



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PROTEÇÃO DE PLANTAS**



FREDERICO MONTEIRO FEIJÓ

**ETIOLOGIA E PREVALÊNCIA DAS MANCHAS DE CLADÓDIOS DA PALMA
FORRAGEIRA MIÚDA NOS ESTADOS DE ALAGOAS E PERNAMBUCO**

**RIO LARGO
2016**

FREDERICO MONTEIRO FEIJÓ

**ETIOLOGIA E PREVALÊNCIA DAS MANCHAS DE CLADÓDIOS DA PALMA
FORRAGEIRA MIÚDA NOS ESTADOS DE ALAGOAS E PERNAMBUCO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Proteção de Plantas da Universidade Federal de Alagoas,
como requisito parcial para obtenção do título de Doutor
em Proteção de Plantas.

Orientação: Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima

**RIO LARGO
2016**

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias
Bibliotecária Responsável: Myrtes Vieira do Nascimento

F297e Feijó, Frederico Monteiro

Etiologia e prevalência das manchas de cladódios da palma forrageira miúda nos estado de Alagoas e Pernambuco. / Frederico Monteiro Feijó – 2021.

75 f.; il.

Tese (Doutorado em Proteção de plantas) - Universidade Federal de Alagoas, Campus de Engenharias e Ciências Agrárias. Rio Largo, 2016.

Orientação: Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima

Inclui bibliografia

1. Doenças da palma. 2. Epidemiologia. 3. *Napolea cochenilífera*.
I. Título.

CDU: 636.3

FOLHA DE APROVAÇÃO

FREDERICO MONTEIRO FEIJÓ

ETIOLOGIA E PREVALÊNCIA DAS MANCHAS DE CLADÓDIOS DA PALMA FORRAGEIRA MIÚDA NOS ESTADOS DE ALAGOAS E PERNAMBUCO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Proteção de Plantas da Universidade Federal de Alagoas,
como requisito parcial para obtenção
do título de doutor em Proteção de Plantas

Aprovado em: 20/12/2016

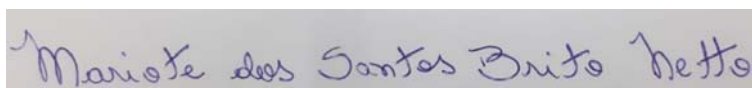
Banca Examinadora



Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima (Universidade Federal de Alagoas - Orientador)



Prof^ª. Dr^ª. Edna Peixoto da Rocha Amorim (Universidade Federal de Alagoas - UFAL)



Dr. Mariote dos Santos Brito Netto (Universidade Federal de Alagoas - UFAL)



Prof. Dr. Paulo Roberto Gagliardi (Universidade Federal de Sergipe)

Rio Largo - AL

2016

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus.

Ao Campus de Engenharias e Ciências Agrárias e todos os seus funcionários. A Universidade Federal de Alagoas, pela oportunidade durante todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima pela orientação, pelos ensinamentos e pela confiança e a Prof. Dra. Iraildes Pereira Assunção pelos ensinamentos e a confiança no meu trabalho.

À minha família que sempre me apoiou e serviu como o principal pilar do meu crescimento, em especial, minha mãe Alda Lúcia Monteiro Feijó. A meus filhos lindos Bianca e Miguel meus amores, e a Juliana que independente das adversidades da vida sempre me apoiou.

A todos os meus companheiros de laboratório, em especial aos que sempre estiveram ao meu lado, Nayana, Antonio, Jussara, Tiago Jorge e Lucas Fonseca.

Ao Laboratório de Fitopatologia Molecular, que me deu condições de realizar minha tese sem que faltasse nada do que era necessário em especial a Mayra Ferro, que me ajudou a desenvolver conhecimento acadêmico e pelo prazer de ter trabalhado juntamente a todos que o compõe.

RESUMO GERAL

A palma forrageira (*Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck) é uma cultura de extrema importância nas zonas áridas e semiáridas de diversos países. No Brasil é bastante explorada nos Estados de Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará, servindo como fonte de alimento para os animais na época de estiagem. Apesar de sua rusticidade, a palma pode ser hospedeira de uma série de patógenos principalmente os de natureza fúngica que além de podridões, causam manchas nos cladódios que se caracterizam inicialmente por manchas de coloração marrons e depois necróticas, que posteriormente podem ser observadas na outra face do cladódio, causando queda do tecido infectado, que em determinadas condições, podem comprometer a produção. No entanto, estudos sobre manchas em cladódios de palma forrageira miúda são escassos, sobretudo àqueles que se baseiam na identificação dos patógenos e aspectos epidemiológicos das doenças. Neste contexto, este estudo teve por objetivos: determinar a etiologia e a prevalência dos fitopatógenos envolvidos com as manchas de cladódios e identificar e caracterizar espécies pertencentes à família Botryosphaeriaceae associadas a manchas em cladódios de palma forrageira (*N. cochenillifera*) no Nordeste do Brasil. Cladódios apresentando sintomas de manchas em sua superfície, foram coletados em oito regiões, sendo cinco municípios em Alagoas e três em Pernambuco. Os isolados fungicos foram obtidos a partir de lesões típicas das doenças nos cladódios de palma miúda e identificados com base em análises moleculares, morfológicas e culturais. Um total de 118 isolados patogênicos foram obtidos, os quais foram associados a nove gêneros fúngicos: *Fusarium*, *Neoscytalidium*, *Colletotrichum*, *Macrophomina*, *Neopestalotiopsis*, *Altenaria*, *Lasiodiplodia*, *Diaporthe* e *Neofusicoccum*, de acordo com as análises de sequências da região ITS e características morfoculturais. Adicionalmente, foram realizadas análises de prevalência dos patógenos obtidos por região de coleta. Estas análises revelaram que os gêneros mais prevalentes foram *Neoscytalidium* e *Fusarium*. Diante da caracterização molecular das espécies de Botryosphaeriaceae com base nas sequências parciais do Espaço Interno Transcrito (ITS) e dos genes, Fator de Alongamento (EF1- α) e β -tubulina, foi possível identificar duas espécies de *Lasiodiplodia*, *L. theobromae* e *L. jatrophiicola*, uma de *Macrophomina*, *M. alagoensis* sp. nov., uma de *Neofusicoccum*, *Neofusicoccum batangarum* e uma espécie de *Neoscytalidium*, *Neoscytalidium hyalinum*, sendo as quatro primeiras associadas à mancha-marrom, enquanto que *N. hyalinum* foi associada à mancha-escamosa. As espécies *L. theobromae* e *N. batangarum* já foram descritas ocorrendo em palma miúda, contudo, o presente estudo constitui os primeiros registros de *L. jatrophiicola*, *M. alagoensis* e *N. hyalinum* nessa cultura.

Palavras-Chave: *Nopalea cochenillifera*. Doenças da palma. Epidemiologia. Botriosphaeriaceae.

ABSTRACT

Nopalea cochenillifera Salm-Dyck is a crop of extreme importance in the arid and semi-arid zones of several countries. In Brazil, it is widely used in the states of Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte and Ceará, serving as a food source for animals during the dry season. In spite of its rusticity, the palm can be host to a series of pathogens, mainly of fungal nature, which, in addition to rotting, cause cladodes patches that are initially characterized by brown and then necrotic stains, which can later be observed on the other side Of the cladode, causing fall of the infected tissue, that in certain conditions, can compromise the production. However, studies on cladodes of small forage palm are scarce, especially those that are based on the identification of the pathogens and epidemiological aspects of the diseases. In this context, the objective of this study was to determine the etiology and prevalence of phytopathogens involved in cladodeal patches and to identify and characterize species belonging to the Botryosphaeriaceae family associated with patches of forage palm cladodes (*N. cochenillifera*) in Northeast Brazil. Cladodes presenting symptoms of spots on their surface were collected in eight regions, five of which were in Alagoas and three in Pernambuco. The fungal isolates were obtained from typical lesions of the diseases in small palm cladodes and identified based on molecular, morphological and cultural analyzes. A total of 118 pathogenic isolates were obtained, which were associated to nine fungal genera: *Fusarium*, *Neoscytalidium*, *Colletotrichum*, *Macrophomina*, *Neopestalotiopsis*, *Altenaria*, *Lasiodiplodia*, *Diaporthe* and *Neofusicoccum*, according to ITS region sequence analyzes and morphocultural characteristics. In addition, analyzes of the prevalence of pathogens obtained by collection region were performed. These analyzes showed that the most prevalent genera were *Neoscytalidium* and *Fusarium*. In view of the molecular characterization of the Botryosphaeriaceae species based on the partial sequences of Transcribed Internal Space (ITS) and genes, Stretching Factor (EF1- α) and β -tubulin, it was possible to identify two species of *Lasiodiplodia*, *L. theobromae* and *L. jatrophiicola*, one of *Macrophomina*, *M. alagoensis* sp. nov., One of *Neofusicoccum*, *N. batangarum* and one species of *Neoscytalidium*, *Ne. hyalinum*, the first four being associated with the brown spot, whereas *Ne. hyalinum* was associated with spot-squamous. The species *L. theobromae* and *N. batangarum* have already been described occurring in small palm, however, the present study constitutes the first records of *L. jatrophiicola*, *M. alagoensis* and *Ne. hyalinum* in this culture.

