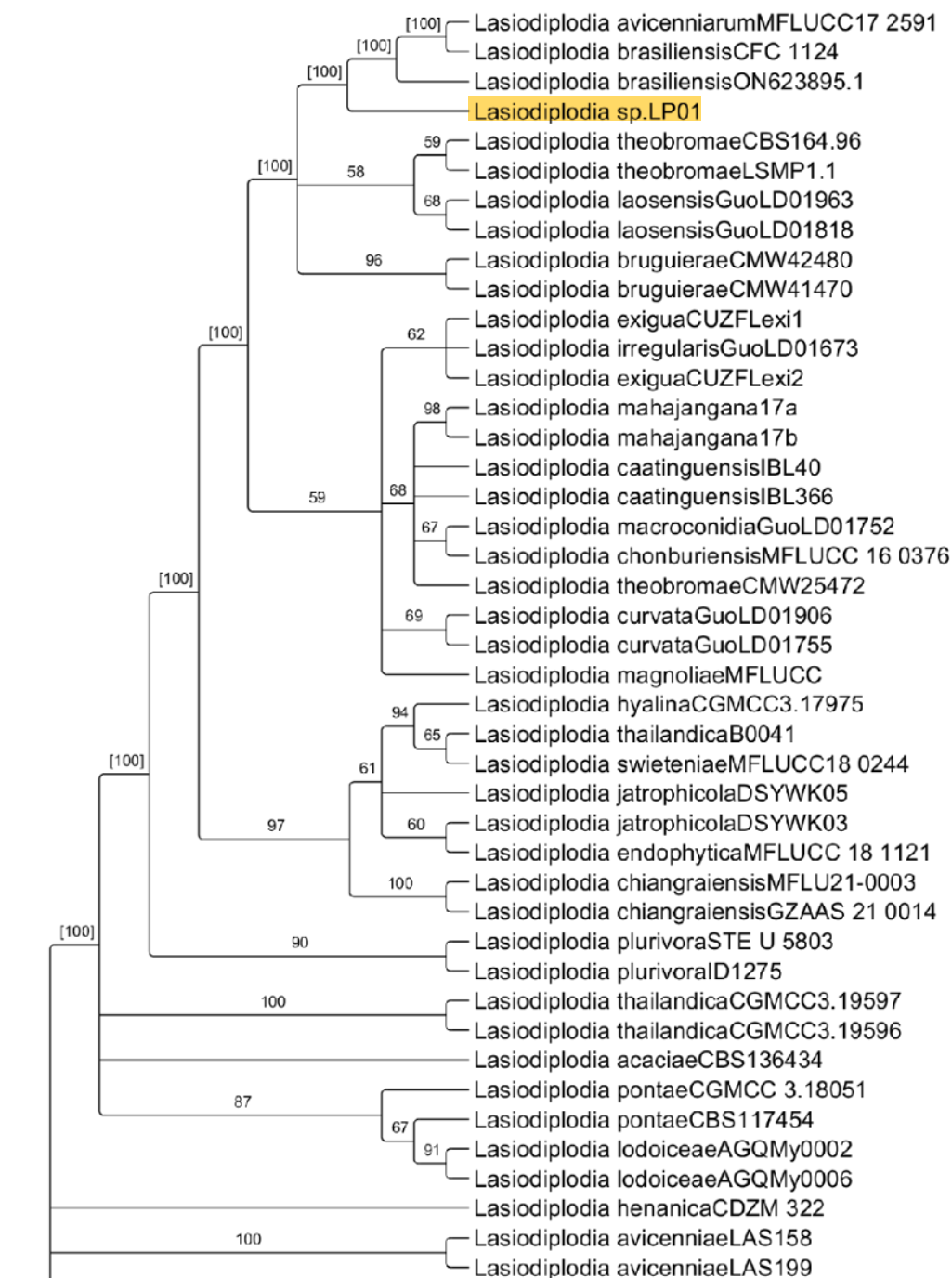
Anexo B – Dendrograma filogenético da máxima verossimilhança da região ITS de três isolados de *Lasiodiplodia* spp., juntamente com as sequências de isolados de *Lasiodiplodia* spp. provenientes do GenBank



