



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



MARCELA PAGOTI BERGAMINI LOPES

**FUNGOS ASSOCIADOS À PODRIDÃO PÓS-COLHEITA PERTENCENTES À
FAMÍLIA Botryosphaeriaceae EM ABACATE**

Botucatu

2018

MARCELA PAGOTI BERGAMINI LOPES

**FUNGOS ASSOCIADOS À PODRIDÃO PÓS-COLHEITA PERTENCENTES À
FAMÍLIA Botryosphaeriaceae EM ABACATE**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Agronomia da Unesp Câmpus de Botucatu,
para obtenção do título de Mestre em Proteção
de Plantas.

Orientador(a): Prof. Dr. Edson Luiz Furtado

Coorientadora: Prof. Dr. Ana Carolina Firmino

Botucatu

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP
- FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

L864f Lopes, Marcela Pagoti Bergamini, 1986-
Fungos associados à podridão pós-colheita pertencentes à família *Botryosphaeriaceae* em abacate / Marcela Pagoti Bergamini Lopes. - Botucatu: [s.n.], 2018
56 p.: fots. color., grafs. color., ils. color, tabs.

Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2018
Orientador: Edson Luiz Furtado
Coorientador: Ana Carolina Firmino
Inclui bibliografia

1. Abacate - Cultura. 2. Abacate - Doenças e pragas. 3. Abacate - Pós colheita. 4. Filogenia. I. Furtado, Edson Luiz. II. Firmino, Ana Carolina. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

Elaborada por Ana Lucia G. Kempinas - CRB-8:7310

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "FUNGOS ASSOCIADOS À PODRIDÃO PÓS-COLHEITA PERTENCENTES À FAMÍLIA
Botriosphaeriaceae EM ABACATE"

AUTORA: MARCELA PAGOTI BERGAMINI

ORIENTADOR: EDSON LUIZ FURTADO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA
(PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ANA CAROLINA FIRMINO

Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena

Dr. MARCO ANTONIO BASSETO

Escritório de Defesa Agropecuária de Araçatuba / Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo

Profa. Dra. ADRIANA ZANIN KRONKA

Depto de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrômica - UNESP

Botucatu, 18 de janeiro de 2018.

*A minha família pelo amor, apoio e preocupação.
Ao meu marido pelo companheirismo e confiança.
dedico*

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força na superação de momentos difíceis.

Ao meu marido por quem tenho enorme admiração, respeito. Agradeço pelo companheirismo, pela paciência, pela ajuda e por todo carinho e dedicação.

Aos meus queridos pais, pela dedicação, pelos valores que me ensinaram e amor incondicional. Obrigada pelos sacrifícios e doações que fizeram para que eu pudesse me tornar quem eu sou. Hoje compartilho dessa conquista tão especial.

Ao meu irmão pela amizade e incentivo, exemplo de determinação, dedicação a quem me orgulho muito.

Aos meus avós pelo amor e exemplo de vida e dedicação para a nossa família

Aos meus familiares, pessoas especiais que me incentivaram e ajudaram para que eu realizasse mais essa etapa.

A tia Lourdes pelo carinho e pelas comidinhas que fizeram dos meus dias mais felizes.

Ao Rui pelos momentos de alegria.

Aos meus amigos que compartilham dos meus melhores momentos até os dias mais difíceis e, mesmo que muitos estejam distantes estão em meu coração.

Ao Profº. Drº. Edson Luiz Furtado por acreditar no meu trabalho e me acolher como sua orientada.

A Profª. Drª. Ana Carolina Firmino pelo profissionalismo, dedicação, paciência, solicitude e amizade. Tive muita sorte de tê-la como minha coorientadora, você é um exemplo para mim.

Ao Drº Ivan Hermann Fischer pelos isolados cedidos para o estudo.

A Prof. Dr. Adriana Zanin Kronka e Marco Basseto por aceitarem compor a minha banca de defesa.

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de estudos concedida.

“Quando não souberes para onde ir, olha para trás e sabe pelo menos de onde vens” (Provérbio africano).

RESUMO

O abacateiro (*Persea americana*) é uma cultura de importância crescente no Brasil devido ao aumento da sua produção e exportação. A podridão pós-colheita é um dos problemas que afetam essa cultura devido à depreciação que causa no fruto. Essa doença é causada por diversos fungos e dentre eles se encontram espécies pertencentes à família Botryosphaeriaceae. Por isso, o presente trabalho teve o objetivo de identificar espécies de Botryosphaeriaceae associadas à podridão pós-colheita em abacates provenientes do Estado de São Paulo e Minas Gerais. A partir de quarenta isolados obtidos foram realizadas caracterizações: cultural, morfológica, patogênica e filogenética. O crescimento micelial se deu sob temperatura de 25°C e apresentou diferenças significativas na taxa de velocidade de crescimento, porém não houve associação com a diferença entre as espécies avaliadas. O mesmo aconteceu nos testes de patogenicidade, onde micélios de *Neofusicoccum* foram inoculados em frutos de abacate que foram mantidos a 25°C. As avaliações morfológicas realizadas a partir de inoculação de micélios em meio MEA e mantidos em condições controladas de luz e temperatura também não apresentaram diferenciação. A caracterização filogenética se deu a partir das regiões ITS (espaçadores internos transcritos) e Alfa elongase (1- α (EF1- α)), sendo identificadas três espécies pertencentes ao gênero *Neofusicoccum*, sendo trinta e oito isolados de *Neofusicoccum parvum*, um associado a *Neofusicoccum umdonicola* e um de *Neofusicoccum ribis*. Esse é o primeiro relato de *N. umdonicola* associado a abacate no Brasil.

Palavras chave: *Neofusicoccum*, abacate, caracterização, primeiro relato.

ABSTRACT

The avocado (*Persea americana*) is a culture of growing importance in Brazil due to the increase of its production and export. Post-harvest rot and one of the problems affecting this crop is the discovery it causes in the fruit. This disease is caused by several fungi and among them and other species belonging to the family Botryosphaeriaceae. Therefore, the present work was carried out with the objective of identifying *Botryosphaeriaceae* species associated with post-harvest rot in avocados from the State of São Paulo and Minas Gerais. From forty isolates were obtained characterizations: cultural, morphological, pathogenic and phylogenetic. Mycelial growth occurred at a temperature of 25 ° C and is significant in the rate of growth rate, but is not an association with a difference between the evaluated species. The same happened in the pathogenicity tests, where *Neofusicoccum* mycelia were inoculated on avocado fruits that were kept at 25°C. As morphological evaluations performed from the creation of mycelia in MEA medium and kept under controlled conditions of light and temperature also did not present the difference. A phylogenetic characterization was carried out from the ITS (internal transcribed spacers) and Alfa elongase (1- α (EF1- α) regions). Three species belonging to the genus *Neofusicoccum* were identified, of which thirty eight were *Neofusicoccum parvum*, one associated with *Neofusicoccum umdonicola* and one of *Neofusicoccum ribis*. This is the first report of *N. umdonicola* associated with avocado in Brazil.

Keywords: *Neofusicoccum*, avocado, characterization, first report.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	A cultura do abacateiro	19
2.2	Problemas de pós-colheita do abacate	20
2.3	Aspectos gerais da família Botryosphaeriaceae	21
2.4	Aspectos taxonômicos da família Botryosphaeriaceae	22
2.5	Caracterização molecular da família Botryosphaeriaceae	23
2.6	Gênero Neofusicoccum.....	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	Local do experimento.....	27
3.2	Origem e obtenção dos isolados.....	27
3.3	Caracterização cultural	28
3.4	Caracterização morfológica	29
3.5	Caracterização patogênica	30
3.6	Extração, amplificação e seqüenciamento de DNA	30
3.7	Análises filogenéticas	32
4	RESULTADOS	35
4.1	Caracterização cultural	35
4.2	Caracterização morfológica	36
4.3	Caracterização patogênica	39
4.4	Análise molecular.....	40
5	DISCUSSÃO.....	44
6	CONCLUSÕES.....	47
	REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de abacate (*Persea americana* Mill.) tem sido impulsionado nos últimos anos por conta do ritmo crescente da sua exportação. Atualmente, é considerado um nicho de mercado que auxilia no déficit da produção de outras frutíferas (ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA, 2017). Devido a isso, houve um aumento expressivo na produção nacional de abacate, que em 2013, era de 94.294 toneladas passando para 180.636 toneladas em 2016, demonstrando um crescente aumento dos investimentos nesse ramo de produção (FIRMINO et al., 2016, 2013; ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA, 2017). Sendo a região sudeste do país a maior produtora e responsável por quase toda a produção nacional onde o estado de São Paulo recebe o maior destaque (ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA, 2017).

Os frutos de abacate são altamente perecíveis e podem ter sua qualidade comprometida por ferimentos, no manejo inadequado na colheita, transporte e armazenamento dificultando a sua comercialização (CARVALHO et al., 2001). Neste contexto as doenças pós-colheita são importantes e inviabilizam a venda do produto final (PEGG et al., 2002).

Dentre os patógenos causadores dessas doenças em abacate, encontram-se os fungos da família Botryosphaeriaceae. Apesar de não serem tão incidentes se comparados a outras espécies, esses de fungos portam uma característica particular que dificulta o seu controle: são micro-organismos endofíticos que podem se tornar fitopatogênicos caso o hospedeiro seja submetido à condição de estresse (SLIPPERS e WINGFIELD, 2007; FISCHER et al., 2011).

Além de possuírem uma ampla distribuição geográfica e vasta gama de hospedeiros, esses micro-organismos têm capacidade de infectar múltiplas espécies de plantas, aumentando a possibilidade de invasão a novas áreas do globo, o que pode gerar incontáveis prejuízos econômicos e ecológicos (MEHL et al. 2017; SLIPPERS e WINGFIELD, 2007).

Portanto, o entendimento da biologia, dispersão e diversidade desse grupo é de fundamental valia somado ao desenvolvimento de técnicas capazes de identificar

espécies de Botryosphaeriaceae. Esses dados podem auxiliar no processo de quarentena, impedindo sua dispersão e, possivelmente, estratégias de manejo e controle poderão ser desenvolvidas no combate a esse patógeno (SLIPPERS et al., 2017).

Diante do que foi exposto, o presente trabalho teve como objetivo identificar espécies de Botryosphaeriaceae causadoras de podridão pós-colheita em plantações de abacate pertencentes aos estados de São Paulo e Minas Gerais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura do abacateiro

O abacateiro (*Persea americana* Mill.), pertencente à família Lauraceae, é originário do México e América Central (DONADIO, 1995). Devido a sua origem adapta-se muito bem ao clima tropical e subtropical sendo encontrado, principalmente, no México, toda América Central, Israel, Havaí, África do Sul e em alguns países da América do Sul (TEIXEIRA, 1991; DONADIO, 1995).

É uma planta de porte médio a elevado (12 a 20 metros) com copa ereta ou espalhada e de cultura perene. Suas folhas são alternadas com sistema radicular tipo axial, inflorescências formadas em panículas e fruto do tipo baga, altamente variável em formatos, cores e tamanhos (BERGH, 1969, BORGES; MELLO, 2017).

Em relação à produção nacional, dados levantados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística em 2016 demonstram que a produção da fruta no país foi de 180.636 toneladas em 10.354 hectares. A região Sudeste é detentora de praticamente toda a safra produzida, sendo São Paulo o principal estado produtor (ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA, 2017).

O cultivo do abacate tem sido estimulado nos últimos anos devido à crescente exportação, sendo uma das espécies que compensaram a retração de outros produtos agrícolas. Fato corroborado pelo aumento dos investimentos no setor visando a sua expansão (ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA, 2017).