Keywords: *Nopalea cochenillifera*. Palm diseases. Microorganisms. Epidemiology. Botriosphaeriaceae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Sintomas de manchas nos cladódios em palma forrageira miúda. A-B, Mancha-marrom e C-D, Mancha-escamosa	36
Figura 2 -	Sintomas causados por isolados patogênicos após oito dias de incubação. A - <i>NeoPestalotiopsis</i> , B - <i>Macrophomina</i> , C - <i>Lasiodiplodia</i> , D - <i>Colletotrichum</i> , E - <i>Neofusicoccum</i> e F - <i>Fusarium</i>	40
Figura 3 -	Características morfológicas dos nove gêneros obtidos a partir das manchas de cladódios de palma miúda. 1 - <i>Fusarium</i> , 2 - <i>Neoscytalidium</i> , 3 - <i>Colletotrichum</i> , 4 - <i>Macrophomina</i> , 5 - <i>Neopestalotiopsis</i> , 6 - <i>Altenaria</i> , 7 - <i>Lasiodiplodia</i> , 8 - <i>Diaporthe</i> e 9 - <i>Neofusicoccum</i>	43
Figura 4 -	Aspecto das colônias dos nove gêneros obtidos dos 27 isolados caracterizados	43
Figura 5 -	Prevalência dos gêneros fúngicos identificados no estado de Alagoas	44
Figura 6 -	Prevalência dos gêneros fúngicos identificados no estado de Pernambuco	45
Figura 7 -	Prevalência dos gêneros fúngico por município de coleta englobando os Estados de Alagoas e Pernambuco	46
Figura 8 -	Prevalência dos gêneros fúngicos de acordo com o total de isolados patogênicos obtidos nos oito municípios de coleta	57
Figura 9 -	Árvore filogenética inferida a partir da análise Bayesiana com base nas sequências combinadas da região ITS, e dos genes EF-1 α e β -tub. A árvore foi enraizada com <i>Melanops tulasnei</i> (out-group). Isolados caracterizados neste estudo são destacadas em negrito	64
Figura 10 -	Árvores filogenéticas de Inferência Bayesiana com isolados de <i>Macrophomina</i> spp. considerando a região ITS (A), e os genes EF-1 α (B) e β -tub (C). As árvores foram enraizadas com <i>Neoscitalidium batangarum</i> como outgroup	65
Figura 11 -	<i>Macrophomina alagoensis</i> . A - Coloração da colônia, B - Escleródios em meio BDA e C - Conídios com apêndices apicais	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Identificação dos isolados obtidos nos municípios de Alagoas e Pernambuco	39
Tabela 2 -	Morfologia e caracterização molecular utilizando a região ITS para confirmação dos gêneros fúngicos, dos 27 isolados obtidos das manchas de cladódios de palma miúda	41
Tabela 3 -	Características culturais de coloração das colônias e índice de crescimento micelial (mm/dia) dos 27 isolados obtidos das manchas de cladódios de palma miúda	42
Tabela 4 -	Códigos das culturas e números de acesso GenBank de sequências de DNA de Botryosphaeriaceae utilizados na análise filogenética	61

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2- REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Palma forrageira	14
2.1.1 Taxonomia e origem.....	14
2.1.2 Descrição botânica, fisiológica e composição química	14
2.1.3 Importância social-econômica e principais usos	16
2.2 Doenças da palma forrageira	17
2.3 Epidemiologia de doenças em plantas cultivadas.....	19
2.4 Família Botryosphaeriaceae	21
REFERÊNCIAS	26
3 CAPÍTULO I: ETIOLOGIA E PREVALÊNCIA DAS MANCHAS DE CLADÓDIOS DA PALMA FORRAGEIRA MIÚDA NO NORDESTE DO BRASIL	32
RESUMO	33
ABSTRACT	34
3.1 INTRODUÇÃO	35
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.2.1 Origem, obtenção e preservação dos isolados.....	36
3.2.2 Teste de patogenicidade	37
3.2.3 Caracterização molecular.....	37
3.2.3.1. Extração de DNA genômico, Amplificação e Sequenciamento	37
3.2.4 Caracterização morfológica	38
3.2.5 Análises de Prevalência.....	38
3.3 RESULTADOS.....	39
3.3.1. Isolados obtidos	39
3.3.2 Teste de patogenicidade	39
3.3.3 Caracterização Molecular, morfológica e cultural.....	40
3.3.4 Prevalência dos isolados nos estados de Alagoas e Pernambuco	44
3.4 DISCUSSÃO	47
3.5 CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	52
4 CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE BOTRYOSPHAERIACEAE CAUSADORAS DE MANCHAS NOS CLADÓDIOS DA PALMA FORRAGEIRA MIÚDA NO NORDESTE DO BRASIL, COM UMA NO ESPÉCIES DE <i>Macrophomina</i>. .	56
RESUMO	57

ABSTRACT	58
4.1 INTRODUÇÃO	59
4.2 MATERIAL E MÉTODO	60
4.2.1 Obtenção dos Isolados	60
4.2.2 Caracterização molecular	60
4.2.3 Caracterização morfológica	62
4.2.4 Patogenicidade	62
4.3 RESULTADOS	62
4.3.1 Obtenção dos Isolados	62
4.3.2 Caracterização molecular	62
4.3.3 Taxonomia	65
4.3.4 Patogenicidade dos isolados	67
4.4 DISCUSSÃO	67
4.5 CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS	72

1- INTRODUÇÃO GERAL

A palma forrageira (*Nopalea cochenillifera*, Salm Dick), apresenta relativa importância econômica, sendo utilizadas na alimentação animal e como criatório para a cochonilha do carmim, a qual é empregada como fonte de um corante muito utilizado na indústria de cosméticos e na indústria alimentícia (SANTOS et al., 2006).

De acordo com Broglio-Micheletti et al (2008), a palma é originária do México, sendo introduzida no Brasil pelos portugueses, trazida provavelmente das Ilhas Canárias, em meados do século XIX, para se iniciar a multiplicação da cochonilha *Dactylopius coccus*, Costa, 1829, que produz o corante carmim, de grande valor comercial à época. Com o insucesso da produção da cochonilha, as cactáceas introduzidas passaram a ter valor como planta ornamental e posteriormente como forrageira (ARAÚJO et al., 2005; NUNES, 2011).

A área cultivada com palma forrageira no Brasil vem crescendo, chegando aproximadamente a 600 mil hectares, concentrados principalmente nos Estados da região Nordeste (DUBEUX JR. et al., 2010; MENEZES et al., 2005). A cultura é considerada uma alternativa importante para alimentação dos rebanhos animais no nordeste brasileiro, por ser palatável aos animais e por possuir aspecto fisiológico especial quanto à absorção, aproveitamento e perda de água, sendo bem adaptada às condições adversas do semiárido, suportando prolongados períodos de estiagem (SANTOS et al., 2006). A presença da palma na dieta dos ruminantes nesse período de seca ajuda aos animais a suprir grande parte da água necessária (WANDERLEY et al., 2002).

No Brasil são exploradas comercialmente três cultivares. A Graúda ou Gigante e a Redonda pertencem à espécie *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill., e a Miúda ou Doce, à espécie *Nopalea cochenillifera* Salm Dick, sendo que as duas primeiras têm se mostrado mais rústicas que a miúda. Em Pernambuco e na Paraíba predominam as variedades Gigante e Redonda, enquanto que em Alagoas a palma Miúda é mais plantada (SANTOS et al., 1990).

Informações sobre doenças da palma forrageira são escassas no Brasil, de um modo geral se limitam a registros de ocorrência e descrição de sintomas. Dentre as doenças descritas no Nordeste, destacam-se as podridões dos cladódios, as podridões de raízes e as manchas dos cladódios (BARBOSA et al., 2012; FEIJÓ, et al., 2016; FLORES-FLORES et al., 2013; SOUZA et al., 2010). No Brasil, as manchas de cladódios mais importantes são a mancha-marrom e a mancha-escamosa (BARBOSA et al., 2012; LIMA

et al, 2011; CONFORTO et al., 2016). De acordo com Santos et al. (2006) a expansão dessa cultura e o plantio adensado podem contribuir para o aumento da incidência dessas doenças, justificando estudos mais detalhados, principalmente no que se refere a estudos epidemiológico e de etiologias.

O levantamento de fitopatógenos dentro da epidemiologia tem o objetivo de fornecer informações relevantes sobre doenças de plantas, que se torna uma importante ferramenta para o desenvolvimento de um programa eficiente de controle (CAMPBELL; MADDEN, 1990). Um dos principais parâmetros para avaliação de doenças de plantas na epidemiologia é a severidade. Na palma forrageira esse levantamento é realizado com o uso de uma escala diagramática desenvolvida para mancha de *Altenaria* (LIMA et al., 2011). Além da severidade, a identificação dos fitopatógenos é de fundamental importância para que se possa tomar uma decisão sobre controle das doenças em uma cultura. Estudos recentes sobre doenças da palma forrageira identificaram novos agentes etiológicos envolvidos com as manchas nos cladódios (FLORES-FLORES et al., 2013; CONFORTO et al., 2016).

Dentre os agentes etiológicos associados à doença, estão membros da família Botryosphaeriaceae, que é constituída por um complexo de espécies crípticas inseridas em 17 gêneros e cerca de 110 espécies caracterizadas morfológicamente e molecularmente (PHILLIPS et al., 2013). No Brasil, os principais gêneros que compõem essa família são *Botryosphaeria* sp., *Lasiodiplodia* sp., *Neofusicoccum* sp., *Neoscytalidium* sp., *Macrophomina* sp. e *Pseudofusicoccum* sp. (AL-SAADOON et al. 2012; MACHADO et al, 2014; MARQUES et al, 2013; MACHADO et al., 2014; CORREIA et. al., 2016).

Diante do exposto, este trabalho teve os objetivos de avaliar a etiologia e prevalência das manchas de cladódios de palma forrageira miúda e identificar e caracterizar espécies pertencentes à família Botryosphaeriaceae associadas à manchas nos cladódios de palma forrageira (*N. cochenillifera*) no Nordeste do Brasil

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Palma forrageira

2.1.1 Taxonomia e origem

A palma forrageira pertence à Divisão Embryophyta, Sub-divisão Angiospermea, Classe Dicotyledoneae, Sub-classe Archiclamideae, Ordem Opuntiales e família Cactácea. Já foram descritos 178 gêneros com cerca 2.000 espécies conhecidas e dentre estas as mais cultivadas estão inseridas nos gêneros *Opuntia* e *Nopalea* com cerca de 12 espécies (SANTOS et al., 2006).