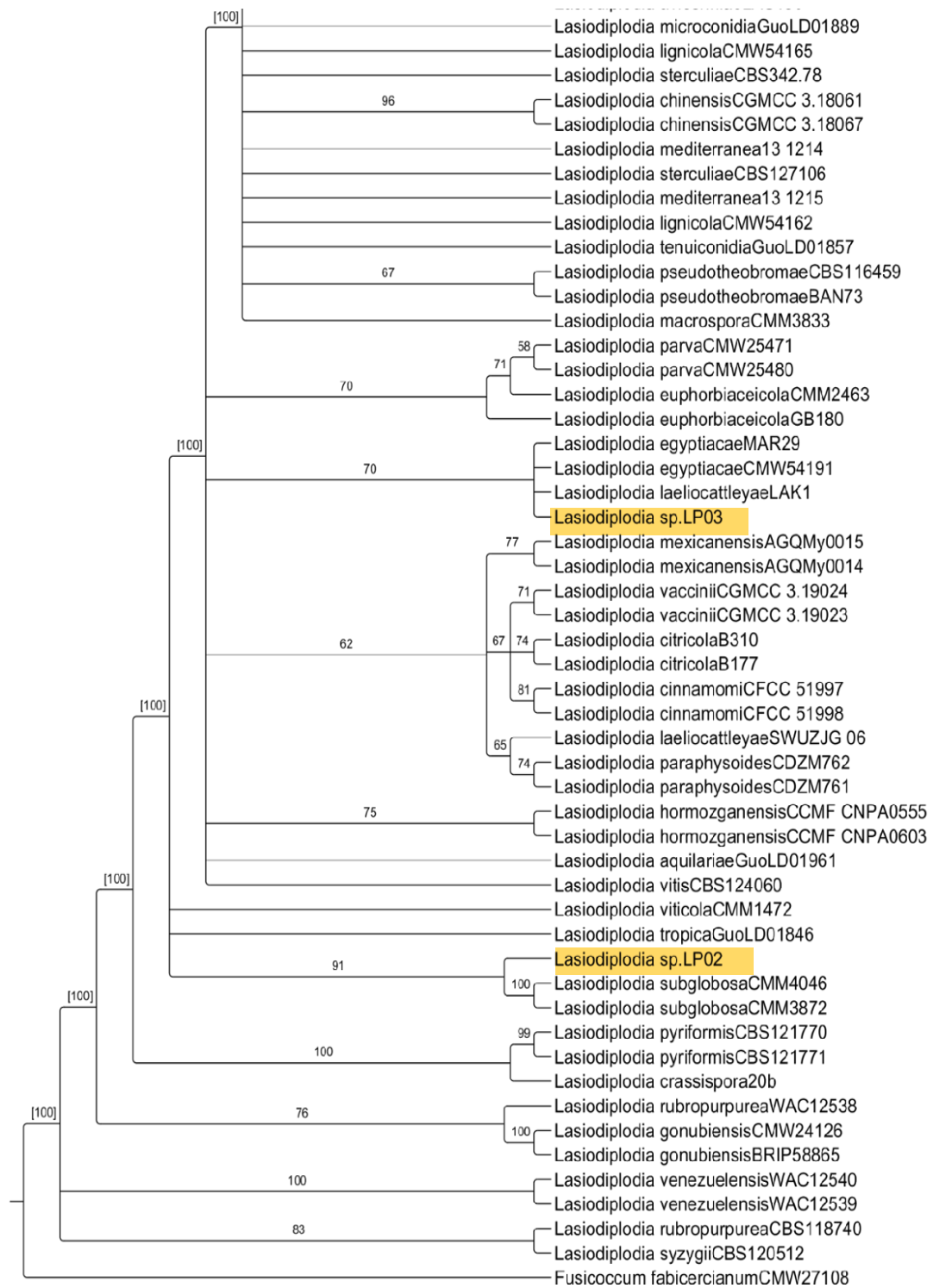
Continuação...