No Brasil, são produzidas as variedades: Tropical, Hass e Fuerte. Enquanto a variedade Tropical se destaca no cenário nacional pelo baixo teor de óleo e tamanho grande, as variedades Hass e Fuerte, popularmente conhecidas como avocado, são principalmente cultivadas para exportação e apresentam alto teor de óleo e tamanho diminuto (DONADIO, 1995). Apesar das similaridades, as espécies Hass e Fuerte podem ser distintas pela casca e coloração, enquanto a variedade Hass possui a casca grossa e rugosa com alteração de cor logo após a colheita, a variedade Fuerte é composta por casca lisa, fina e sem alteração de cor com o amadurecimento (DONADIO, 1995).

O abacate possui um excelente valor nutricional, sendo descrito por institutos especializados em coração como alimento saudável e fonte de gordura alimentícia (PEREZ-JIMÉNES, 2008). Além do alto teor de óleos, a fruta também possui carboidratos, minerais, proteínas e vitaminas (KNIGHT JR, 2002).

Tendo um melhor desempenho se comparado à soja e amendoim, o óleo extraído de abacate é de grande interesse na produção de biocombustíveis também nas indústrias farmacêutica e de cosméticos. Pelas condições ambientais favoráveis, o aumento da produção dessa cultura torna promissor seu investimento no Brasil (TANGO e TURATTI, 1992; KOLLER, 2002; BORGES; MELLO, 2017). Nesse caso, a qualidade dos frutos é de extrema importância para que respondam às exigências do mercado, sendo necessários maiores investimentos e estudos (DONADIO, 1995).

2.2 Problemas de pós-colheita do abacate

Os danos pós-colheita podem se expressar desde o momento da colheita até o seu consumo e são classificados como de natureza física, fisiológica ou patológica (FISCHER et al., 2011).

As doenças pós-colheita ou podridão dos frutos em abacate, responsáveis por danos patológicos, causam inúmeros prejuízos a essa cultura, pois depreciam o fruto e inviabilizam seu consumo. Os fungos pertencentes à família Botryosphaeriaceae frequentemente estão relacionados a esse problema em diversas áreas ao redor do mundo (PEGG et al., 2002). Apesar de possuírem incidências menores em comparação a *Colletotricum sp.*, patógeno causador de antracnose, sua importância não deve ser subestimada. Embora sejam endofíticos, esses micro-organismos têm a capacidade de se tornar patogênicos quando o seu hospedeiro se encontra sob condições de estresse ou após sofrer danos químicos ou físicos (SLIPPERS e WINGFIELD, 2007; FISCHER et al., 2011).

Um fato agravante é que *Neofusicoccum* e *Lasiodiplodia*, gêneros pertencentes à família Botryosphaeriaceae, estão associadas a essa doença e normalmente ocorrem em conjunto. Além disso, podem ser associadas à antracnose, gerando um aumento nas perdas, pela decomposição mais rápida dos frutos (DARVAS, 1978).

2.3 Aspectos gerais da família Botryosphaeriaceae

Espécies pertencentes à família Botryosphaeriaceae possuem extrema importância agrícola, já que afeta uma ampla gama de hospedeiros, tanto lenhosos como não lenhosos (CROUS et al., 2017). Esses patógenos podem gerar inúmeros tipos de sintomas em diferentes partes da planta (CROUS et al., 2017).

No processo de infecção, os esporos sexuais e assexuais são transportados pelo vento, por respingos de água ou até mesmo pela formação de apressórios e colonizam o hospedeiro por meio de aberturas naturais como: estômatos, lenticelas e brotamentos (SWART et al., 1987; SLIPPERS e WINGFIELD, 2007; MEHL et al., 2013).

Como dito anteriormente, a expressão de doenças relacionadas a essa família está intimamente ligada ao estresse do hospedeiro ou tal condição é o gatilho para o seu desencadeamento (SLIPPERS & WINGFIELD, 2007; CROUS et al., 2017; SLIPPERS et al., 2017). Neste contexto, tem-se as mudanças climáticas somadas às alterações antropogênicas que exercem determinada pressão na comunidade de plantas e, como resultado, geram impactos negativos tanto na agricultura quanto silvicultura (DESPREZ-LOUSTAU et al., 2007; STURROCK et al., 2011; ZLATKOVIC et al., 2016).

Além disso, existem espécies na família Botryosphaeriaceae que são consideradas crípticas, tendo indivíduos com morfologia parecida ou até mesmo idêntica, porém com caminhos evolutivos e reprodutivos distintos total ou parcialmente (BICKFORD et al., 2006). Contudo, o conhecimento acerca da distinção desse tipo de espécie vem aumentando por meio do uso do método conhecido como concordância genealógica ou “*Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition* (GCPSR)”. Através de análises filogenéticas de diferentes *loci* polimórficos, compara-se a genealogia de genes como, por exemplo, a distinção de *Neofusicoccum karanda* do complexo *N. parvum* / *N. ribis* (TAYLOR et al., 2000; SAKALIDIS, HARDY e BURGESS, 2011).

2.4 Aspectos taxonômicos da família Botryosphaeriaceae

Taxonomicamente, a família Botryosphaeriaceae pertence ao Domínio Eukaryota; Reino Fungi; Filo Ascomycota; Classe Dothiomycetes e Ordem Botryosphaeriales (SCHOCH et al., 2006).

A classificação dos indivíduos pertencentes a essa família foi, durante muito tempo, confusa. Esse fato já foi justificado pela classificação das espécies, até o final dos anos 1990, serem baseadas principalmente em dados morfológicos que, no caso de Botryosphaeriaceae, são muito similares (CROUS et al., 2017).

Até o início da década de 2000, Botryosphaeriaceae era a única família pertencente à ordem Botryosphaeriales. Nesse agrupamento mais de 2000 nomes já foram englobados, incluindo estados telomórficos e anamórficos, sendo os principais representantes: *Diplodia*, *Botryosphaeria*, *Fusicoccum*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia* e *Sphaeropsis* (SLIPPERS et al., 2007).

Esse processo começou a sofrer modificações com Crous e colaboradores (2006) que, percebendo os diferentes organismos dentro de um mesmo grupo, propuseram mudanças que se baseassem, predominantemente, em fatores filogenéticos e características morfológicas assexuais (SLIPPERS et al., 2017). Somada à diversidade das estruturas assexuais dessas espécies, a classificação dos anamorfos é baseada nas características conidiais: tamanho, forma, cor, septação e maturação (SLIPPERS et al., 2004; CROUS et al., 2006, SLIPPERS e WINGFIELD, 2007). Características miceliais como o crescimento e a presença de pigmentos fundidos no meio de cultura também são utilizadas (SLIPPERS e WINGFIELD, 2007).

No entanto, pouco desses dados são levados em consideração atualmente dentro dessa ordem, sendo que a diversidade anteriormente descrita também pode ser encontrada dentro do conceito espécie (BARBER et al., 2005; CROUS et al., 2006; PHILLIPS et al., 2013; SLIPPERS et al., 2017).

Recentemente foram adotadas descrições como: hospedeiro, data de coleta, localização, patogenicidade, sintomas e taxa de crescimento sob determinadas condições de temperatura. Quando combinadas com dados genéticos, tornam-se mais úteis se comparadas com as características morfológicas (SLIPPERS, et al., 2017).

Desde então, novos estudos delinearão oito novas famílias baseadas em dados filogenéticos, morfológicos e ecológicos: Aplosporellaceae (SLIPPERS et al., 2013); Botryosphaeriaceae (CROUS et al., 2006); Endomelanopsisaceae (YANG et al., 2017); Melanopsaceae (SLIPPERS et al., 2013); Phyllostictaceae (WYKEE et al., 2013), Planistromellaceae (MINNIS et al., 2012) Pseudofusicoccumaceae (YANG et al., 2017); Saccharataceae (SLIPPERS et al., 2013) e Septorioideaceae (WYKA & BRODERS, 2016).

Nesse contexto, criou-se a declaração de Amsterdam para auxiliar estudos na área de fitopatologia. Tal código preconiza “*One fungus one name*” - Um fungo um nome (CROUS et al., 2006; WINGFIELD et al., 2012; CROUS et al., 2015). Ademais, o processo de classificação de alguns organismos deve obedecer ao código Internacional de Nomenclatura para algas, fungos e plantas (ICN) que delimita uma filogenia fidedigna e permite melhor descrição de futuras espécies (HAWKSWORTH et al., 2011; MCNEAL et al., 2012; CROUS et al., 2017; SLIPPERS et al., 2017). Sendo assim, a classificação de um organismo deve utilizar o conjunto de caracteres biológicos, morfológicos, ecológicos e patogênicos embasados por dados moleculares para o conhecimento do desenvolvimento e evolução dos micro-organismos (JACOBS et al., 1998; DENMAN et al., 2000).

Descobertas mais recentes, por meio de marcadores moleculares, mostraram espécies limítrofes entre gêneros, além de híbridos. Tal fato é amplamente discutido pela importância em futuras classificações. Assim, novos caracteres são necessários para delimitação entre espécies, evitando que novos táxons sejam híbridos (CROUS et al., 2017)

Atualmente, as mudanças na ordem Botryosphaeriales foram reconhecidas com 23 gêneros incluídos na família, além de várias espécies se mostrarem hospedeiro-específicas (CROUS et al., 2017).

2.5 Caracterização molecular da família Botryosphaeriaceae

A espécie pioneira no conceito de caracterização genética dentro de Botryosphaeriaceae foi *Botryosphaeria dothidea* (SLIPPERS et al., 2004). Essa

descoberta foi importante na caracterização de novos organismos dentro dessa família e possibilitou a abertura para diferentes clados em que a mesma espécie foi separada em diferentes gêneros (CROUS et al., 2006; SLIPPERS et al., 2004).

Recentemente, as técnicas moleculares, partindo do sequenciamento genético de regiões alvos de DNA, são as mais aceitas no processo de caracterização e relação filogenética de espécies pertencentes a Botryosphaeriaceae sobrepondo-se, principalmente, à caracterização morfológica (DEANMAN et al., 2000; PAVLIC et al., 2009a; PHILLIPS et al., 2013; SLIPPERS et al., 2014; SLIPPERS et al., 2017).

Partindo desse princípio, a classificação baseada no genoma é uma ferramenta que, além de gerar dados taxonômicos mais confiáveis, também auxilia no processo de quarentena (BURGESS et al., 2017). Além disso, essa família pode ser encontrada em estado endofítico, o que é difícil de ser detectado mesmo existindo sintomas. Assim, não se pode depender de identificações morfológicas subjetivas e classificações arcaicas para essa doença que se encontra em expansão (CROUS et al., 2016)

Essa preocupação é embasada na dispersão desses patógenos em escala global, fato que só pode ser explicado por ações humanas uma vez que seus esporos são pegajosos e sua disseminação depende, principalmente de chuva e vento e, em menor grau, por insetos (VAN NIEKERK et al., 2010, MEHL et al., 2013; MOYO et al., 2014; VALENCIA et al., 2015; SLIPPERS, 2017).

Partindo dessa problemática, alguns iniciadores são considerados pilares para as análises moleculares, sendo eles: a região do espaçador interno transcrito (ITS – 5,6S RNA), alfa elongase (1- α (EF1- α)), betatubulina (TUB) e RNA polimerase II. Estas são regiões consideradas essenciais para o desenvolvimento desses micro-organismos (COUTINHO, 2016).

Sendo assim, as avaliações moleculares basearam-se inicialmente no sequenciamento do ITS. Ademais, para gerar robustez aos dados, foram necessários seqüenciamentos de novos *loci* e atualmente, existem análises fundamentadas em até seis deles dependendo da espécie (SLIPPERS et al., 2017; YANG et al., 2017).

Em se tratando de Botryosphaeriaceae a combinação de dois *loci* é a mais utilizada na filogenia (ITS e alfa elongase). Porém, sabe-se que a região da alfa-

elongase pode não acontecer em todas as espécies, sendo necessários novos *loci* para o futuro sequenciamento (CRUYWAGEN et al., 2017).