É uma planta originária do México (SANGLARD, MELO, 2015), sendo introduzida no Brasil pelos portugueses no século XIX, no Estado de Pernambuco com o objetivo de iniciar a multiplicação da cochonilha do carmim (*D. coccus*, Costa), para produção do corante carmim, de grande valor comercial à época (ARAÚJO et al., 2005; NUNES, 2011). Porém, não se obteve êxito e a partir de então a palma passou a ser cultivada como planta ornamental (SANTOS et al., 2006). Apenas na primeira década do século XX a palma começou a despertar interesse como forrageira, sendo introduzida no Nordeste brasileiro e disseminada por ordem do governo após a seca de 1932, e através do primeiro programa governamental de difusão da cultura, a palma forrageira foi introduzida do Estado do Piauí a Bahia (LIMA et al., 2001).

A Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA) detém o banco de germoplasma de palma forrageira, localizado na Estação Experimental de Arcoverde (PE), com cerca de 1.400 acessos de diferentes materiais, sendo 200 destes introduzidos de vários locais como o México, EUA, África do Sul, Argélia, Chile entre outros (SANTOS et al., 2006). No país, há a predominância de três cultivares para fins forrageiros, a gigante ou graúda, a redonda e a miúda ou doce.

2.1.2 Descrição botânica, fisiológica e composição química

No Nordeste brasileiro, as espécies mais utilizadas para os cultivos são *O. fícus-indica* com as cultivares Gigante ou Graúda e Redonda, e *N. cochenillifera* miúda ou doce (SOUZA et al., 2010).

A cultivar Gigante ou Graúda, é uma planta de porte médio, caule pouco ramificado com aspecto ereto e crescimento vertical pouco frondoso para planta. Os cladódios têm forma oval elíptica ou sub ovalada e coloração verde fosco, podendo pesar entre 1kg e 1,8kg, medindo entre 40cm e 50cm de comprimento. As flores são hermafroditas, de coloração amarela cuja corola fica aberta na antese, o fruto é uma baga

ovoide de coloração amarela tornando-se roxo quando maduro. É considerada uma cultivar bastante produtiva e resistente a restrição hídrica, no entanto é menos palatável aos animais e de baixo valor nutritivo. (SANTOS et al., 1990; SANTOS et al., 2001).

A cultivar redonda é originária da gigante, possui caule bastante ramificado e de porte médio, com pouco crescimento vertical. Os cladódios têm forma ovoide e arredondada, pesando cerca de 1,8 kg com mais ou menos 40 cm de comprimento. Apresenta alto rendimento e maior palatabilidade em relação a gigante, porém é altamente suscetível a cochonilha do carmim (LOPES et al 2012).

Já a cultivar Miúda ou Doce, tem cladódio com forma acentuadamente obovada com coloração verde intenso brilhante, pesando cerca de 350g e medindo 25cm de comprimento. As flores são vermelhas e sua corola permanece meio fechada durante o ciclo, sendo o fruto é uma baga de coloração roxa. É considerada mais exigente em água e quanto a qualidade do solo, apresentando maior produção de matéria seca quando comparada com a *O. fícus-indica* (SANTOS et al. 1990; SANTOS et al. 2001).

São espécies consideradas xerófilas, apresentando adaptações às condições edafoclimáticas adversas do semiárido. A sua fisiologia é caracterizada pelo processo fotossintético denominado metabolismo do ácido crassuláceo (CAM), que tem a capacidade de absorver e aproveitar a água em seus processos fisiológicos de até 11 vezes quando comparada com plantas de mecanismo C3 (CAVALCANTE et al. 2014). Algumas variedades chegam a acumular 90% de seu peso vivo em água (SANTOS et al. 2006), e também possui capacidade de produzir grande quantidade de matéria verde como a cultivar miúda que produz, em média, 68 t/ha⁻¹ ano de massa verde, em densidade de cultivo de 20.000 plantas/ha⁻¹ (VASCONCELOS et al., 2007) e a redonda que produz, em média, 175 t/ha⁻¹/ano de massa verde na mesma densidade de plantio (FARIAS et al., 2000).

Quimicamente, a palma forrageira apresenta as seguintes características: alta concentração de água e fibras solúveis, carboidratos solúveis, minerais e baixas quantidades de proteínas. Apresenta também as seguintes médias de digestibilidade e composição química: Matéria seca (MS) 11%, proteína bruta (PB) 5%, fibra em detergente neutro (FDN) 28%, nutrientes digestíveis totais (NDT) 65%, Cálcio (Ca) 2,88%, fósforo (P) 0,14 %, carboidratos solúveis (CHOS) 29% e digestibilidade in vitro da matéria seca (DIVMS) 74,4%, sendo classificada assim, como concentrado energético (SANTOS et al., 2006).

2.1.3 Importância social-econômica e principais usos

De acordo Dubeux Junior et al. (2013), estima-se que no Brasil exista uma área de aproximadamente 600 mil hectares plantados com palma forrageira, sendo sua produção quase que exclusivamente concentrada na região semiárida do Nordeste brasileiro e que sua produtividade varie dependendo do manejo (adubação, capina e espaçamento) entre 5 e 30 t/ha por colheita bienal (SANGLARD; MELO, 2012).

No Nordeste do Brasil, a agropecuária é uma das principais atividades, com destaque para a criação de rebanhos bovino, ovino e caprino, que de forma geral são criados extensivamente. Nessa região a pecuária é bastante prejudicada pelos períodos curtos de chuvas, contribuindo para a baixa produtividade nos rebanhos. A baixa disponibilidade de forragem faz com que os produtores procurem por alimentos de alto custo, necessitando maiores investimentos. Neste contexto, a palma forrageira por ser uma cactácea que apresenta características morfofisiológicas de adaptação às condições do semiárido, passou a ser cultivada em larga escala pelos criadores das bacias leiteiras de Alagoas, Pernambuco, Paraíba e em algumas regiões do Ceará e Rio grande do Norte (DUBEUX JR. et al., 2010; MENEZES et al., 2005).

Trata-se de um importante alimento para os rebanhos, principalmente por sua alta resistência à seca aliada à alta palatabilidade e produção de biomassa. Assim sendo, na Região Nordeste do Brasil, a palma deixou de ser uma forrageira estratégica para ter uso rotineiro dos agricultores durante o período da estiagem, uma vez que é cultivada quase exclusivamente para alimentação do gado nesse período (MENEZES et al., 2005). Mundialmente, a palma forrageira é usada na alimentação humana, ração animal, como fonte de energia, na medicina, na indústria de cosméticos, na proteção e conservação do solo, dentre outros usos nobres, a exemplo da fabricação de adesivos, colas, fibras para artesanato, papel, corantes, mucilagem e ornamentação (BARBERA, 2001).

No Brasil o uso na alimentação humana esbarra no preconceito, visto que, tradicionalmente, a palma é utilizada como ração na alimentação animal, mesmo apresentando valor nutritivo maior que outros alimentos como a couve, a beterraba e a banana, com a vantagem de ser um produto mais econômico (NUNES, 2011).

Em países como México e Estados Unidos, a palma é cultivada visando a produção de frutos. No Norte da África, a palma é utilizada no combate à erosão do solo e como forrageira nos períodos de seca. Existe um interesse crescente no uso da palma forrageira em aplicações além da alimentar, principalmente médicas. A ingestão de

extratos de *O. fícus-indica* demonstraram ter efeitos benéficos no crescimento e taxa de colesterol total, sem apresentar efeitos secundários nas taxas de glicose e lipídeos no sangue (MALAININE et al., 2003).

Ainda na área médica, estudos mostraram que o tratamento fitoterápico com palma ajuda a eliminar as toxinas do álcool e do fumo que são absorvidas pelo organismo e a metabolizar a gordura. Seu alto teor de fibras solúveis e insolúveis colabora para o bom funcionamento do sistema digestivo além de impedir a concentração de elementos cancerígenos (NUNES, 2011).

Apesar da realização e divulgação de resultados de pesquisas sobre manejo adequado para produção da cultura, proporcionando aumento na produtividade da palma, verifica-se decréscimo da produção, em função do aumento de danos causados por pragas e doenças.

2.2 Doenças da palma forrageira

Diversos autores relatam um complexo de patógenos que podem ser associados as mais comuns doenças, causando podridões e manchas nos cladódios em palma forrageira no Brasil e em diversos países produtores desta cultura (KIM et al. 2000, GRANATA 2001, GRANATA; SIDOTI 2002, QUEZADA-SALINAS et al. 2006, AYALA-ESCOBAR et al. 2006, SANTOS et al. 2006, SOUZA et al. 2010, BEZERRA et al. 2012; FLORES-FLORES et al., 2013). Dentre as principais doenças que causam podridões, podemos citar:

A Podridão de *Fusarium*, cujo desenvolvimento é favorecido por solos de elevada acidez, baixa permeabilidade e alta umidade, ocorrendo nas raquetes-sementes e raquetes da base em plantas adultas. Tradicionalmente está associada a *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum*. Os sintomas se iniciam com podridão na raquete da base de consistência mole e coloração esverdeada. Tanto as raquetes primárias quanto as secundárias murcham e tombam sobre a planta poucos dias após a infecção. Os tecidos do cladódio infectado tornam-se aquosos, escurecem. O seccionamento dos tecidos afetados revela uma cor vermelha evidente na membrana celular do tecido afetado (GRANATA 2001, SANTOS et al. 2006).