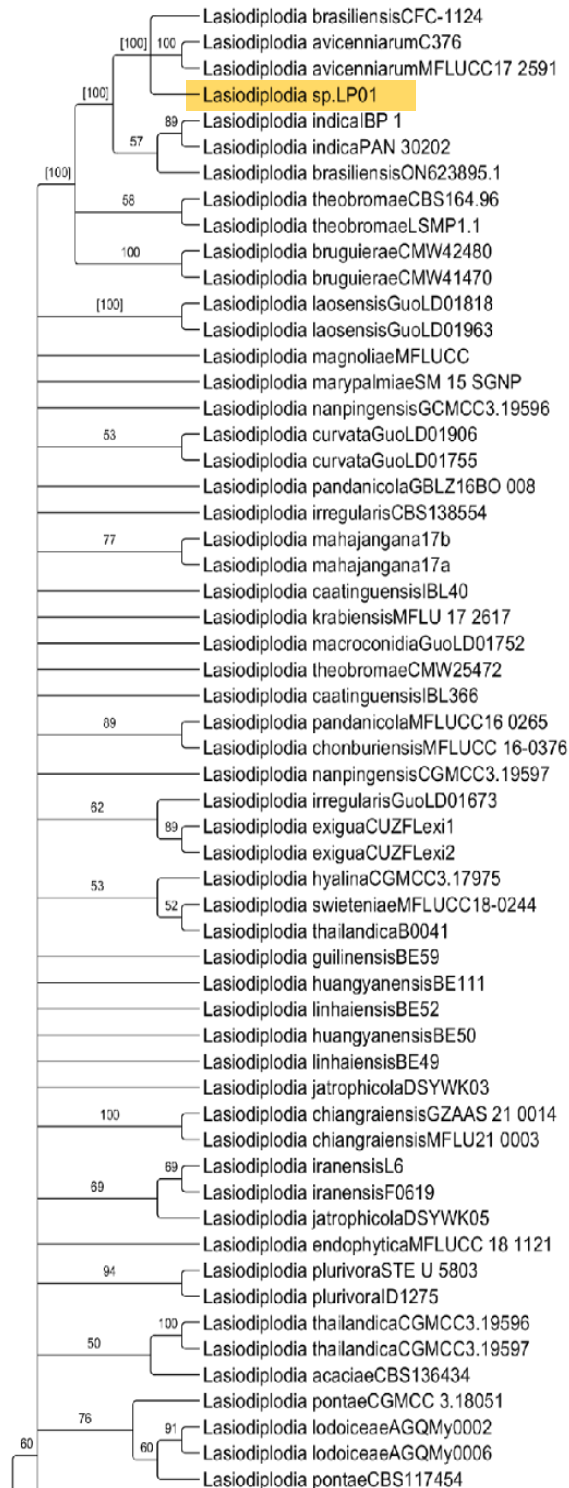
Anexo C – Dendrograma filogenético da máxima verossimilhança da região TEF de três isolados de *Lasiodiplodia* spp., juntamente com as sequências de isolados de *Lasiodiplodia* spp. provenientes do GenBank