Nesse caso, a região betatubulina (TUB) foi uma das alternativas para solucionar essa problemática, mas não foi o suficiente para todos os organismos. A partir daí, novos estudos utilizando a RNA polimerase II mostraram-se muito promissores, tendo visto que essa nova região consegue diferenciar espécies que até então eram consideradas muito próximas (PAVLIC et al., 2009; SAKALIDIS et al., 2011; YANG et al., 2017; SLIPPERS et al., 2017). McTaggart e colaboradores (2016) explicitaram a importância do conhecimento de todo o genoma para a compreensão da biologia desses organismos, auxiliando no entendimento da maquinaria molecular.

Somado a isso, genes do tipo *mating* (MAT) podem avaliar a compatibilidade de acasalamentos, além de determinar a dinâmica populacional e revelar as relações filogenéticas de espécies crípticas (COPPIN et al., 1997; KRONSTAD e STABEN, 1997; STEENKAMP et al., 2000; UENG et al., 2003; GROENEWALD et al., 2007; LEE et al., 2010; PÖGGELER et al. 2011; KASHYAP et al. 2014; LOPES et al., 2017)

Portanto, o desenvolvimento da caracterização molecular está cada vez mais robusto e o aprimoramento de técnicas gera ainda mais confiabilidade em futuras modificações taxonômicas, além de auxiliar nas tomadas de decisão para quarentenas e até mesmo no desenvolvimento de possível manejo para esses patógenos (MCTAGGART et al., 2016).

2.6 Gênero *Neofusicoccum*

Os fungos pertencentes ao gênero *Neofusicoccum*, anteriormente conhecidos como *Botryosphaeria*, com anamorfo *Fusicoccum*, estão inseridos na família Botryosphaeriaceae (CROUS et al., 2006; SLIPPERS e WINGFIELD, 2007; SAKALIDIS et al., 2013, LOPES et al., 2017).

Esse gênero possui uma ampla distribuição geográfica e uma vasta gama de hospedeiros, preferencialmente, plantas lenhosas de interesse comercial, agrícola e florestal (LOPES, 2017; SLIPPERS e WINGFIELD, 2007).

Relacionando o complexo *N. parvum* / *N. ribis* com a sua distribuição global, classifica-se *N. parvum* como espécie generalista, com cerca de 90 diferentes hospedeiros e sendo distribuída mundialmente. Por outro lado, *N. ribis* é restrita, sendo encontrada a partir de um único hospedeiro. O restante das espécies que entremeiam esse complexo tem menos hospedeiros comparadas a *N. parvum* e maior distribuição geográfica do que *N. ribis* (SAKALIDIS et al., 2013).

Atualmente, o gênero conta com 27 espécies, cuja identificação baseada em dados morfológicos é difícil. Segundo Lopes e colaboradores. (2017), o embasamento somente por meio desses dados pode gerar uma interpretação errônea ao longo do processo de classificação dos indivíduos, já que espécies crípticas geralmente são agrupadas.

Logo, a filogenia baseada em múltiplos genes já é empregada para a identificação de espécies crípticas desde 2004. Neste contexto, cinco novas espécies foram descritas dentro do complexo *N. parvum* / *N. ribis*, sendo elas *N. umdonicola*, *N. cordaticola*, *N. kwambonambiense* (PAVLIC et al., 2009a), *N. batangarum* (BEGOUDE et al., 2010) e *N. occulatum* (SAKALIDIS et al., 2011) (SAKALIDIS et al., 2013).

Recentes estudos, a partir de genes relacionados ao ciclo reprodutivo (MAT), foram realizados demonstrando a grande variabilidade entre indivíduos com diminuição dentre espécies estreitamente relacionadas, como é o caso de *Neofusicoccum parvum* e *N. ribis* (LOPES, et al., 2017). Neste sentido, a evolução de genes fúngicos estaria impulsionada por pressão de seleção (STERGIOPOLOUS et al., 2007).

Quanto ao ciclo reprodutivo dentro do gênero, existem espécies homotáticas e heterotáticas, sendo a primeira característica mais facilmente encontrada (LOPES et al., 2017). Além disso, *N. parvum* e *N. ribis* produzem tanto estruturas sexuais quanto assexuais em condições de campo, diferindo de outras espécies com somente estruturas assexuais (PENNYCOOK e SAMUELS, 1985; SLIPPERS et al., 2004; PAVLIC et al., 2007, PAVLIC-ZUPANG et al., 2015).

3 MATERIAL E MÉTODOS

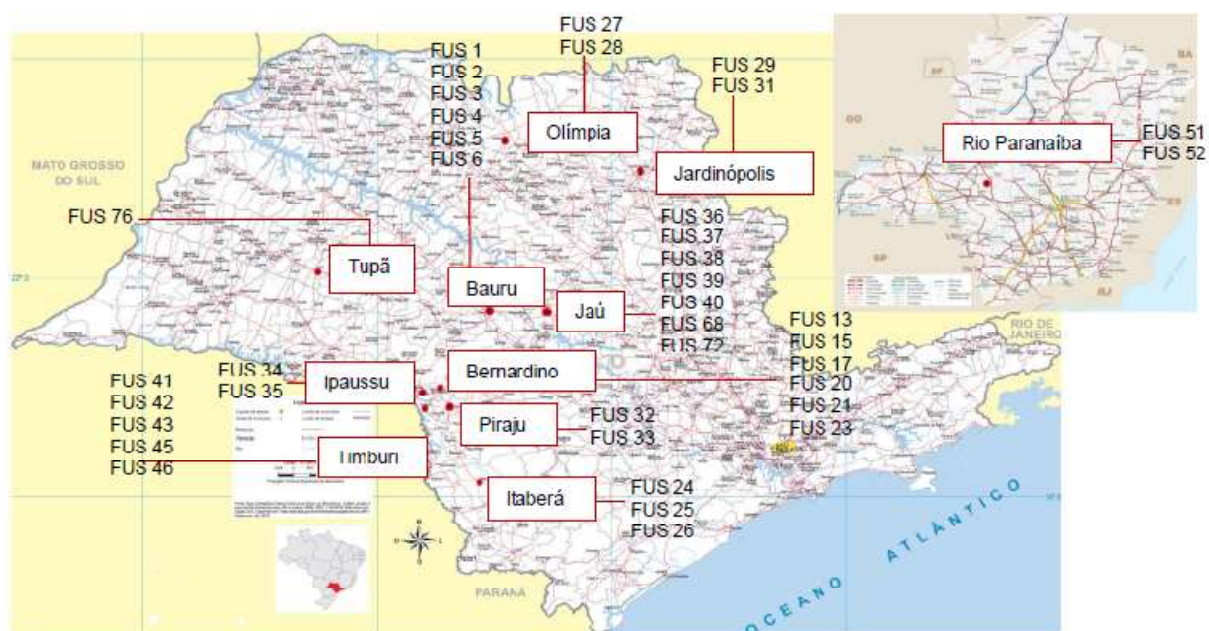
3.1 Local do experimento

Todos os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” – FCAT, Câmpus de Dracena.

3.2 Origem e obtenção dos isolados

Frutos de abacate foram obtidos na “*packing house*” da empresa Jaguaci, localizada na cidade de Bauru. Quarenta isolados do fungo da família Botryosphaeriaceae foram provenientes de onze cidades, sendo elas: Bauru - SP, Bernardino de Campos - SP, Itaberá - SP, Ipaussu - SP, Jardinópolis - SP, Jaú - SP, Olímpia - SP, Piraju - SP, Rio Paranaíba - MG, Timburi - SP e Tupã – SP (Figura 1).

Figura 1 Identificação e local de origem dos 40 isolados de espécies de Botryosphaeriaceae



Os abacates coletados foram colocados individualmente em bandejas plásticas e submetidos à câmara úmida durante 24 horas. Após esta etapa, os frutos

permaneceram por 14 dias a 25 °C em umidade relativa (UR) entre 70 – 75% até que os sintomas fossem evidentes.

Os fragmentos sintomáticos foram coletados e submetidos à desinfestação superficial, para tal, foram tratados em álcool 70% durante um minuto seguindo com submersão em hipoclorito de sódio a 2% por mais um minuto. Por fim, foi feita a lavagem com água destilada por um minuto. Os fragmentos desinfestados foram colocados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA – Batata Dextrose Ágar (2% de Ágar) e mantidos em câmaras de crescimento a 25 ± 1 °C em fotoperíodo alternado de 12 horas.

As colônias resultantes foram isoladas e lavadas com água destilada e autoclavada. As suspensões de esporos obtidas foram calibradas para aproximadamente 10^2 esporos/mL e, com o auxílio de uma alça de Drigalski, foram depositadas em placas contendo meio BDA contendo 0,05% de oxitetraciclina.

A individualização e transferência dos esporos para o meio MEA foi realizada em microscópio óptico com o auxílio de agulha entomológica a fim de se obter colônias monospóricas. Cabe ressaltar que a coleta, isolamento e obtenção dos isolados foram realizadas pelo Pesquisador Dr. Ivan Herman Fischer, da Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio (APTA), localizada na cidade de Bauru-SP.

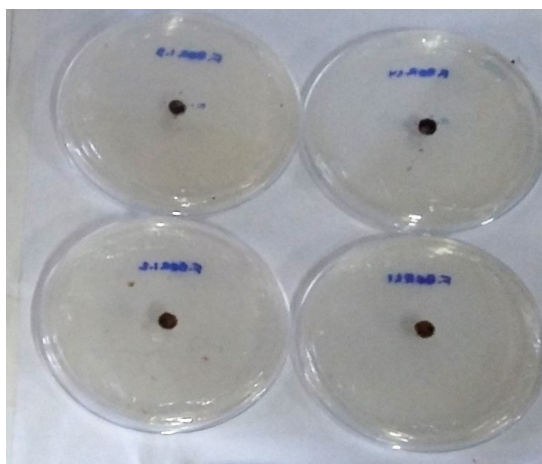
Para a preservação dos isolados, discos de micélio de aproximadamente 5 mm de diâmetro foram retirados e depositados em tubos contendo água destilada autoclavada. Esses tubos foram vedados com filme de PVC e mantidos à temperatura ambiente (CASTELLANI, 1939).

3.3 Caracterização cultural

A caracterização cultural foi baseada por: velocidade de crescimento micelial, coloração e presença de pigmentação difundida no meio de cultura (PHILLIPS, 2005; SLIPPERS et al., 2005).

Assim, discos de micélio de aproximadamente 5 mm de diâmetro, retirados da zona periférica de uma colônia cultivada durante cinco dias, foram transferidas para o centro de placas de Petri contendo meio BDA (Figura 2).

Figura 2 - Isolados de *Neofusicoccum parvum* em placas de Petri com meio BDA



Após a repicagem, os isolados foram incubados a 25 °C em fotoperíodo alternado de 12 horas. A avaliação de velocidade de crescimento foi determinada com medidas diárias de diâmetros perpendiculares da colônia por meio de régua milimetrada, com dados expressos em mm/dia. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições por isolado, sendo cada parcela experimental composta por uma placa de Petri. Já as características qualitativas (coloração micelial e presença de pigmentação difundida no meio de cultura), foram avaliadas todos os dias, a partir do surgimento da colônia até 14º dia após a repicagem. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as medias foram comparadas por meio de teste Skott – Knott em nível de 5% de probabilidade a partir do programa Sisvar.

3.4 Caracterização morfológica

Lâminas para microscopia foram preparadas com suspensões de conídios obtidas por culturas em meio MEA a 25 °C durante, aproximadamente, 60 dias. A morfologia foi determinada pelo tamanho, formato e cor dos esporos produzidos pelos isolados.