A Podridão Negra, comumente associada ao fungo *Lasiodiplodia theobromae* (Patouillard). A podridão ocorre, geralmente, a partir do local de inserção das raquetes, sendo no início de cor marrom e, em seguida, torna-se escura devido à produção de estruturas do fungo. A podridão é consistente, com abundante exsudação de goma de coloração amarelo leitosa tornando-se, posteriormente, enegrecida (SOUZA et al. 2010).

A Podridão de *Macrophomina*, está diretamente associada ao fungo *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid, ocorre com bastante frequência no México, podendo causar morte em 50% das plantas nas áreas infectadas. A doença se manifesta inicialmente através de manchas cloróticas na parte externa e verde escuras na parte interna dos cladódios. Com a evolução da doença a casca das manchas racha, devido a uma putrefação semi-aquosa, e se torna preta, o que é seguido de uma perfuração no local da mancha (GRANATA, 2001).

A Podridão do colo na palma forrageira é comumente associada a alguns fungos do gênero *Phytophthora* como, por exemplo, *P. cactorum* (Leb. e Cohn) Schroet. e *P. nicotianae* (Breda de Hahn). Em épocas quentes e úmidas, a planta doente exsuda uma goma na base do caule, perto da coroa. As plantas jovens que apresentam uma apodrecimento marrom com um exsudato líquido. As partes internas do tecido enfermo apodrecem e se tornam avermelhados. A putrefação não se estende mais do que 20 a 30 cm acima da coroa, mas pode abranger toda a circunferência do caule, causando a morte da planta. Os sintomas das plantas afetadas são clorose e murcha dos cladódios. O apodrecimento resulta numa menor turgescência do caule e muitas vezes as plantas caem (CACCIOLA; MAGNANO, 1988; GRANATA, 2001).

A podridão de esclerócio, causada pelo fungo *Sclerotium rolfsii* (Sacc.), foi relatada em Pernambuco e ocorre na forma de podridão mole. Na planta, em condições de alta umidade, é possível visualizar os sinais do patógeno como o crescimento micelial branco e os escleródios que são inicialmente brancos e posteriormente marrom-escuro. Os escleródios podem sobreviver no solo por varios anos. (BARBOSA et al., 2012).

E dentre as principais doenças que causam mancha em cladódio, podemos citar a mancha marrom, mancha negra e a mancha escamosa:

A Mancha de *Altenaria*, atribuída ao fungo *Alternaria tenuis* Nees. Ex Pers, foi identificada no interior de Pernambuco ocorrendo de forma epidêmica com 70% de incidência em cultura de palma miúda e causando intensa queda das raquetes na cultura. Na palma miúda, os sintomas da doença caracterizam-se por manchas de coloração preta nas raquetes, nas formas circulares ou elípticas, medindo 1,0-3,0cm de diâmetro com abundante esporulação na superfície da lesão. As lesões podem se estender de uma face a outra da raquete, exibindo perfurações devido à queda do tecido infectado. As manchas podem coalescer, formando grandes áreas necrosadas e causando queda na raquete das plantas (SWART, SWART, 2003; SANTOS et al. 2006).

A Mancha Negra, pode ser associada a fungos do gênero *Pseudocercospora* sp. Em palmas atacadas por estes fungos podem ser detectados dois sintomas distintos, inicialmente as plantas apresentam descoloração da cutícula adquirindo cor clara com pequenos pontos de cor azeitona. Posteriormente manchas café-escuro, com diâmetro entre 3 e 4 cm, apresentando também uma margem amarela. Em seguida, a parte afetada seca expondo o restante tecido lenhoso visível, muitas vezes o tecido afetado cai deixando buracos através da folha. Outro sintoma observado, embora menos frequente, caracteriza-se por manchas indefinidas que podem invadir todo ou parte do cladódio. A sua incidência mais elevada foi observada nos cladódios sombreados e na presença de uma humidade relativa elevada (MÉNDEZ-GALLEGOS et al., 2009).

Realizando trabalhos de caracterização morfológica e molecular do agente causal de uma nova doença que atingiu as plantações de palma forrageira no México, Ayala-Escobar et al. (2006), identificaram a nova espécie *Pseudocercospora opuntiae* sp., como o agente causal da mancha negra em palma forrageira no México. Buscando entender a etiologia da mancha negra em palma forrageira, Quezada-Salinas et al. (2006), realizaram diversos ensaios com materiais apresentando sintomas de manchas negras circulares de tamanho definido e manchas negras em forma de mapa que podem tomar parte ou até todo o cladódio, provenientes do Estado de Morelos no México, identificando como agentes causais da doença fungos do gênero *Pseudocercospora* sp. e o *Colletotrichum gloeosporioides*. Méndez-Gallegos et al. (2009), também associam o *C. gloeosporioides* como um dos agentes causadores da mancha negra, quando a doença está em estágio mais avançado.

A mancha escamosa, que está associada ao gênero *Neoscytalidium*, é frequentemente observado em palma forrageira. Foi detectada por Souza et al., (2010) como a principal doença no Estado da Paraíba em palma gigante. Os sintomas constituem-se no surgimento de manchas onduladas, com aspecto de escamas na superfície do cladódio. O fungo pode infectar o ponto de inserção dos cladódios primários, secundários ou terciários. É uma doença pouco estudada para a cultura, podendo causar prejuízos ao agricultor devido ao tombamento de parte da planta (BARBOSA et al., 2012; SOUZA et al., 2010).

2.3 Epidemiologia de doenças em plantas cultivadas

A epidemiologia voltada a levantamentos fitopatógenos têm como objetivos fornecer informações sobre a importância relativa das doenças de plantas e verificar a

eficiência de práticas de controle eficientes (CAMPBELL; MADDEN, 1990). Apresenta duas faces distintas, a primeira tem por objetivo uma melhor compreensão da estrutura e comportamento das doenças no campo e a segunda, baseando-se na primeira, tem por principal objetivo a otimização do controle de doenças. (AZEVEDO, 2008; KRANZ, 2008).

Para a avaliação do progresso de uma doença faz-se necessário a quantificação da mesma no campo, tanto para estudos que foquem no controle, determinação da eficiência de um fungicida ou na caracterização da resistência varietal, como para a construção de curvas de progresso da doença e estimativas dos danos provocados. Sua importância tem sido frequentemente comparada à importância da diagnose, pois de nada adiantaria conhecer o agente causal de uma doença se não fosse possível quantificar os sintomas por ele causados e adotar medidas efetivas de controle (BERGAMIN FILHO, 1995).

Para avaliar a intensidade de uma doença, são considerados dois índices: incidência (porcentagem de plantas doentes ou partes de plantas doentes em uma amostra ou população) e severidade (porcentagem da área ou do volume de tecido coberto por sintomas, contando com o auxílio de escalas diagramáticas e de notas). As taxas de infecção e as curvas de progresso das doenças são plotadas utilizando-se os valores de incidência e severidade ao longo do tempo (AZEVEDO, 2008).

Dentre os estudos necessários, merece destaque a comparação entre as epidemias, com ênfase na compreensão da dinâmica temporal e espacial. A comparação de epidemias é um instrumento de pesquisa que, além de indicar semelhanças e diferenças existentes entre epidemias e/ou endemias, permite definir modelos e princípios gerais para um grande número de fenômenos epidemiológicos, servindo para aferir hipóteses e teorias, sustentando-as ou refutando-as, em função dos resultados obtidos (GAUNT; COLE, 2002; KRANZ, 2008).

A análise do arranjo espacial de plantas doentes tem possibilitado o entendimento da dinâmica de epidemias, principalmente quanto ao padrão do inóculo inicial, os mecanismos de dispersão do patógeno, o efeito de práticas biológicas e culturais, bem como o efeito de fatores ambientais na infecção e dispersão de patógenos e doenças. Além disso, no desenvolvimento de protocolos de amostragem de doenças, o conhecimento do arranjo espacial de plantas doentes é fundamental para a obtenção de estimativas precisas da intensidade da doença (JEGER, 2000). Várias técnicas podem ser utilizadas para caracterizar o arranjo espacial de plantas doentes, dependendo do tipo de

dado coletado e do conhecimento sobre o local onde as observações serão realizadas (CAMPBELL; MADDEN, 1990).

A curva de progresso da doença, usualmente expressa pela plotagem da proporção de doença *versus* o tempo e através dela, interações entre patógeno, hospedeiro e ambiente podem ser caracterizadas, estratégias de controle avaliadas, níveis futuros de doença previstos e simuladores verificados. Curvas de progresso da doença podem ser construídas para a maioria dos patossistemas. Independentemente da situação considerada, vários parâmetros importantes da curva de progresso da doença podem ser caracterizados, em que se destacam: época de início da epidemia (t_0), quantidade de inóculo inicial (y_0), taxa de aumento da doença (r), forma e área abaixo da curva de progresso da doença, quantidade máxima (y_{max}) e final (y_f) de doença e duração da epidemia. Embora a importância da quantificação de doenças seja amplamente reconhecida, existe falta de padronização nos métodos utilizados na avaliação de doenças (BERGAMIN FILHO, 1995).

2.4 Família Botryosphaeriaceae

A família Botryosphaeriaceae, taxonomicamente pertence ao Domínio Eukaryota; Reino Fungi; Filo Ascomycota; Classe Dothideomycetes e Ordem Botryosphaeriales (SCHOCH et al., 2006). Atualmente, são descritos 17 gêneros e cerca de 110 espécies crípticas, caracterizados tanto por morfologia quanto por filogenia. Os gêneros pertencentes a essa família, são, *Lasiodipodia*, *Barriopsis*, *Botryosphaeria*, *Botryobambusa*, *Cophinforma*, *Diplodia*, *Dothiorella*, *Neodeightonia*, *Macrophomina*, *Phaeobotryon*, *Sphaeropsis*, *Tiarosporella*, *Neoscytalidium*, *Neofusicoccum*, *Spencermartinsia*, *Endomelanconiopsis*, *Pseudofusicoccum*. (PHILLIPS et al. 2013).