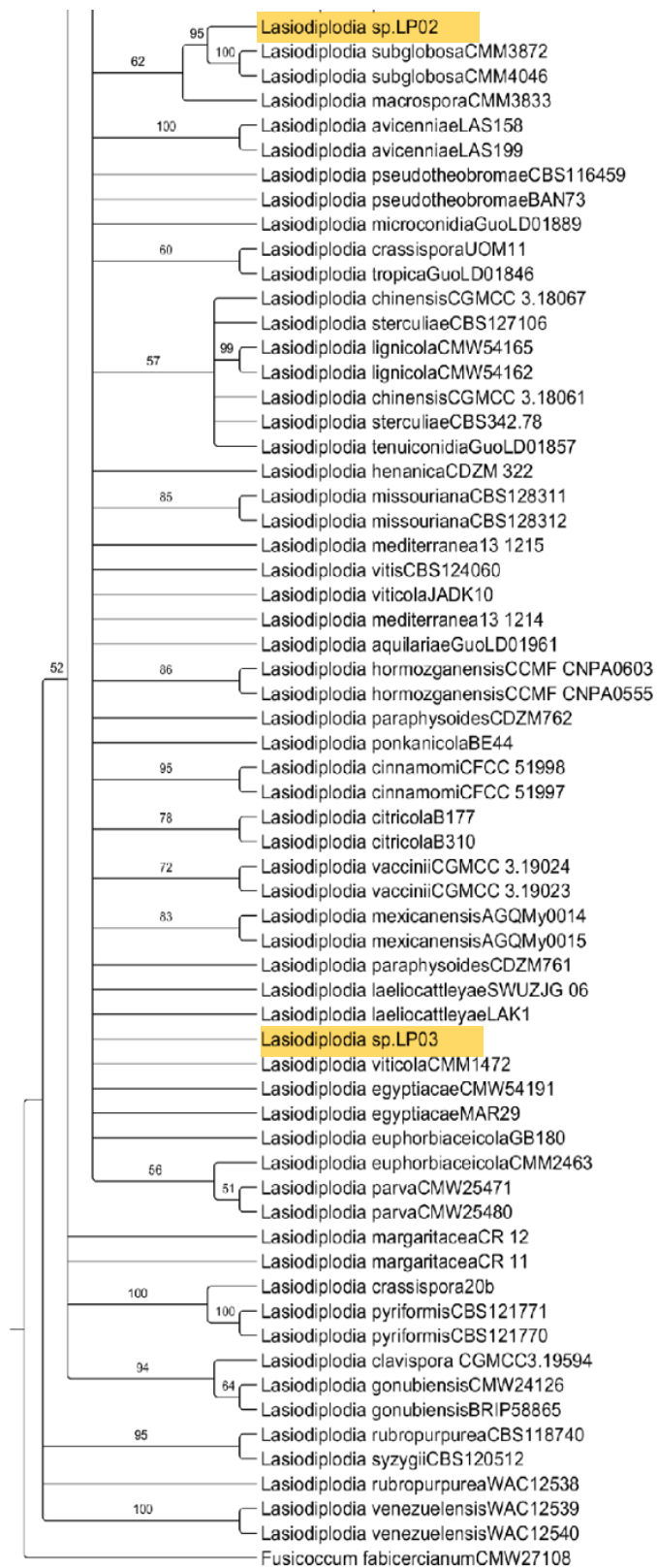
Continuação...



Anexo D – Dendrograma filogenético da máxima verossimilhança das regiões ITS e EF1- α de três isolados de *Lasiodiplodia* spp., juntamente com as sequências de isolados de *Lasiodiplodia* spp. provenientes do GenBank



Continuação...



7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos foi observado que vários fungos são isolados dos materiais vegetais sintomáticos de seca de ponteiros e manchas foliares de pequizeiros.

Houve variações nas características culturais e morfológicas dos isolados de *Lasiodiplodia* obtidos de sementes, mudas e árvores de pequizeiros de diferentes locais do norte de Minas Gerais. As regiões gênicas utilizadas nas análises filogenéticas não foram suficientes para realizar, com precisão, a caracterização molecular dos isolados.

Evidencia-se a importância de estudos sobre a etiologia de doenças em pequizeiros, principalmente devido à importância da espécie para a região. Tais estudos serviram de subsídios para pesquisas em melhoramento genético e domesticação da espécie, contribuindo para sua conservação e, possivelmente, possibilitar melhores estratégias para o manejo de doença nos pequizeiros em áreas naturais, plantios e em mudas nos viveiros.