Foram avaliados 50 conídios por isolado, tendo o comprimento e largura mensurados em sistema de vídeo-câmera acoplado a um microscópio óptico, no aumento de 40x.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as medias foram comparadas por meio de teste Skott – Knott em nível de 5% de probabilidade a partir do programa Sisvar.

3.5 Caracterização patogênica

A patogenicidade dos isolados foi determinada por meio de inoculação de estruturas fúngicas em frutos sadios de abacate. Os frutos foram inicialmente lavados com sabão neutro e abundantemente enxaguados em água corrente. Posteriormente, foram submersos em hipoclorito de sódio a 1% durante cinco minutos e secos a temperatura ambiente.

Em seguida, a superfície do fruto foi ferida com um furador de rolha esterilizado de 5 mm de diâmetro e, por conseguinte, foram inoculados discos de meio BDA contendo micélios do fungo provenientes das extremidades de colônias cultivadas durante cinco dias sob luz contínua a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$.

A incubação dos frutos foi realizada no escuro com UR de 70-75% durante 7 dias. Além disso, frutos inoculados apenas com discos de meio BDA foram utilizados como testemunha. Ao final do experimento, os diâmetros perpendiculares das lesões foram mensurados com paquímetro.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento. Os resultados foram analisados por meio do teste de Skott – Knott ao nível de 5% de probabilidade no programa Sisvar.

3.6 Extração, amplificação e seqüenciamento de DNA

Na identificação dos isolados, foi realizada a extração de DNA seguida da reação em cadeia da polimerase (PCR) e, por fim, o sequenciamento dos fragmentos previamente obtidos.

Primeiramente, massas miceliais de cada isolado foram coletadas do meio de cultura BDA sólido, sendo que essas amostras foram mantidas durante cinco dias a 25 °C em fotoperíodo alternado de 12 horas. Assim, foi realizada uma raspagem da superfície do meio de cultura contendo a massa micelial, sendo transferida para tubos de microcentrifuga de 1,5 mL.

A extração de DNA seguiu o protocolo proposto por Murray e Thompson (1980), com algumas modificações. A massa micelial foi macerada com 500 µL de tampão de extração CTAB (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1,4 M NaCl; 0,02M EDTA; 2% CTAB e 0,2% β-mercaptoetanol). Então, os tubos foram incubados a 65 °C durante 30 minutos e 500 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (1:1) foram adicionados. Os tubos foram homogeneizados manualmente por agitação por dez minutos e centrifugados a 10.000 rpm durante dez minutos.

A fase aquosa foi removida para novos tubos contendo 500 µL de isopropanol e, subsequentemente, foram centrifugados a 12.000 rpm por dez minutos. Foi descartado o sobrenadante e o “pellet” lavado com 500 µL de etanol 70%. A mistura foi novamente centrifugada durante dez minutos a 10.000 rpm, tendo novamente o sobrenadante descartado e o precipitado seco naturalmente à temperatura ambiente e, posteriormente, ressuspenso em 100 µL de água contendo DEPC (dietilpirocarbonato) .

O DNA genômico extraído foi utilizado como molde para a amplificação de partes de duas regiões: região do espaçador interno transcrito (ITS), utilizando oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990) e a região gênica alfa-elongase por meio do par de primers TEF1-728F e TEF1-986R (CARBONE e KOHN., 1999).

Para a amplificação da região ITS, foram utilizados 30 ng de DNA total extraído, tampão 1X enzima GoTaq DNA polimerase (Promega®), 2mM MgCl₂, 0,2 mM de cada primer (sense e anti-sense) e 1,25 U de GoTaq DNA polimerase (Promega®). O volume foi ajustado para 50 µL com água tratada com DEPC.

As reações foram realizadas em termociclador (Biorad®) seguindo as condições: 94 °C por 2 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 35 segundos para desnaturação,

anelamento 52 °C durante 1 minuto e extensão 72 °C por 1 minuto, por fim 72 °C por mais 15 minutos.

Já na amplificação da alfa elongase, foram utilizadas 25 ng de DNA total extraído, 25 µL de Taq DNA Polymerase 2X Master Mix (Ampliqon®) e 0,25 mM de cada primer. As condições para a amplificação foram: 96 °C por 1 minuto, 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos para desnaturação, anelamento 58 °C durante 1 minuto e extensão 72 °C por 1,5 minutos, terminando com 72 °C por mais 10 minutos.

Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2,0% contendo tris borato EDTA 1X, corado com brometo de etídio e observados sob luz UV. As análises de sequenciamento foram realizadas no Centro de Genoma Humano da Universidade de São Paulo (USP) com 100µL do produto da PCR previamente purificado com o kit “*SV Gel and PCR Clean UP system*” (Promega®).

Logo, as sequências obtidas foram editadas por meio do software BioEdit Sequence Alignment Editor (1997-2017) sendo utilizadas como moldes na procura de sequências similares pelo software Blastn pertencente ao NCBI (*National Center for Biotechnological Information*). Partindo desses dados, foram levantadas as espécies encontradas e também sua frequência.

3.7 Análises filogenéticas

As sequências previamente editadas foram alinhadas no software Mega 5.05 (TAMURA et al., 2011). Somado a respectivamente 24 e 26 sequências, ITS e Alfa elongase, de espécies pertencentes à família Botryosphaeriaceae previamente depositadas no GenBank também foram incluídas nas avaliações filogenéticas (MOHALI et al., 2006)(Tabela 1).

Tabela 1 - Isolados disponíveis no GeneBank utilizados para o estudo de filogenia (MOHALI et al., 2006)

Espécie	Isolado	Hospedeiro	Origem	GenBank (ITS)	GenBank (1-Alfa)
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	CMW7780	<i>Fraxinus Excelsior</i>	Suíça	AY236947	AY236896
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	CMW7999	<i>Ostrya sp.</i>	Suíça	AY236948	AY236897
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	CMW8000	<i>Prunus sp.</i>	Suíça	AY236949	AY236898
<i>Botryosphaeria parva</i>	CMW9077	<i>Actinidia deliciosa</i>	Nova Zelândia	-	AY236884
<i>Botryosphaeria parva</i>	CMW9078	<i>Actinidia deliciosa</i>	Nova Zelândia	AY236940	AY236885
<i>Botryosphaeria parva</i>	CMW9079	<i>Actinidia deliciosa</i>	Nova Zelândia	AY236941	AY236886
<i>Botryosphaeria parva</i>	CMW9080	<i>Populus nigra</i>	New Zealand	AY236942	AY236887
<i>Botryosphaeria parva</i>	CMW9081	<i>Populus nigra</i>	New Zealand	-	AY236888
<i>Botryosphaeria ribis</i>	CMW7772	<i>Ribes sp.</i>	Nova Iorque	AY236935	AY236877
<i>Botryosphaeria ribis</i>	CMW7773	<i>Ribes sp.</i>	Nova Iorque	AY236936	AY236878
<i>Botryosphaeria ribis</i>	CMW7054	<i>Ribes sp.</i>	Nova Iorque	AF241177	AY236879
<i>Botryosphaeria lútea</i>	CMW9076	<i>Malus domestica</i>	Nova Zelândia	AY236946	AY236893
<i>Botryosphaeria lútea</i>	CMW992	<i>Actinidia deliciosa</i>	Nova Zelândia	AF027745	AY236894
<i>Fusicoccum mangiferum</i>	CMW7801	<i>Mangifera indica</i>	Australia	AY615187	-
<i>Fusicoccum mangiferum</i>	CMW7024	<i>Mangifera indica</i>	Australia	AY615185	-
<i>Botryosphaeria eucalyptorum</i>	CMW10125	<i>Eucalyptus grandis</i>	África do Sul	AF283686	AY236891
<i>Botryosphaeria eucalyptorum</i>	CMW10126	<i>Eucalyptus grandis</i>	África do Sul	AF283687	AY236892
<i>Fusicoccum andinum</i>	CMW13446	<i>Eucalyptus sp</i>	Venezuela	DQ306263	DQ306264
<i>Fusicoccum andinum</i>	CMW13455	<i>Eucalyptus sp</i>	Venezuela	AY693976	AY693977
<i>Fusicoccum stromaticum</i>	CMW13434	<i>Eucalyptus hibrido</i>	Venezuela	AY693974	AY693975
<i>Fusicoccum stromaticum</i>	CMW13435	<i>Eucalyptus hibrido</i>	Venezuela	DQ436935	DQ436936
<i>Botryosphaeria stevensii</i>	CMW7060	<i>F. Excelsior</i>	Noruega	AY236955	AY236904
<i>Botryosphaeria obtusa</i>	CMW7774	<i>Ribes sp.</i>	Nova Iorque	AY236953	AY236902
<i>Botryosphaeria obtusa</i>	CMW7775	<i>Ribes sp.</i>	Nova Iorque	AY236954	AY236903
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	CMW9074	<i>Pinus sp.</i>	México	AY236952	AY236901
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	CMW10130	<i>Vitex donniana</i>	Uganda	AY236951	AY236900
<i>Bionectria sp.</i>	CMW7063	Desconhecido	Noruega	-	AY236905
<i>Neofusicoccum umdonicola</i>	CMW28412	<i>Mangifera indica</i>	África do Sul	KU997418	-
<i>Neofusicoccum umdonicola</i>	CMW14106	<i>Syzygium cordatum</i>	África do Sul	-	KX464759

A filogenia foi realizada por meio do método “*Neighbor-Joining*” (SAITOU; NEI, 1987). A árvore consenso foi inferida a partir de 10.000 repetições de “*bootstrap*”, tendo as suas distâncias evolutivas calculadas utilizando o método Jukes-Cantor (JUNKES; CANTOR, 1969).

4 RESULTADOS

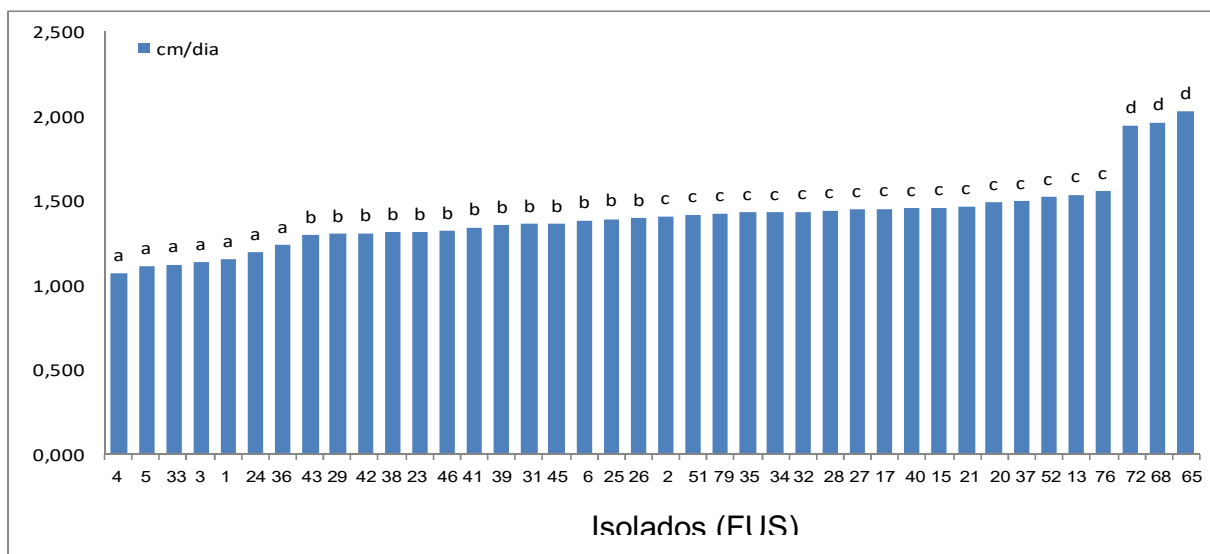
4.1 Caracterização cultural

Todas as colônias apresentaram micélio aéreo, cottonoso e, inicialmente, de coloração branca. A partir do terceiro dia após a transferência em placa, essas estruturas mudaram de cor se tornando acinzentadas. Após seis dias, foi possível observar a mudança de cor da colônia, que passou de cinza para negra (Figura 3).