Tradicionalmente, membros das Botryosphaeriaceae eram identificados apenas com base na morfologia do estágio assexual como, largura, comprimento, septação, espessura da parede e coloração de conídios, paráfises e células conidiogênicas, bem como o formato de picnídios e no estágio sexual, quando presentes, nas dimensões de ascos e ascósporos (CROUS et al., 2006; SCHOCH et al., 2006; PHILLIPS et al., 2013).

O surgimento de ferramentas moleculares, forneceu grande suporte aos taxonomistas, possibilitando reposicionar gêneros e espécies filogeneticamente relacionados. Desde então novas espécies e gêneros foram identificados em associação com diferentes hospedeiros, localizações geográficas e condições ambientais (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007; SAKALIDIS et al., 2013; PHILLIPS et al. 2013). A

partir de então, as pesquisas passaram a girar em torno da ocorrência, identificação e da caracterização desses fungos (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007; JAMI et al., 2012; SAKALIDIS et al., 2013; PHILLIPS et al., 2013).

Os fungos pertencentes a essa família já foram detectados em todas as áreas geográficas e climáticas do mundo, causando doenças em frutíferas e em muitas outras culturas nativas, exóticas e de importância econômicas para países tropicais e subtropicais. Convivem de forma endofítica, podendo tornar-se patogênico ou não, com hábitos saprofíticos ou necrotróficos, associados, sobretudo as espécies vegetais lenhosas, como também em plantas herbáceas (PHILLIPS et al., 2013).

Na forma endofítica, são uma séria ameaça à agricultura e a ecossistemas florestais por serem capazes de conviver em harmonia com seus hospedeiros, no entanto, sob condições de estresse exercem sua capacidade patogênica (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007). Na fase patogênica, podem agir como biotróficos e necrotróficos, também apresentando potencial saprofítico. São responsáveis por diversas doenças e provocando sintomas como, morte descendente e seca de ramos, exsudação de resinosidade pelos hospedeiros, lesões necróticas e cancos em ramos, caules e tubérculos, podendo causar morte progressiva de plantas jovens, adultas e porta-enxertos; além de atuarem como patógenos de sementes e podridões pedunculares e de pós-colheita em frutos (CARDOSO et al., 2006; MARQUES et al., 2013; NETTO et al., 2014; ZHAI et al., 2014).

A família Botryosphaeriaceae é constituída por complexos de espécies crípticas, ou seja, indivíduos morfologicamente semelhantes (BICKFORD et al., 2006). Por esse motivo, a caracterização morfológica passou a ser subjetiva, uma vez que, durante anos subestimou a identificação das espécies fúngicas dessa família, tornando a identificação a nível molecular a melhor opção para este fim.

Para este fim, são utilizadas algumas regiões genômicas para caracterização filogenética de Botryosphaeriaceae tais como, espaços internos transcritos (ITS); RNA polimerase II (RPB2); fator de alongamento (EF1- α) e β -tubulina (β t) (PHILLIPS et al., 2013). Estudos apontam que dependendo do complexo de espécies investigado, para a obtenção de uma análise filogenética robusta se faz necessário a combinação de sequências de pelo menos duas regiões gênicas, nas quais as regiões ITS, TEF1- α e β t são as mais indicadas para Botryosphaeriaceae (PHILLIPS et al., 2013, MARQUES et al., 2013; SLIPPERS et al., 2004; MACHADO et al., 2014; ROSADO et al., 2016).

A maioria dos estudos taxonômicos sobre Botryosphaeriaceae, foram realizados utilizando dados moleculares empregando a região ITS, mas este único marcador pode subestimar a diversidade de espécies entre espécies enigmáticas dessa família (SLIPPERS et al., 2004; BURGESS et al., 2005). Já os genes EF1- α e β -tub, caracterizam-se por serem fortemente conservadas e abundantes desempenhando papéis de extrema importância na identificação dos organismos (O'DONNELL et al., 1998).

No Brasil, os gêneros *Botryosphaeria*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium*, *Macrophomina* e *Pseudofusicoccum* já foram filogeneticamente identificados e associados tanto a fruteiras tropicais quanto a outras plantas cultivadas.

O gênero *Lasiodiplodia*, introduzido por Ellis; Everh em 1896, possui como espécie tipo *Lasiodiplodia theobromae* sensu lato (Pat.) Griffin; Maublanc, 1909. É amplamente distribuído em regiões de climas tropicais e subtropicais, sendo o gênero mais relatado (PHILLIPS et al., 2013) da família. Apresentam conídios do tipo diplóide, de formato ovóide, com coloração hialina e asseptados quando imaturo se tornando marrons, septados e com estrias longitudinais, quando maduros. Até 2004, *L. theobromae* era a única espécie do gênero, no entanto, por meio do sequenciamento multilocus de DNA, mais 26 espécies crípticas já foram molecularmente caracterizadas e registradas no Mycobank (ROSADO et al., 2016).

No Brasil, 15 espécies de *Lasiodiplodia* já foram identificadas em associação com o declínio, morte descendente de ramos e podridão peduncular, em mangueira (COSTA et al., 2010; MARQUES et al., 2013a), morte descendente dos ramos em videira, cajueiro e outras frutíferas tropicais (CORREIA et al., 2016; COUTINHO et al., 2016), podridão peduncular em mamoeiro e coqueiro (NETTO et al., 2014; ROSADO et al., 2016), podridão do colo e radicular em pinhão manso e mandioca (MACHADO et al., 2014) e gomose em cajueiro (NETTO et al., 2016). Oito dessas espécies foram primeiramente descritas no Brasil: *L. brasiliense* (NETTO et al., 2014), *L. marypalme* (= *L. euphorbicola*), *L. jatrophiicola*, *L. subglobosa*, *L. macrospora* (MACHADO et al., 2014) e *L. gravistriata* (NETTO et al., 2016), indicando a grande diversidade de espécies pertencentes a este gênero.

O gênero *Neofusicoccum* conta com 23 espécies, descritas a partir do ano 2009 (PAVLIC et al., 2009; BEGOUDE et al., 2010; SAKALIDIS et al., 2011; PHILLIPS et al., 2013; BERRAF-TEBBAL et al. 2014). Suas espécies são amplamente distribuídas, com destaque para *N. parvum* (espécie tipo) e *N. ribis* (SAKALIDIS et al., 2013). Representantes desse gênero apresentam ampla distribuição geográfica, sendo sugeridas

duas principais rotas de distribuição, a primeira entre África do Sul, Chile e Colômbia e a segunda entre Austrália, China, Indonésia, Hawaii e Nova Zelândia (SAKALIDIS et al., 2013).

No Brasil, já foram relatadas algumas espécies de *Neofusicoccum* causando cancro, morte decente, podridão peduncular e gomose em plantas de abacateiro (FIRMINO et al., 2016), videira (CORREIA et al., 2016), em diversas espécies arbóreas da caatinga (GONÇALVES et al., 2016), goiabeira (NOGUEIRA et al., 2016) e mangueira (MARQUES et al., 2013) e mais recentemente em palma forrageira (CONFORTO et al., 2016) e em cajueiro (NETTO et al., 2016).

O gênero *Neoscytalidium*, possui apenas duas espécies, *Ne. hialinum* e *Ne. novaehollandiae*, em associação com hospedeiros tanto de países tropicais como de países em zonas temperadas (CROUS et al., 2006; PHILLIPS et al., 2013). Apenas *Ne. hialinum* (= *Ne. dimidiatum*) tem sido relatado no Brasil, em associação com mangueira (MARQUES et al., 2013) e pinhão manso (MACHADO et al., 2014). Quanto à morfologia, esse gênero apresenta conídios de coloração inicialmente hialina se tornando marrom pálido com o tempo, com parede fina e formato cilíndrico a fusiforme (PHILLIPS et al., 2013). Embora as diferenças morfológicas e filogenéticas entre as espécies sejam pequenas, a espécie *Ne. novaehollandiae* apresentam conídios muriformes (com paredes espessas e escuras), não deixando dúvidas quanto a distinção entre essas espécies (PAVLIC et al., 2008).

O gênero *Macrophomina*, é considerado de grande importância, principalmente em países tropicais e subtropicais (WRATHER et al., 1997, 2001), causando podridões de plântulas, raízes e haste, além de murchas em diversas culturas economicamente importantes como, algodão, amendoim, feijão, milho, soja e sorgo (Dhingra e Sinclair, 1977; RAUT, 1983). É considerado um gênero distinto entre as Botryosphaeriaceae, e tem como espécie tipo a *Macrophomina phaseolina* (Crous et al., 2006; Slippers et al., 2013). Atualmente, estudos filogenéticos indicam a existência de duas espécies pertencente a este gênero, *M. phaseolina* e a *M. pseudophaseolina*.

A patogenicidade a diversos hospedeiros também é de extrema importância, uma vez que permite a caracterização de indivíduos mais ou menos agressivos e hospedeiros mais ou menos resistentes (PEREIRA et al., 2006; LIMA et al., 2013). Tradicionalmente, para fins de esporulação e crescimento micelial, fungos dessa família são caracterizados respectivamente em meio ágar água (AA) contendo folhas de álamo ou de pinheiro autocladas sob sua superfície, e em batata dextrose ágar (BDA) (PHILLIPS et al.,

2013). No entanto, existem espécies que não alcançam a esporulação em determinados meios de cultura ou condições de crescimento, a exemplo de *N. brasiliense*, que pela ausência de esporulação foi descrito apenas por dados moleculares (MARQUES et al., 2013). Em diferentes faixas de temperatura, algumas espécies são capazes de crescer ou não, produzir ou não pigmentos, a exemplo de *L. parva* e *L. pseudotheobromae* que produziram pigmento quando expostos a 35 °C e crescimento a 10 °C se diferenciando de *L. theobromae* (ALVES et al., 2008).