Figura 3 – Coloração de *Neofusicoccum parvum*. A. Dois dias de incubação, B. e C. Seis dias de incubação e pigmentação do meio de cultura BDA



Comparando as amostras que resultaram no menor crescimento houve um predomínio das amostras originárias de Bauru (FUS4, FUS 5, FUS FUS 33, FUS 1, FUS 24 e FUS 36). Para as amostras que apresentaram maior crescimento, notou-se que aquelas provenientes de Jaú foram maioria (FUS 65, FUS 68 e FUS 72) (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Crescimento micelial dos isolados de *Neofusicoccum* (cm/dia)

*Médias comparadas pelo teste de Scott-Knott com agrupamentos diferenciados por letras e a nível de significância de 5%, CV=7,56

4.2 Caracterização morfológica

Somente os isolados FUS 68 e FUS 72 não esporularam sobre o meio de cultura MEA.

Não houve diferenças na morfologia dos conídios, sendo classificados como hialinos, de parede fina, geralmente asseptados ou podendo apresentar septos quando maduros e fusiformes (Figura 4). A presença de picnídios também não foi um fator determinante para a separação entre as espécies.

Em relação ao tamanho dos conídios, foi observada ampla variação quando todos os isolados foram comparados. Tendo o comprimento médio variando de 9,56 μm a 13,83 μm , a largura média variou 6,43 μm a 12,48 μm , já a relação comprimento e a largura as variações foram 0,72 μm a 1,73 μm (Tabela 2). Pode-se ressaltar que a quantidade de estruturas assexuadas era visivelmente maior em *N. parvum* se comparada às outras espécies.

Figura 4 – Características dos conídios de *Neofusicoccum parvum*. A. Conídios hialinos e asseptados, B. presença de septo e coloração castanha



Tabela 2 – Dimensões e desenvolvimento de picnídios dos conídios dos isolados de *Neofusicoccum*

Isolado	Dimensões			Picnídios
	Comprimento (µm)	Largura (µm)	C/L	
FUS 1	11,13 b	8,78 b	1,27	ausente
FUS 2	9,56 a	6,43 a	1,49	ausente
FUS 3	10,74 b	8,00 b	1,34	presente
FUS 4	10,34 a	11,13 d	0,93	ausente
FUS 5	11,13 b	11,13 d	1,00	ausente
FUS 6	9,95 a	8,39 b	1,19	ausente
FUS 13	11,13 b	10,05 c	1,11	presente
FUS 15	10,34 a	9,96 c	1,04	ausente
FUS 17	11,13 b	9,17 b	1,21	presente
FUS 20	11,67 b	10,35 c	1,13	presente
FUS 21	11,40 b	10,23 c	1,12	presente
FUS 23	11,67 b	10,35 c	1,13	ausente
FUS 24	11,13 b	9,96 c	1,12	ausente
FUS 25	11,94 b	11,94 d	1,00	presente
FUS 26	11,13 b	9,96 c	1,12	ausente
FUS 27	11,40 b	11,13 d	1,02	ausente
FUS 28	13,29 d	11,94 d	1,11	presente
FUS 29	9,57 b	11,28 c	0,85	presente
FUS 31	11,13 b	9,17 b	1,21	ausente
FUS 32	13,29 d	10,74 d	1,24	presente
FUS 33	11,13 b	6,82 a	1,63	presente
FUS 34	11,13 b	11,13 d	1,00	ausente
FUS 35	11,13 b	9,57 c	1,16	presente
FUS 36	11,13 b	8,39 b	1,33	presente
FUS 37	11,40 b	11,13 d	1,02	presente
FUS 38	11,40 b	9,57 c	1,19	presente
FUS 39	11,40 b	8,00 b	1,43	presente
FUS 40	12,21 c	11,13 d	1,10	presente
FUS 41	13,51 d	12,48 d	1,08	presente
FUS 42	11,13 b	11,13 d	1,00	ausente
FUS 43	11,13 b	8,00 b	0,72	ausente
FUS 45	12,63 c	11,13 d	1,13	ausente
FUS 46	11,67 b	7,60 b	1,54	ausente
FUS 51	13,14 d	9,74 c	1,35	ausente
FUS 52	13,83 d	11,13 d	1,24	presente
FUS 65	13,29 d	11,67 d	1,14	presente
FUS 76	11,40 b	9,96 c	1,15	ausente
FUS 79	11,13 b	6,43 a	1,73	presente

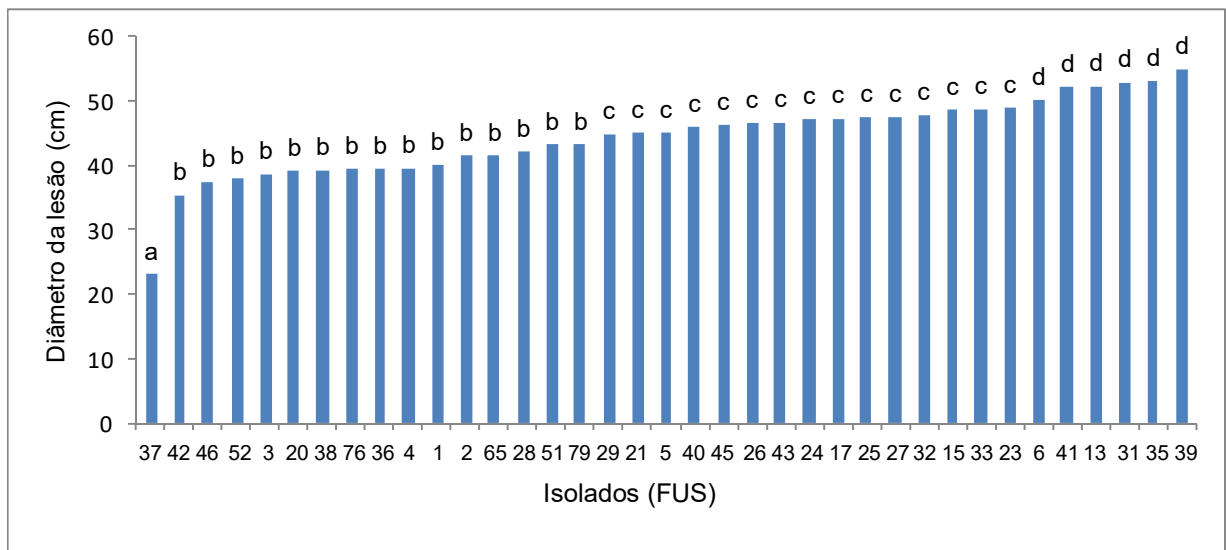
*C/L – Relação comprimento por largura

4.3 Caracterização patogênica

Todos os isolados se mostraram patogênicos quando inoculados em frutos sadios de abacate (Gráfico 2). Entretanto, percebe-se que o isolado FUS 37 ocasionou menor lesão. Esse isolado é pertencente à cidade de Jaú.

Além disso, os dois isolados caracterizados com uma espécie diferente de *N. parvum* (FUS 4, FUS 29) entremeiam as taxas de crescimento que agrupam estatisticamente os indivíduos representados pelas letras B e C no gráfico 3.

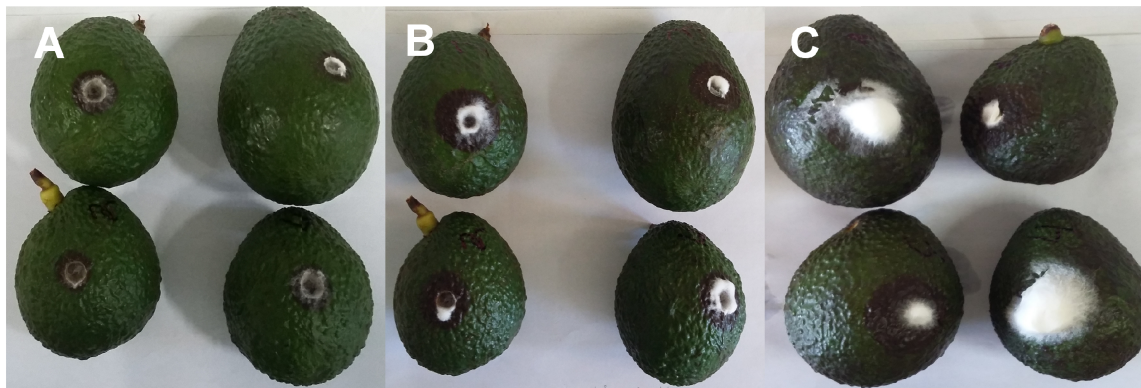
Gráfico 2 - Diâmetro de lesões (cm) provenientes de isolados de *Neofusicoccum* 4 dias após a inoculação em abacate



*Médias comparadas pelo teste de Scott-Knott com agrupamentos diferenciados por letras e a nível de significância de 5%, CV=10,33.

Em se tratando do progresso da doença, observou-se que não houve período de latência. Um dia após a inoculação dos micro-organismos já se observava o desenvolvimento de micélio, sendo que, no quarto dia, o fruto estava tomado pelo fungo (Figura 5).

Figura 5 - Frutos de abacate após um dia (A), dois (B) e quatro dias (C) após a inoculação com *Neofusicoccum parvum*



Sendo assim, a caracterização patogênica não foi um fator determinante no processo de diferenciação dos isolados em questão.

4.4 Análise molecular

Dos 40 isolados obtidos, somente dois não foram sequenciados, devido a problemas na amplificação dos fragmentos de DNA. Contudo, pelo sequenciamento da região ITS do DNA foi possível verificar que 95% das amostras pertenciam à espécie *N. parvum*.

Neste sentido, a amostra FUS 29 foi identificada como *N. ribis* e a FUS 04 como *N. umdonicola*. Salienta-se que esse foi o primeiro relato de *N. umdonicola* como agente causal de podridão pós-colheita em abacate no Brasil.

Com base na árvore filogenética da região ITS houve a formação de 12 clados: (I) *Neofusicoccum parvum* (anam. *Botryosphaeria parva*), (II) *Neofusicoccum umdonicola*, (III) *Neofusicoccum ribis* (anam. *Botryosphaeria ribis*), (IV) *Neofusicoccum mangiferae*, (V) *Botryosphaeria lutea*, (VI) *Botryosphaeria* sp., (VII) *Fusicoccum stromaticum*, (VIII) *Fusicoccum andinum*, (IX) *Botryosphaeria dothidea* (anam. *Fusicoccum aesculi*), (X) *Botryosphaeria rhodinia*, (XI) *Botryosphaeria stevensi*, e (XII) *Botryosphaeria obtusa*.

Não foi possível realizar correlação da filogenia com as regiões geográficas dos isolados estudados. Contudo, estes foram agrupados conforme a espécie (Figura 6).

Assim, 38 isolados obtidos a partir desse estudo são agrupados no clado (I) como *Neofusicoccum parvum* e apenas um isolado (FUS04) reside no clado (II): *Neofusicoccum umdonicola*. O último isolado (FUS29) foi posicionado no clado (III) como *Neofusicoccum ribis*, contudo, quando suas sequências foram comparadas no programa Blast do NCBI, a similaridade gerada foi de 99% para *Neofusicoccum* sp., *Neofusicoccum umdonicola* e *Neofusicoccum ribis*, justificando sua posição na árvore.

Com a filogenia realizada partir da região Alfa elongase, formaram-se 12 clados: (I) *Neofusicoccum umdonicola*, (II) *Neofusicoccum parvum* (anam. *Botryosphaeria parva*), (III) *Neofusicoccum ribis* (anam. *Botryosphaeria ribis*), (IV) *Fusicoccum andinum*, (V) *Botryosphaeria lutea*, (VI) *Botryosphaeria eucaliptorum*, (VII) *Botryosphaeria dothidea* (anam. *Fusicoccum aesculi*), (VIII) *Fusicoccum stromaticum*, (IX) *Botryosphaeria rhodinia*, (X) *Botryosphaeria stevensi*, (XI) *Botryosphaeria obtusa* (XII) *Hypocreales* sp.

Dos 38 isolados previamente selecionados para a região ITS, 33 foram sequenciados para a região alfa elongase (1- α) sendo que algumas amostras não proporcionaram resultados satisfatórios nas análises de PCR. Sendo assim, foram agrupados no clado (I) como *Neofusicoccum umdonicola* (FUS04), no clado (II): *Neofusicoccum parvum* (31) e clado (III) *N. ribis*. Os dados da árvore filogenética dessa região (Figura 7) corroboraram com os da primeira (Figura 6).

Figura 6 – Árvore filogenética da região ITS dos isolados de Bostryosphaeriaceae

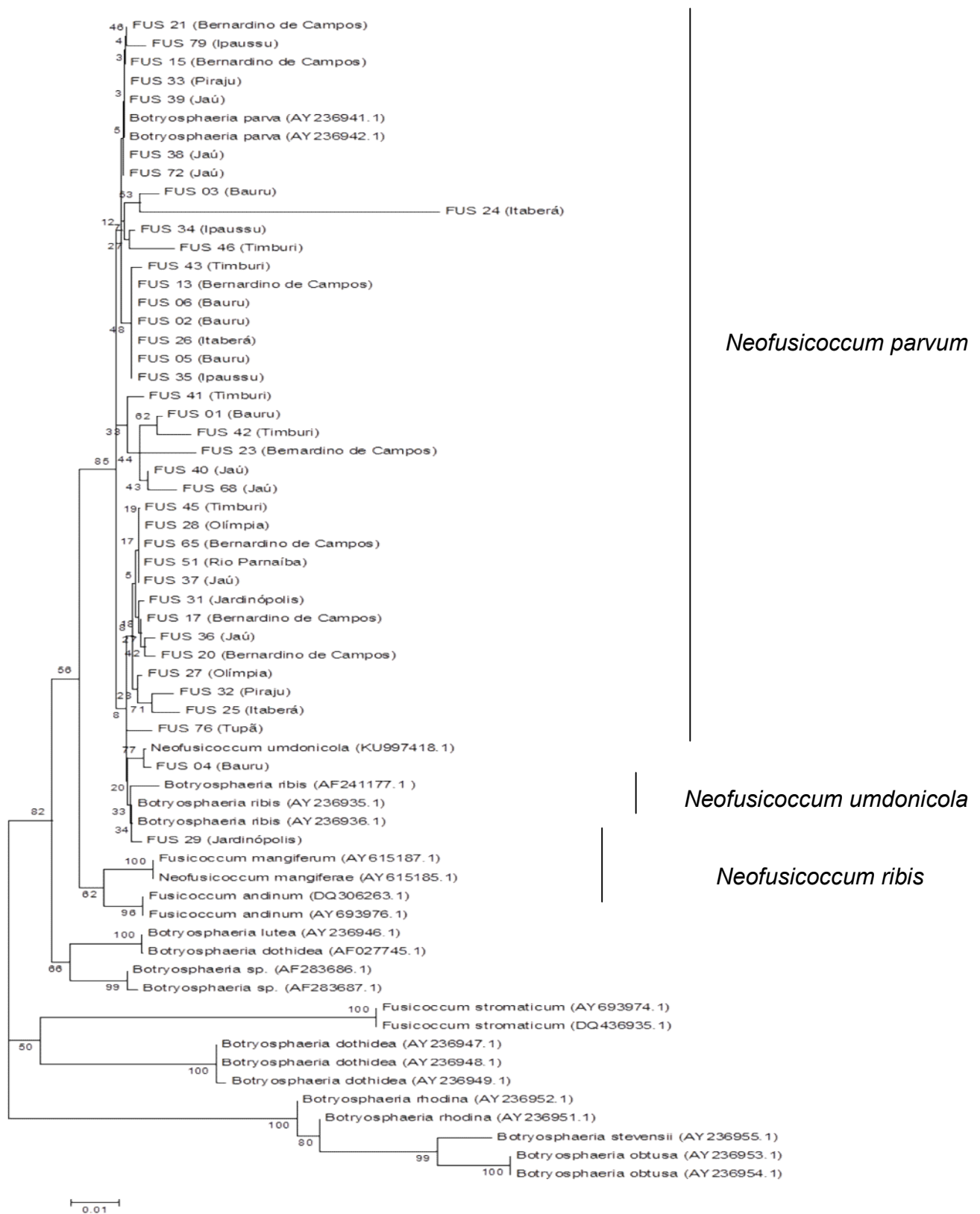
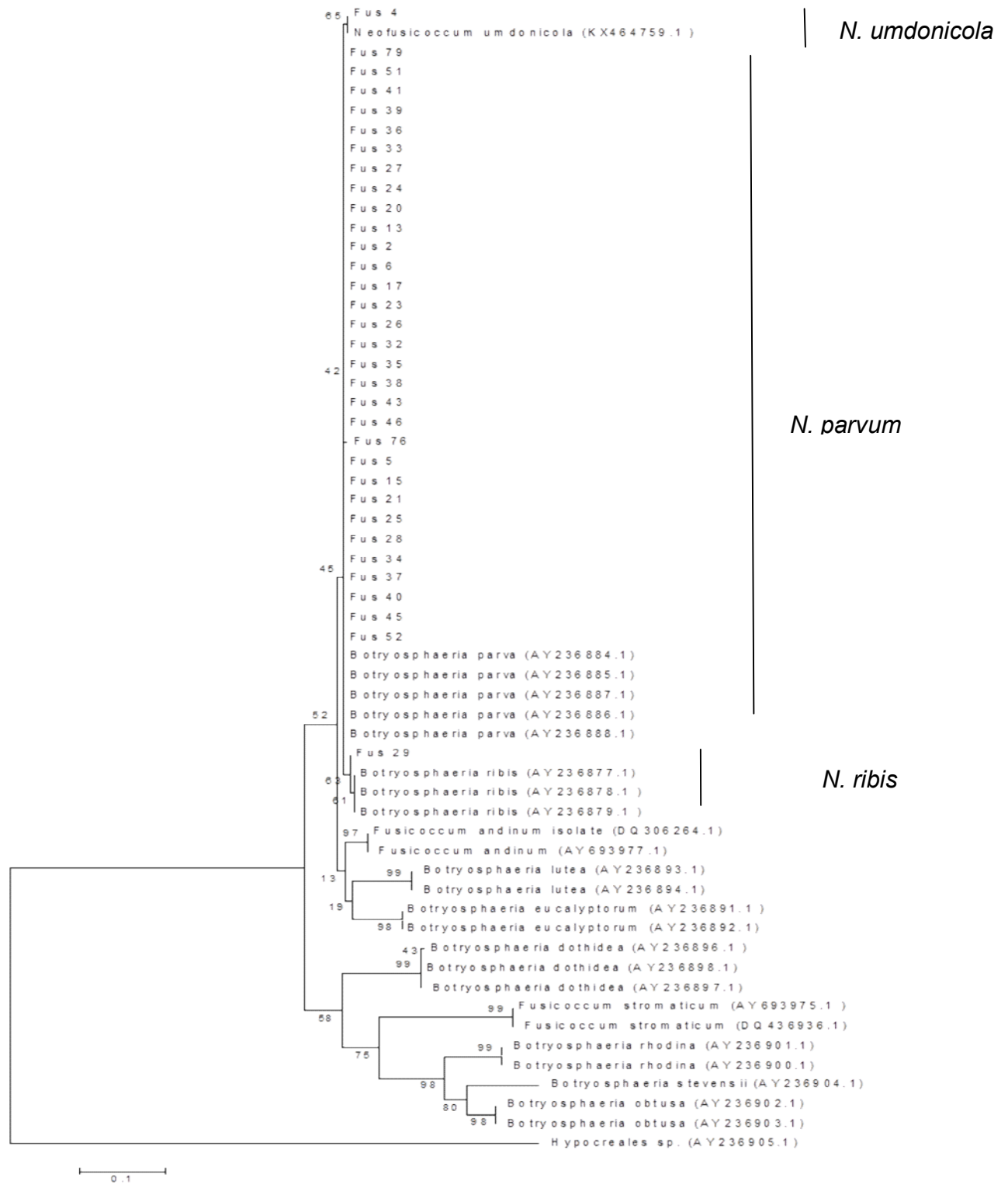


Figura 7 – Árvore filogenética de parte do gene da alfa elongase dos isolados de Bostryosphaeriaceae



5 DISCUSSÃO

Das três espécies detectadas, *Neofusicoccum parvum* foi previamente apresentadas em frutos de abacate por Firmino e colaboradores (2016), *Neofusicoccum ribis* foi relacionada à goiaba (NOGUEIRA JÚNIOR, 2015) e *Neofusicoccum umdonicola* até então não relatado no Brasil em frutos de abacate.

As técnicas de caracterização cultural não foram efetivas na distinção entre as espécies. A morfologia dos micélios e a pigmentação do meio de cultura foram indistinguíveis e houve diferenciação das taxas de velocidade de crescimento. Contudo, não se relacionou à filogenia e nem à geografia dos locais de coleta.

Esses dados justificaram-se pela maioria das espécies se caracterizarem por *N. parvum*. Além disso, juntamente com *N. umdonicola* e *N. ribis* tratam-se de um complexo de espécies com morfologias dificilmente distinguíveis.

Segundo Crous e colaboradores (2006b), alguns desses complexos são considerados sem distinção morfológica dependendo unicamente de dados baseados na região ITS sozinhos ou associados com outros *loci* para a identificação inequívoca das espécies. Atualmente, as características morfológicas não têm mais credibilidade na distinção entre essas espécies devido à similaridade entre elas (SLIPPERS et al., 2017).

O mesmo ocorreu com os dados de patogenicidade, tendo diferenciação significativa entre os diâmetros da lesão sem a possibilidade de ser relacionada às espécies e também ao local de origem.

A variação no comprimento das lesões, principalmente em *N. parvum*, refletem um alto grau na variabilidade genética desses organismos, que somado a grande pressão ambiental sofrida pela comunidade de plantas resultam em estresse e maior facilidade no desenvolvimento da doença. Sendo a variação genética intrinsecamente ligada ao controle do patógeno em campo.

Casos de variabilidade genética já foram relatados em isolados de *N. parvum* em vinhedos localizados na Nova Zelândia, tendo sugerido estudos específicos que correlacionem a diversidade genética à virulência desse gênero. Além disso, a relação das condições ambientais no desenvolvimento de áreas infectadas é amplamente

discutido pela comunidade científica (SLIPPERS et al., 2017; CROUS et al., 2017; BASKARATHEVAN et al., 2011).

Morfologicamente, os conídios não apresentaram diferença nas suas características, assim como em suas dimensões não permitindo conclusões relacionadas às espécies encontradas. No entanto, o tempo de cultivo foi muito maior se confrontado com trabalho anterior (MOHALI et al., 2006).

Se comparadas a outros estudos, as dimensões conidiais se mostraram menores esse fato que pode ser relacionado ao tempo de desenvolvimento dessa estrutura que em um mesmo isolado variaram consideravelmente (SLIPPERS et al., 2004).

As análises moleculares das regiões ITS e alfa elongase foram suficientes para o distanciamento de espécies do complexo *N. parvum*/*N. ribis*. Nesse contexto, foram identificadas três espécies diferentes: *N. parvum*, *N. umdonicola* e *N. ribis*.