Assim, informações biológicas acerca de isolados fúngicos mostram-se úteis tanto na delimitação e identificação prévia de táxons de Botryosphaeriaceae morfologicamente semelhantes, bem como para a compreensão quanto à distribuição e ecologia dos fungos dessa família. Entretanto, mostram-se altamente variáveis a depender das condições estudadas, devido ao caráter cosmopolita e polífago que possuem (PEREIRA et al., 2006; LIMA et al., 2013). Características biológicas isoladamente são limitadas, devido a sobreposição entre algumas espécies ou variação de características entre os isolados da mesma espécie (ABDOLLAHZADEH et al., 2010; MARQUES et al., 2013), fazendo-se indispensável a combinação de dados de sequências de DNA para a inferência filogenética dos mesmos (SAKALIDIS et al., 2013; PHILLIPS et al., 2013).

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHZADEH, J. et al., 2010. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. **Persoonia**, v.25, p.1–10, 2010.
- AL-SAADOON, ABDULLAH H. et al. First report of grapevine dieback caused by *Lasiodiplodia theobromae* and *Neoscytalidium dimidiatum* in Basrah, Southern Iraq. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 95, p. 16165-16171, 2012.
- ALVES, A. et al., 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic species in *Lasiodiplodia theobromae*. **Fungal Diversity**, v.28, p.1–13, 2008.
- ARAÚJO, L. F. et al. Equilíbrio higroscópico da palma forrageira: Relação com a umidade ótima para fermentação sólida. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 9, n. 3, p. 379-384, 2005.
- AYALA-ESCOBAR, V. et al. *Pseudocercospora opuntiae* sp. nov., the causal organism of cactus leaf spot in Mexico. **Fungal Diversity**, v. 21, p. 1 – 9, 2006.
- AZEVEDO, L.A.S. **Manual de quantificação de doenças de plantas**. São Paulo. Novartis Biociências. 2008.
- BARBERA, G. História e importância econômica e agroecológica. In: BARBERA, G.; INGLESE, P.; PIMENTA-BARRIOS, E.; (Eds.). **Agroecologia, cultivo e uso da palma forrageira**. Roma/Brasília: FAO/Sebrae, p. 1-11, 2001.
- BARBOSA, R.S. et al. Doenças da palma. In: Lopes, E.B. (Ed.). *Palma forrageira: cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semiárido nordestino*. João Pessoa: EMEPA/FAEPA, 2012. p. 46-55.
- BEGOUDE, B.A.D. et al., 2010. Botryosphaeriaceae associated with *Terminalia catappa* in Cameroon, South Africa and Madagascar. **Mycological Progress**, v.9, p.101–23, 2010.
- BERGAMIN FILHO, A. Epidemiologia: conceitos e objetivos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, p.540-553, 1995.
- BERRAF-TEBBAL, A., GUEREIRO, M.A., PHILLIPS, A.J.L. Phylogeny of *Neofusicoccum* species associated with grapevine trunk diseases in Algeria, with description of *Neofusicoccum algeriense* sp. nov. **Phytopathologia Mediterranea**, v.53, n.3, p.416–427, 2014.
- BEZERRA J. P. D. et al. Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. **World Journal of Microbiological Biotechnology**, v. 28, p. 1989 – 1995, 2012.
- BICKFORD, D. et al., 2006. I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, v.22, n.3, p.148-155, 2006. **Brasileira**, v.31, p.572–8, 2006.
- BROGLIO-MICHELETTI, S. M. F. et al. Manejo integrado da cochonilha-da-palmaforrageira, *Diaspis echinocacti* (Bouché, 1833) (Hemíptera: Diaspididae). **Ciência Agrícola**, Santa Maria, v. 9, p. 127-133, 2008. ISSN 0103-8478.

- BURGESS TI, Barber PA, Hardy G, St J (2005) *Botryosphaeria* spp. associated with eucalypts in Western Australia, including the description of *Fusicoccum macroclavatum* sp. nov. **Australas Plant Pathol** 34:557–567.
- CACCIOLA, S. O.; MAGNANO, DI SAN LIO, G. Foot rot of prickly pear cactus by *Phytophthora nicotianae*. **Plant Disease**, v. 72, p. 793 – 796. 1988.
- CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L V. **Introduction to Plant Disease Epidemiology**. New York. John Wiley & Sons. 532p, 1990.
- CARDOSO, J.E., et al., 2006. Evaluation of resistance in dwarf cashew to gummosis in north-eastern Brazil. **Crop Protection**, v. 25, p. 855-859, 2006.
- CAVALCANTE, L. A. D. et al. Respostas de genótipos de palma forrageira a diferentes densidades de cultivo. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, n. 4, p. 424-433, 2014.
- CONFORTO C.; LIMA N. B.; GARCETE-GÓMEZ J. M.; CÂMARA M. P. S.; MICHEREFF S. J. First Report of Cladode Brown Spot in Cactus Prickly Pear Caused by *Neofusicoccum batangarum* in Brazil. **Plant Disease**, v. 100, p.1238, 2016.
- CORREIA, K.C. et al, 2016. Phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of table grape in the main Brazilian exporting region. **Plant Pathology** 65, 92–103, 2016.
- COSTA, V.S.O. et al., 2010. Species of Botryosphaeriaceae associated on mango in Brasil. **European Journal Plant Pathology**, v.127, p.509–519, 2010.
- COUTINHO, I.B.L. et al., 2016. Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. **Plant Pathology**, 2016. Doi: 10.1111/ppa.12565.
- CROUS, P.W, et al.,2006. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Stud Mycol** 55: 235–253.
- DUBEUX JÚNIOR, J. C. B. et al. Potencial da palma forrageira na América do Sul. **Cactusnet Newsletter**, Santiago del Estero, v. 13, ed. esp., p. 29-40, 2013.
- DUBEUX, JR. J.C.B.; ARAÚJO FILHO, J.T.; SANTOS, M.V. F. et al. Adubação mineral no crescimento e composição mineral da palma forrageira clone IPA- 20. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 5, n. 1, p. 129-135. 2010.
- FARIAS, I. et al. Manejo de colheita e espaçamento da palma-forrageira, em consórcio com sorgo granífero, no agreste de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 2, p. 341-347, 2000.
- FEIJÓ F. M.; RAMOS-SOBRINHO R.; SILVA M. J. S.; Barbosa L. F.; PINHO D. B.; ASSUNÇÃO I. P.; LIMA G. S. A., First Report of Cladode and Foot Rots Caused by *Pythium aphanidermatum* on Cactus (*Nopalea cochenillifera*). **Plant Disease**, v. 100, p.1797, 2016.
- FIRMINO, A.C. et al., 2016. Identification of *Fusicoccum* species causing rot in avocado fruits. **Summa Phytopathologica**, v.42, n.1, p.100-102, 2016.

- FLORES-FLORES, R. et al. Identification of fungal species associated with cladode spot of prickly pear and their sensitivity to chitosan. **Journal of Phytopathology**, v.161, n.7-8, p.544-552, 2013.
- GAUNT, R.E.; COLE, M.J. Spatial analysis of wheat stripe rust epidemics. **Crop Protection**, v. 11, p. 131-137, 2002.
- GONÇALVES, F.J.T. et al., 2016. Patogenicidade de espécies de Botryosphaeriaceae endofíticas de plantas da Caatinga do estado do Ceará em manga e umbu-cajá. **Summa Phytopathol.**, v. 42, n.1, p. 43-52, 2016.
- GRANATA G. Doenças bióticas e abióticas. In: BARBERA et al. **Agroecologia, cultivo e usos da palma forrageira**. FAO / SEBRAE – PB, p. 112 – 122, 2001.
- GRANATA, G.; SIDOTI, A. Survey of diseases discovered on *Opuntia ficus-indica* in produces countries. **Acta Horticulturae**, v. 581, p. 231-237, 2002.
- JAMI, F., et al., 2012. Five new species of the Botryosphaeriaceae from Acacia karroo in South Africa. **Cryptogamie, Mycologie**, v.33, n.3, p.245-266, 2012.
- JEGER, M.J. **Mathematical analysis and modeling of spatial aspects of plant disease epidemics**. In: Kranz, J. (Ed.) *Epidemics of Plant Diseases: Mathematical Analysis and Modeling*. 2. ed., p.53-95, 2000.
- KENAGA, C. B. Plant disease concept, definitions, symptoms and classification. In: KENAGA, C. B. **Principles of phytopathology**. 2nd ed., Balt Publishers, p.12-31. 1994.
- KIM, W. G. et al. Ocurrence of anthracnose on indian fig cactus caused by *Glomerella cingulata* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Pathology Journal**, v. 16, n. 5, p. 294 – 296, 2000.
- KRANZ, J. **Measuring Plant Disease**. In: J. Kranz & J. Rotem (Eds.) *Experimental Techniques in Plant Disease Epidemiology*, p.35-50, 2008.
- LIMA, G. S. A. et al. Development and validation of a standard area diagram set for assesment of *Altenaria* Spot on cladodes of the prickly pear cactus. **Journal of Plant Pathology**, v. 93, p. 691- 695, 2011.
- LIMA, I. M. M.; GAMA, N. S. Registro de plantas hospedeiras (cactaceae) e de nova forma de disseminação de *Diaspis echinocacti* (Bouché) (Hemíptera: Diaspididae), cochonilha da palma forrageira, nos estados de Pernambuco e Alagoas. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 3, p. 479 – 481, 2001.
- LIMA, J.S. et al., 2013. Cultural, morphological and pathogenic characterization of *Lasiodiplodia theobromae* associated with tropical fruit plants. **Summa Phytopathologica**, v.39, p.81–8. 2013.
- LOPES, E. B. et al. Cultivo da Palma Forrageira. In: LOPES, E. B. (Ed.) **Palma forrageira: Cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semiárido nordestino**. João Pessoa: EMEPA/FAEPA, p. 21 - 60, 2012.
- MACHADO, A.R. et al., 2014. New occurrences of Botryosphaeriaceae causing black root rot of cassava in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v.39, p.464-470, 2014b.

MALAININE, M. E. et al. Structure and morphology of cladodes and spines of *Opuntia ficus-indica*. Cellulose extraction and characterisation. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, p. 77-83, 2003.

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

MARQUES, M.W., et al., 2013. *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* and *Pseudofusicoccum* species associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, v. 61, p.195- 208, 2013b.

MÉNDEZ-GALLEGOS, S.J.; et al. Identificación y control de las principales enfermedades del nopal. **Revista Salud Pública y Nutrición**, v. 2, p. 2 – 13, 2009.

MENEZES, R. S. C.; SIMÕES, D. A.; SAMPAIO, E. V. S. B. A palma no Nordeste do Brasil – Conhecimento atual e novas perspectivas de uso. **Recife: Ed. Universitária da UFRPE**, 2005, v. único, p. 44. 2005.

NETTO, M.S.B., ASSUNÇÃO, I.P., LIMA, G.S.A. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brasil. **Fungal Diversity**, v.67, p.127–41, 2014.

NETTO, MARIOTE S.B. et al. Analysis of phylogeny, distribution, and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with gummosis of Anacardium in Brazil, with a new species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Biology**, 2016.

NUNES, C. S. Usos e aplicações da palma forrageira como uma grande fonte de economia para o semiárido nordestino. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 6, n. 1, p. 58-66, 2011.

O'DONNELL, K. et al., 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Applied Biological Science**, v.95, p.2044–2049, 1998.

ROSADO, A.W.C. et al., 2016. Phylogeny, identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia* associated with postharvest stem-end of coconut in Brazil. **Plant Disease**, v.100, n.3, p.561-568, 2016.

PAVLIC, D. et al., 2008. Seven new species of the Botryosphaeriaceae from baobab and other native trees in Western Australia. **Mycologia**, v.100, p.851–866, 2008.

PAVLIC, D. et al., 2009. 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**, v.51, p.259–268, 2009b.

PEREIRA, A.L., SILVA, G.S., RIBEIRO, V.Q. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia**.

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

QUEZADA-SALINAS, A. et al. Etiología de la mancha negra del nopal (*Opuntia ficus-indica* Mill) en Tlalnepantla, Morelos, México. **Agrociencia**, v. 40, p. 641 – 653, 2006.

SAKALIDIS, M.L. et al 2011. Pathogenic Botryosphaeriaceae associated with *Mangifera indica* in the Kimberley Region of Western Australia. **European Journal of Plant Pathology**, v.130, p.379–91, 2011.

SAKALIDIS, M.L., et al., 2013. 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**, v.19, p.873–883, 2013.

SANGLARD, D. A.; MELO, G. G. **Pesquisas com palma forrageira: panorama atual**. Disponível em:

<http://www.cdsa.ufcg.edu.br/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=988:pesquisas-com-palma-forrageira-panorama-atual&catid=92:artigos&Itemid=460>. Acesso em: 09 de agosto de 2015.

SANTOS, D. C. et al. Desempenho produtivo de vacas 5/8 holando/zebu alimentadas com diferentes cultivares de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Zootecnia, v. 30, n. 1, p. 12 – 17, 2001.

SANTOS, D. C. et al. **Manejo e utilização da palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) em Pernambuco**. Recife: IPA, 2006. 48p. (IPA, Documento 30).

SANTOS, M. V. F. et al. Estudo comparativo de cultivares de palma forrageira “Gigante”, “Redonda” (*Opuntia ficus-indica* Mill) e “Miúda” (*Nopalea cochenillifera* Salm-Dick) na produção de leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Zootecnia, v. 19, n. 6, p. 504 – 511, 1990.

SCHOCH, C.L, et al., 2006. A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. *Mycologia* 98:1041–1052.

SLIPPERS B, WINGFIELD MJ (2007). Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. **Fungal Biol Rev** 21(2–3):90–106.

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

SLIPPERS, B. et al., 2004. Multiple gene sequences delimit *Botryosphaeria australis* sp. nov. from *B. lútea*. **Mycologia**, v.96, n.5, p.1030–1041, 2004a.

SOUZA, A. E. F. et al. Ocorrência e identificação dos agentes etiológicos de doenças em palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill.) no semiárido paraibano. **Revista Biotemas**, v. 23, n. 3, p. 11 – 20, 2010.

SWART, W. J.; SWART, V. R. An Overview of Research on Diseases of Cactus Pear in South Africa. **Journal of the Professional Association for Cactus Development**. v. 15, p. 115 – 120. 2003.

VASCONCELOS, A. G. V. et al. Micropropagação de palma forrageira cv. Miúda (*Nopalea cochenillifera* Salm Dyck). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 2, n. 1, p. 28-31, 2007.

WANDERLEY, W. L. et al. Palma forrageira (*Opuntia ficus indica* Mill) em substituição à silagem de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) na alimentação de vacas leiteiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 273-281, 2002. ISSN 1806-9290.

ZHAI, L. et al., 2014. Biological and molecular characterization of four *Botryosphaeria* species isolated from pear plants showing stem wart and stem canker in China. **Plant Disease**, v.98, p.716-726, 2014.

3 CAPÍTULO I: ETIOLOGIA E PREVALÊNCIA DAS MANCHAS DE CLADÓDIOS DA PALMA FORRAGEIRA MIÚDA NO NORDESTE DO BRASIL

RESUMO

A palma forrageira miúda (*Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck) tem grande importância para a região do semiárido nordestino, principalmente nos longos períodos de estiagem, constituindo na principal fonte de alimentação dos rebanhos de caprinos, suínos e bovinos nos períodos mais secos do ano. No Estado de Alagoas é a segunda cultura mais plantada, superada somente pela cana-de-açúcar. A palma é hospedeira de uma série de microrganismos, sendo os de natureza fúngica os mais importantes, causando podridões e manchas nos cladódios. As manchas de cladódios mais observadas nas palmas são a mancha-marrom, que consiste de lesões circulares e necróticas que posteriormente são observadas na outra face do cladódio, chegando a causar queda do tecido infectado e a mancha-escamosa que se caracteriza por apresentar lesões com aspecto de escamas. Contudo, pouco se conhece sobre a etiologia das manchas de cladódios, principalmente no que se refere a estudos baseados no levantamento dos fitopatógenos envolvidos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi determinar a etiologia e prevalência dos fitopatógenos envolvidos com as manchas de cladódios de palma forrageira miúda. Cladódios apresentando sintomas de manchas em sua superfície, foram coletados em oito municípios, cinco em Alagoas e três em Pernambuco. No laboratório foram realizados isolamentos, testes de patogenicidade e identificação dos patógenos, através de caracterizações morfológicas e moleculares, utilizando a região ITS para identificação em nível de gêneros. As análises de prevalência foram feitas com base no total de fitopatógenos isolados por região de coleta. Foram obtidos 118 isolados patogênicos, sendo 55 e 63 isolados provenientes dos Estados de Alagoas e Pernambuco, respectivamente. As caracterizações permitiram a identificação dos seguintes gêneros: *Fusarium*, *Neoscytalidium*, *Colletotrichum*, *Macrophomina*, *Neopestalotiopsis*, *Altenaria*, *Lasiodiplodia*, *Diaporthe* e *Neofusicoccum*. Os gêneros mais prevalentes foram *Neoscytalidium* e *Fusarium*.

Palavras-Chave: *Nopalea cochenillifera*. Doenças da Palma. Gêneros Fungicos.

ABSTRACT

Nopalea cochenillifera, is of great importance for the northeastern semi-arid region, especially in the long periods of dry season, being the main source of feed for the herds of goats, pigs and cattle during the hottest periods of the year. In the State of Alagoas, it is the second most planted crop, surpassed only by sugarcane. The palm is host to a series of microorganisms, the fungi being the most important, causing rotting and staining in the cladodes. The cladodes most noticeable on the palms are the brown spot, which consists of circular and necrotic lesions that are later observed on the other side of the cladode, leading to fall of the infected tissue and the squamous spot that is characterized by presenting lesions with Aspect of scales. However, little is known about the etiology of cladodeal spots, especially in studies based on the survey of the phytopathogens involved. Therefore, the objective of this work was to determine the etiology and prevalence of the phytopathogens involved with cladodes patches of small forage palm. Cladodes presenting symptoms of spots on their surface, were collected in eight municipalities, five in Alagoas and three in Pernambuco. In the laboratory, isolates, pathogenicity tests and identification of pathogens were carried out through morphological and molecular characterization using the ITS region for identification at the genus level. Prevalence analyzes were performed based on total phytopathogens obtained by collection region. A total of 118 pathogenic isolates were obtained, 55 and 63 isolates from the States of Alagoas and Pernambuco, respectively. The characterizations allowed to identify the following genera: *Fusarium*, *Neoscytalidium*, *Colletotrichum*, *Macrophomina*, *Neopestalotiopsis*, *Altenaria*, *Lasiodiplodia*, *Diaporthe* and *NeoFusicoccum*. The most prevalents genera were *Neoscytalidium* and *Fusarium*.

Keywords: *Nopalea cochenillifera*. Cladódios. Molecular techniques.

3.1 INTRODUÇÃO

A palma forrageira tem considerável importância em zonas áridas e semiárida em diversos países. Mundialmente tem sido utilizada na conservação de solos, substrato para criação da cochonilha-do-carmim (*Dactylopius coccus* Costa), biomassa com fins energéticos, alimentação humana e produção de bebidas, queijos vegetarianos medicamentos e cosméticos (INGLESE, 2001; RUSSEL e FELKER, 2007).