Apesar de trabalhos utilizarem até cinco genes para a completa separação dessas espécies Sakalidis e colaboradores (2013) afirmaram que uma clara separação em *Neofusicoccum parvum* ocorre apenas com o uso da região ITS (PAVLIC et al., 2009b).

Observou-se que 95% dos isolados foram identificados como *N. parvum*, seguidos de uma única espécie pertencente a *N. umdonicola* e uma classificada como *N. ribis*. Demonstrando superioridade de *N. parvum* dentro do gênero e indo de encontro a especiação de *N. ribis* e *N. umdonicola*.

Essa dominância pode ser ocasionada por ser um patógeno adaptado a diferentes condições ambientais e hospedeiros, com ampla dispersão e alta variabilidade genética, inibindo a disseminação de outras espécies.

N. parvum foi classificado como patógeno generalista, presente em diferentes climas e com aproximadamente 90 espécies hospedeiras conhecidas (SAKALIDIS et al., 2013). Além disso, é frequentemente relacionado em áreas ambientalmente degradadas e dificilmente são encontradas em ambientes não afetados, onde outras espécies desse complexo têm predominância (PAVLIC-ZUPANC et al. 2015; MEHL et al., 2017).

Dá-se então que o seu padrão de distribuição está relacionado a múltiplas introduções devido às atividades humanas via transferência de germoplasma por meio de práticas agrícolas e de horticultura (SAKALIDIS et al., 2013).

Apesar dos inúmeros estudos relacionados aos padrões de distribuição, pouco se sabe sobre a biologia desses micro-organismos e a introdução da doença em campo.

Portanto, a relação entre planta – patógeno, a patogenicidade sob condições de estresse e o reconhecimento do fungo no seu estado endofítico precisam ser respondidas para que o manejo ou até mesmo o controle da doença em campo possam ser desenvolvidos (SLIPPERS et al., 2017)

6 CONCLUSÕES

De acordo com as caracterizações, o crescimento micelial permitiu a distinção entre quatro grupos. Além disso, as análises patogênicas também apontaram a presença de quatro grupos de isolados. Contudo, morfologicamente não houve diferenciação entre as espécies.

Porém a partir de caracterização molecular foram identificadas três espécies de Botryosphaeriaceae pertencentes ao gênero *Neofusicoccum* e relacionadas à podridão pós-colheita de abacate: *Neofusicoccum parvum*, *Neofusicoccum ribis* e *Neofusicoccum umdonicola*. Ressalta-se que esse foi o primeiro relato de *Neofusicoccum umdonicola* relacionados a abacate no Brasil.

REFERÊNCIAS

ALVES, A.; CROUS, P. W.; CORREIA, A.; PHILLIPS, A. J. L. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 28, p. 1-13, 2008.

ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2017.

BARBER, P. A.; BURGESS, T. J.; HARDY, G. E. S. J.; SLIPPERS, B.; KEANE, P. J.; WINGFIELD, M. J. Botryosphaeria species from *Eucalyptus* in Australia are pleoanamorphic, producing *Dichomera* synanamorphs in culture. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, p.1347-1363, 2005.

BEGOUDE, B. A. D.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; ROUX, Y. Botryosphaeriaceae associated with *Terminalia catappa* in Cameroon, South Africa and Madagascar. **Mycological Progress**, Berlim, v. 9, p. 101–123, 2010.

BERGH, B.O. Avocado (*Persea americana* Miller). FERWERDA F. P.; WITT, F. (Ed.). **Outlines of Perennial Crop Breeding in the Tropics**: miscellaneous papers. Wageningen: Landbouwhogeschool, 1969. v. 4, p. 23-51.

BICKFORD, D.; LOHMAN, D. J.; SODHI, N. S.; NG, P. K. L.; MEIER, R.; WINKER, K.; INGRAM, K. K.; DAS, I. Cryptic species as a window on diversity and conservation: Trends. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v.22, n.3, p.148-155, 2006.

BORGES, M. H. C.; MELO, B. **A cultura do abacateiro**. [S.l.: s.n.], 2017. Disponível em: <<http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/abacate.html>>. Acesso em: 12 nov.2017.

BASKARATHEVAN, J.; JASPERSE, M. V.; JONES, E. E.; CRUICKSHANK, R. H.; RIDGWAY, H. J. Genetic and pathogenic diversity of *Neofusicoccum parvum* in New Zealand vineyards. **Fungal Biology**, Oxford, v. 116, p. 276-288, 2012.

BURGESS T.I.; CROUS, C. J.; HANTULA, J.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J. Tree invasions and biosecurity: eco-evolutionary dynamics of hitchhiking fungi. **AoB Plants**, Oxford, v. 8, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/aobpla/plw076>>. Acesso em: 10 Ago, 2017.

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

CARVALHO, H. A.; CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B.; CARVALHO, H. S. Efeito da atmosfera modificada sobre componentes da parede celular da goiaba. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 3, p. 605-615, 2001.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 24, p. 270-276, 1939.

COUTINHO, I. B. L. **Caracterização molecular e controle de fungos da família Botryosphaeriaceae em frutíferas tropicais**. 2016. 140 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/19267>>. Acesso em: 10 ago. 2017.

COPPIN, E.; DEBUCHY, R.; ARNAISE, S.; PICARD, M. Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Nova Iorque, v. 61, p. 411-428, 1997.

CROUS, P. W.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; RHEEDER, J.; MARASAS, W. F. O.; PHILIPS, A. J. L.; ALVES, A.; BURGERS, T.; BARBER, P.; GROENEWALD, J. Z. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 55, p. 235-253, 2006.

CROUS, P. W. *Neofusicoccum*. **Genera of Phytopathogenic Fungi**, 2006. Disponível em: <<http://www.plantpathogen.org/homepage/neofusicoccum>>. Acesso em: 15 nov. 2017.

CROUS, P. W.; HAWKSWORTH, D. L.; WINGFIELD, M. J. Identifying and naming plant-pathogenic fungi: past, present, and future. **Annual Review of Phytopathology**, Lawrence, v. 53, p. 246-267, 2015.

CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J. Global food and fibre security threatened by current inefficiencies in fungal identification. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, Londres, v. 371, n. 1709, p. 1-7, 2016.

CROUS, P. W.; SLIPPERS, B.; GROENEWALD, J. Z.; WINGFIELD, M. J. Botryosphaeriaceae: Systematics, pathology, and genetics. **British Mycological Society**, Oxford, v. 121, p. 305-306, 2017.

CRUYWAGEN, E. M.; SLIPPERS, B.; ROUX, J.; WINGFIELD, M. J. Phylogenetic species recognition and hybridisation in *Lasiodiplodia*: a case study on species from baobabs. **Fungal Biology**, Oxford, v. 121, p. 420-436, 2017.

DARVAS, J. M. Common root pathogens from avocados. **South African Avocado Growers' Association Research Report**, Lancaster, v. 2, p. 3-4, 1978.

DENMAN, S.; CROUS, P. W.; TAYLOR, J. E.; KANG, J. C.; PASCOE, I.; WINGFIELD, M. J. An overview of the taxonomic history of Botryosphaeria and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 45, p. 129-140, 2000.

DESPREZ-LOUSTAU, M. L.; ROBIN, C.; REYNAUD, G.; DÉQUÉ, M.; BADEAU, V.; PIOU, D.; HUSSON, C.; MARÇAIS, B. Simulating the effects of a climate-change scenario on the geographical range and activity of forest-pathogenic fungi. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v.29, p.101-120, 2007.

DONADIO, L. C. **Abacate para exportação**: aspectos técnicos da produção. 2. ed. Brasília, DF: EMBRAPA – SPI. 1995. 53 p. (Publicações Técnicas FRUPEX, 2).

FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, London, v.39, p.783-791, 1985.

FIRMINO, A. C.; FISCHER, I. H.; TOZZE-JÚNIOR, H. J.; ROSA, D. D.; FURTADO, E. D. Identificação de espécies de *Fusicoccum* causadoras de podridão em frutos de abacate. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 42, n. 1, p. 100-102, 2016.

FISCHER, I. H.; TOZZE-JÚNIOR, H. J.; ARRUDA, M. C.; MASSOLA-JÚNIOR, N. S. Pós-colheita de abacates ‘Fuerte’ e ‘Hass’: características físicas e químicas, danos e controle de doenças. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.32, n.1, p. 209-220, 2011.

GROENEWALD, M.; BARNES, I.; BRADSHAW, R.E.; BROWN, A. V.; DALE, A.; GROENEWALD, J. Z.; LEWIS, K. J.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J.; CROUS, P. W. Characterization and distribution of mating type genes in the dothistroma needle blight pathogens. **Phytopathology**, São Paulo, v.97, p.825-834, 2007.

HAWKSWORTH, D. L. et al. The Amsterdam declaration on fungal nomenclature. **IMA Fungus**, Ashtead, p. 105-112, 2011.

HILLIS, D. M.; BULL, J. J. Na empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. **Systematic Biology**, Oxford, v. 42, p. 182-192, 1993.

JACOBS, K. A.; REHNER, S. A. Comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of *Botryosphaeria* and related taxa. **Mycologia**, Nova Iorque, v. 90, n.4, p. 601-610, 1998.

JUNKES, T. H.; CANTOR, C. R. Evolution of protein molecules. In: MUNRO, H. N.(Ed.). **Mammalian protein metabolism**. Nova Iorque: Academic Press, 1969. p. 21-132.

KNIGHT JR., R. J. History, distribution and uses. In: WHILEY, A. W.; SHAFFER, B.; WOLSENHOLME, B. N. (Ed). **The avocado**: Botany, Productions and Uses. Oxon: CABI Publishing, 2002. p. 1-14.

KOLLER, O.C. **Abaticultura**. 2. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1992. 138 p.

KASHYAP, P. L.; RAI, S.; KUMAR, S.; SRIVASTAVA, A. K.; ANANDARA, J. M.; SHARMA, A.K. Mating type genes and genetic markers to decipher intraspecific variability among *Fusarium udum* isolates from pigeon pea. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v.54, p.1-11, 2014.

KRONSTAD, J.W.; STABEN, C. Mating type in filamentous fungi. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v.31, p. 245-276, 1997.

LEE, S.C.; NI, M.; LI, W.; SHERTZ, C.; HEITMAN, J. The evolution of sex: a perspective from the fungal kingdom. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 74, p. 298-340, 2010.

LOPES, A.; PHILLIPS, A. J. L.; ALVES, A. Mating type in the genus *Neofusicoccum*: Mating strategies and usefulness in species delimitation. **Fungal Biology**, Oxford, v. 121, p. 394-404, 2017.

MCNEILL, J.; BARRIE, F.; BUCK, W.; DEMOULIN, V.; GREUTER, W.; HAWKSWORTH, D.; HERENDEEN, P.; KNAPP, S.; MARHOLD, K.; PRADO, J. International Code of Nomenclature for Algae, Fungi, and Plants (Melbourne Code) Adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia. **Regnum vegetabile**. Melbourne: Koeltz Scientific Books, 2012.

MCTAGGART, A. R.; VAN DER NEST, M. A.; STEENKAMP E.T.; ROUX, J.; SLIPPERS, B.; SHUEY, L.S.; WINGFIELD, M.J.; DRENTH, A. Fungal genomics challenges the dogma of name-based biosecurity. **PLOS Pathogens**, São Francisco, v.12, n. 5, 2016. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005475> >. Acesso em: 10 Ago, 2017.

MEHL, J.; SLIPPERS, B.; ROUX, J.; WINGFIELD, M.; GONTHIER, P.; NICLOTTI, G. Cankers and other diseases caused by the Botryosphaeriaceae. **Infectious Forest Diseases**, Amsterdam, p. 298-317, 2013.

MOHALI, S.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J. Two new *Fusicoccum* species from *Acacia* and *Eucalyptus* in Venezuela, based on morphology and DNA sequence data. **Mycological Research**, Cambridge, v. 110, p. 405-413, 2006.

MOYO, P.; ALLSOPP, E.; ROETS, F.; MOSTERT, L.; HALLEEN, F. Arthropods vector grapevine trunk disease pathogens. **Phytopathology**, São Paulo, v.104, p.1063-1069, 2014.

MINNIS, A. M.; KENNEDY, A. H.; GRENIER, D. B.; PALM, M. E.; ROSSMAN, A. Y. Phylogeny and taxonomic revision of the Planistromellaceae including its coelomycetous anamorphs: Contributions towards a monograph of the genus *Kellermania*. **Persoonia**, Utrecht, v. 29, p. 11-28, 2012.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. E. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Londres, v. 8, p. 4321-4325, 1980.

NOGUEIRA JÚNIOR, A. F. **Identificação de espécies de Botryosphaeriaceae e caracterização do monociclo da podridão apical da goiaba**. 2012. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências/Fitopatologia)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11135/tde-13032013-134444/pt-br.php>>. Acesso em: 10 ago. 2017

PAVLIC-ZUPANG, D.; WINGFIELD, M. J.; BOISSIN, E.; SLIPPERS, B. The distribution of genetic diversity in the *Neofusicoccum parvum* / *N. ribis* complex suggest structure correlated with level of disturbance. **Fungal Ecology**, Manchester, v. 13, p. 93-102, 2015.

PAVLIC, D.; SLIPPERS, B.; COUTINHO, T.A.; WINGFIELD, M. J. Botryosphaeriaceae occurring on native *Syzygium cordatum* in South Africa and their potential threat to Eucalyptus. **Plant Pathology**, Amsterdam, v.56, p.624-636, 2007.

PAVLIC, D.; SLIPPERS, B.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, M. J. Molecular and phenotypic characterization of three phylogenetic species discovered within the *Neofusicoccum parvum* / *N. ribis* complex. **Mycologia**, Nova lorque, v. 101, p. 636–647, 2009a.

PAVLIC, D.; SLIPPERS, B.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, M. J. Multiple gene genealogies and phenotypic data reveal cryptic species of the Botryosphaeriaceae: A case study on the *Neofusicoccum parvum* / *N. ribis* complex. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Maryland Heights, v. 51, p. 259-268, 2009b

PEGG, K.G.; COATES, L.M.; KORSTEN, L.; HARDING, R.M. Foliar, fruit and soil diseases. In: WHILEY, A.W.; SCHAFFER, B.; WOLSTENHOLME, B. N. (Ed.). **The avocado: botany, production and uses**. Wallingford: CAB International 2002. p. 299-338.

PENNYCOOK, S.R.; SAMUELS, G.J. Botryosphaeria and Fusicoccum species associated with ripe fruit rot of *Actinidia deliciosa* (Kiwifruit) in New Zealand. **Mycotaxon**, Nova lorque, v.24, p.445-458, 1985.

PERÉZ-JIMÉNEZ, R. M. Significant Avocado diseases caused by Fungi e Oomycetes. **The European Journal of Plant Science and Biotechnology**, Cambridge, v. 2, p. 1-24, 2008.

PHILLIPS, A. J. L.; ALVES, A.; CORREIA, A.; LUQUE, J. Two new species of *Botryosphaeria* with Brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. **Mycologia**, Nova lorque, v.97, n.2, p. 513-529, 2005.

PHILLIPS, A.; ALVES, A.; ABDOLLAHZADEH, J.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. GROENEWALD, J.; CROUS, P. The Botryosphaeriaceae genera and species known from culture. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 76, p. 51-167, 2013.

PÖGGELER, S.; O'GORMAN, C. M.; HOFF, B.; KÖUCK, U. Molecular organization of the mating-type loci in the homothallic ascomycete *Eupenicillium crustaceum*. **Fungal Biology**, Oxford, v.115, p. 615-624, 2011.

RODRIGUEZ, F.; OLIVER, J. F.; MARIN, A.; MEDINA, J. R. The general stochastic model of nucleotide substitutions. **Journal Molecular Evolution**, Rockville, v. 142, p. 485-501, 1990.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, Oxford, v. 19, p. 1572-1574, 2003.

SAKALIDIS, M. L.; HARDY, G. E. St. J.; BURGESS, T. I. Use of the Genealogical Sorting Index (GSI) to delineate species boundaries in the *Neofusicoccum parvum* / *Neofusicoccum ribis* species complex. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Maryland Heights, v. 60, p. 333–344, 2011.

SAKALIDIS, M. L.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, B. D.; HARDY, G. E. S. J.; BURGESS, T. I. The challenge of understanding the origin, pathways and extent of fungal invasions: global populations of the *Neofusicoccum parvum* / *N. ribis* species complex. **Diversity and Distributions**, West Sussex, v. 19, p. 873-883, 2013.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Maryland Heights, v. 4, p.406-425, 1987.

SCHOCH, C.L.; SHOEMAKER, R.A.; SEIFERT, K.A.; HAMBLETON, S.; SPATAFORA, J.W.; CROUS, P.W. A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. **Mycologia**, Nova lorque, v.98, p.1041–1052, 2006.

SLIPPERS, B.; CROUS, P. W.; DENMAN, S.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Combine multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. **Mycologia**, Nova lorque, v. 96, p. 83-111, 2004.

SLIPPERS, B.; JOHNSON, G. I.; CROUS, P. W.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Phylogenetic and morphological re-evaluation of the 32 *Botryosphaeria* species causing diseases of *Mangifera indica*. **Mycologia**, Nova lorque, v. 97, n.1, p. 99-110, 2005.

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

SLIPPERS, B.; BOISSIN, E.; PHILLIPS, A.; GROENEWALD, J.; LOMBARD, L.; WINGFIELD, M.; POSTMA, A.; BURGESS, T.; CROUS, P. Phylogenetic lineages in the Botryosphaerales: a systematic and evolutionary framework. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 76, p. 31-49, 2013.

SLIPPERS, B.; ROUX, J.; WINGFIELD, M. J.; VAN DER WALT, F. J. J.; JAMI, F.; MARAIS, G. J. Confronting the constraints of morphological taxonomy in the fungi: a Botryosphaeriaceae case study. **Persoonia**, Utrecht, v. 33, p. 155-168, 2014.

SLIPPERS, B.; CROUS, P. W.; JAMI, F.; GROENEWALD, J. Z.; WINGFIELD, M. J. Diversity in the Botryosphaerales: Looking back, looking forward. **Fungal Biology**, Oxford, v. 121, p. 307-321, 2017.

STEENKAMP, E. T.; WINGFIELD, B. D.; COUTINHO, T. A.; ZELLER, K. A.; WINGFIELD, M. J.; MARASAS, W. F. O.; LESLIE, J. F. PCR-based identification of MAT-1 and MAT-2 in the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.66, p. 4378-4382, 2000.

STERGIOPOULOS, I.; GROENEWALD, M.; STAATS, M.; LINDHOUT, P.; CROUS, P. W.; De WIT, P. J. G. M. Mating-type genes and the genetic structure of a world-wide collection of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. **Fungal Genetics and Biology**, Amsterdam, v. 44, p. 415-429, 2007.

STURROCK, R.; FRANKEL, S.; BROWN, A.; HENNON, P.; KLIEJUNAS, J.; LEWIS, K.; WORRALL, J.; WOODS, A. Climate change and forest diseases. **Plant Pathology**, Amsterdam, v. 60, p. 133-149, 2011.

SWART, W. J.; WINGFIELD, M. J.; KNOX-DAVIES, P. S. Factors associated with *Sphaeropsis sapinea* infection of pine trees in South Africa. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 19, p. 505–510, 1987.

SWOFFORD, D. L. Phylogenetic analysis using parsimony (*and others methods) Version 4. Sunderland: Sinauer Associates, 2003.

TANGO, J. S.; TURATTI, J. M. Óleo de abacate. In: ABACATE: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos. Campinas: ITAL, 1992. p. 156-192.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Maryland Heights, v.28, n. 10 , p. 2731-2739, 2011.

TAYLOR, J. W.; JACOBSON, D. J.; KROKEN, S.; KASUGA, T.; GEISER, D. M.; HIBBETT, D. S.; FISHER, M. C. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal Genetic Biology**, Amsterdam, v. 31, p. 21-32, 2000.

TEIXEIRA, C. G. Cultura do abacate. In: TEIXEIRA, C. G. BLEINROTH, E. W.; CASTRO, J. V.; MARTIN, Z. J.; TANGO, J. S.; TURATTI, J. M.; LEITE, R. S. S. F.; CASTRO, A. E. B. **Abacate**: cultura, matéria prima, processamento e aspectos econômicos. 2. ed. Campinas: ITAL, 1991. 250 p. (FrutasTropicais, 8).

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIK, F.; JEANMOUNGIN, F.; HIGGINS, D. G. The ClustalX Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Londres, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

UENG, P. P.; DAI, Q.; CUI, K. R.; CZEMBOR, P. C.; CUNFER, B. M.; TSANG, H.; ARSENIUK, E.; BERGSTROM, G. C. Sequence diversity of mating type genes in *Phaeosphaeria avenaria*. **Current Genetics**, Londres, v.43, p. 121-130, 2003.

VALENCIA, D.; TORRES, C.; CAMPS, R.; LOPEZ, E.; CELTIS-DIEZ, J. L.; BESOAIN, X. Dissemination of Botryosphaeriaceae conidia in vineyards in the semiarid Mediterranean climate of the Valparaíso Region of Chile. **Phytopathologia Mediterranea**, Roma, v.54, p.394-402, 2015.

VAN NIEKERK, J. M.; CALITZ, F. J.; HALLEEN, F.; FOURIE, P. H. Temporal spore dispersal patterns of grapevine trunk pathogens. **European Journal of Plant Pathology**, Amsterdam, v. 127, p. 375-390, 2010.

WINGFIELD, M. J.; DE BEER, Z. W.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, B. D.; GROENEWALD, J. Z.; LOMBARD, L.; CROUS, P. W. One fungus, one name promotes progressive plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, Nova Iorque, v. 13, p. 604-613, 2012.

WYKA, S.A.; BRODERS, K. D. The new family Septorioideaceae within the Botryosphaeriales and *Septorioides strobis* as a new species associated with needle defoliation of *Pinus strobus* in the United States. **Fungal Biology**, Oxford, v. 8, p. 1030-1040, 2016.

WIKKE, S.; LOMBARD, L.; NAKASHIMA, C.; MOTOHASHI, K.; CHUKEATIROTE, E.; CHEEWANGKON, R.; MCKENZIE, E.; HYDE, K.; CROUS, P. A phylogenetic re-evaluation of *Phyllosticta* (Botryosphaeriales). **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 76, p. 1-29, 2013.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T. J. (Ed.). **PCR protocols**: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-322.

YANG, T.; GROENEWALD, J. Z.; CHEEWANGKON, R.; JAMI, F.; ABDOLLAHZADEH, J.; LOMBARD, L.; CROUS, P. W. Families genera and species of Botryosphaeriales. **Fungal Biology**, Oxford, v. 121, p. 322-346, 2017.

YOUNG, N. D.; HEALEY, J. Gap Coder automates the use of indel characters in phylogenetic analysis. **BMC Bioinformatics**, Londres, v. 19., n. 1, p. 4-6, 2003.

ZLATKOVIC', M.; KECA, N.; WINGFIELD, M.; JAMI. F.; SLIPPERS, B. Shot hole disease on *Prunus laurocerasus* caused by *Neofusicoccum parvum* in Serbia., Berlim, v. 46, p. 666-669, 2016.