No Brasil, essa cactácea tem grande importância socioeconômica para a região do semiárido nordestino, servindo como fonte de renda e, principalmente, alimento para os animais nos longos períodos de estiagem do ano, sendo plantada em pequenas propriedades, notadamente na agricultura familiar (INGLESE, 2001; PIMIENTA, 2003; MENEZES et al., 2005). Nesta região, são exploradas três cultivares de palma forrageira: a Gigante e a Redonda, pertencente a espécie *Opuntia ficus-indica* Mill e a miúda ou doce, pertencente a espécie *N. cochenillifera* Salm Dyck (LOPES et al., 2007).

A palma forrageira é hospedeira de diversos patógenos, destacando-se os de natureza fúngica, que atacam preferencialmente os cladódios, ricos em água (BENNA, 1991; SWART et al., 2003). Dentre as doenças descritas no Nordeste, destacam-se as podridões dos cladódios, as podridões de raízes e as manchas dos cladódios (BARBOSA et al., 2012; FLORES-FLORES et al., 2013; SOUZA et al., 2010; FEIJÓ, et al., 2016). No Brasil, as manchas de cladódios mais importantes são à mancha-marrom e à mancha-escamosa (SOUZA et al., 2010; CONFORTE et al., 2016). De acordo com Santos et al., (2006), a expansão dessa cultura e o plantio adensado podem contribuir para o aumento da incidência dessas doenças, justificando estudos mais detalhados, principalmente no que se refere a estudos epidemiológico e de etiologias.

O levantamento de fitopatógenos têm o objetivo de fornecer informações relevantes sobre doenças de plantas, para que se possa desenvolver programas eficientes de controle para a cultura em questão (CAMPBELL; MADDEN, 1990). Em palma forrageira, poucos estudos são concentrados nesse propósito, dificultando a adoção de estratégias de controle. Em estudos recentes sobre doenças nessa cultura foram identificados novos agentes etiológicos envolvidos com as manchas nos cladódios no México e mais recentemente no Brasil (FLORES-FLORES et al., 2013; CONFORTE et al., 2016).

Considerando este fato e a relativa importância do cultivo da palma forrageira e sua expressão no semiárido nordestino, objetivou-se com este estudo, determinar a

etiologia e prevalência das manchas de cladódios da palma forrageira miúda no Nordeste do Brasil.

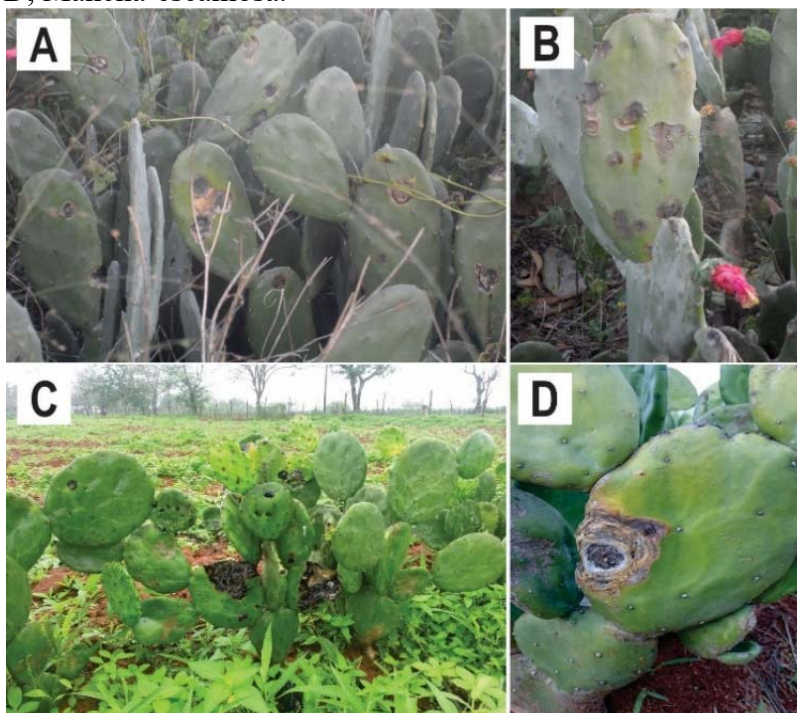
3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia Molecular e Virologia vegetal do Centro de Ciências Agrárias (CECA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

3.2.1 Origem, obtenção e preservação dos isolados

Cladódios apresentando sintomas de manchas necróticas em sua superfície (Figura 1), foram coletados em regiões produtoras da cultura, sendo cinco municípios no estado de Alagoas: Arapiraca, Delmiro Gouveia, Cacimbinhas, Estrela de Alagoas e Santana do Ipanema, e três municípios no estado de Pernambuco: Bom Conselho, São João e Lajedo, de onde foram coletados 50 cladódios por área, quantidade esta, definida como padrão de coleta.

Figura 1 - Sintomas de manchas nos cladódios em palma forrageira miúda. A-B, Mancha-marrom e C-D, Mancha-escamosa.



Fonte: Autor, 2016.

Os cladódios foram lavados e secos naturalmente. Foram realizados isolamentos indireto, onde foram retirados fragmentos da área de transição entre o tecido sadio e o doente, os quais foram desinfestados com soluções de álcool 70% por 30 segundos,

hipoclorito de sódio 1% por 1,5 minutos, lavados em água destilada esterilizada (ADE) por 3 vezes, postos para secar em papel de filtro e posteriormente transferidos para placas de Petri contendo meio BDA (Batata- Dextrose-Ágar). Após a formação das colônias, discos de meio de cultura contendo estruturas do patógeno, foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA e mantidos à temperatura de 25 °C por 10 dias, até o surgimento das estruturas de reprodução do patógeno para posterior identificação.

3.2.2 Teste de patogenicidade

Para os testes de patogenicidade foram utilizados cladódios assintomáticos de palma forrageira Miúda (*N. cochenillifera*). Estes, foram tratados com solução de hipoclorito de sódio a 1% por cinco minutos, lavados em água destilada esterilizada (ADE) e secos à temperatura ambiente. As inoculações foram realizadas em cladódios com e sem ferimentos utilizando-se dois métodos. No primeiro método as inoculações foram realizadas através de alíquotas de 40µL, sendo quatro gotas de suspensão de esporos (10⁶ conídios/mL-1) e uma gota de ADE (testemunha), sobre a superfície dos cladódios em posições equidistantes. Os ferimentos foram causados com o auxílio de uma agulha previamente esterilizada. No segundo método, discos contendo estruturas do patógeno com diâmetro de 5mm, foram depositados sobre os cladódios sem ferimento e com ferimentos causados com o auxílio de uma agulha esterilizada. Nas testemunhas foram utilizadas apenas discos de BDA. Posteriormente, os cladódios foram acondicionados separadamente em sacos plásticos contendo um chumaço de algodão umedecido com ADE. O experimento foi mantido em incubadora tipo BOD a 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 horas por até 10 dias.

3.2.3 Caracterização molecular

3.2.3.1. Extração de DNA genômico, Amplificação e Sequenciamento

A extração de DNA foi realizada segundo protocolo CTAB adaptado de Doyle & Doyle (1987). O DNA obtido de cada isolado foi utilizado como molde em PCR contendo os primers ITS1/ITS4 que codifica para a região ITS-rDNA (White et al., 1990). Em seguida, os produtos de PCR foram enviados para purificação e sequenciamento na empresa Macrogen na Coreia do Sul. As sequências de nucleotídeos foram montadas com o software Codon Code Aligner v. 4.1.1 (www.codoncode.com) (Codon Code Corporation, Dedham, Massachusetts, USA), e analisadas visualmente. As sequências parciais obtidas para a região ITS foram analisadas com o algoritmo BLASTn e o banco

de dados de nucleotídeos não-redundante GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank), para determinação dos gêneros fungicos.

3.2.4 Caracterização morfológica

Para caracterização cultural, discos de meio de cultura contendo estruturas do patógeno foram retirados das bordas das colônias cultivadas por sete dias e transferidos para placas de Petri contendo BDA sintético. Os tratamentos foram mantidos em incubadora BOD a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo a repetição constituída por uma placa de Petri. Foram realizadas avaliações diárias do crescimento micelial das colônias (mm) em duas direções diametricamente opostas no fundo externo das placas, com auxílio de um paquímetro digital, durante sete dias. Também foram observadas a coloração das colônias e o aspecto do micélio aéreo. Os dados obtidos foram utilizados para calcular o índice de crescimento micelial (ICM, mm/dia), utilizando a fórmula: $\text{ICM} = \Sigma(D - D_a)/N$, sendo: ICM = índice de velocidade de crescimento micelial, D = diâmetro médio atual da colônia D_a = diâmetro médio da colônia do dia anterior N = número de dias após a inoculação. Para caracterização morfológica, tamanho e forma dos conídios e de outras estruturas provenientes de cada gênero fúngico obtido, foram mensurados por imagens capturadas por câmera digital (Olympus IX2-SLP) acoplada a microscópio óptico com aumento de 400x, projetada em monitor de computador, através do software Cellsenses Standard (SAMSUNG SDC-415®). Os conídios, bem como outras estruturas foram produzidos em meio BDA sintético, mantidos em incubadora BOD a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas por 10 dias.

3.2.5 Análises de Prevalência

As análises percentuais de prevalência, foram calculadas baseando-se na quantidade de microrganismos obtidos por Estado e no total de microrganismos obtidos em todo o estudo.

3.3 RESULTADOS

3.3.1. Isolados obtidos

Foram obtidos 118 isolados patogênicos, sendo 55 isolados provenientes do Estado de Alagoas e 63 do Estado de Pernambuco (Tabela 1).

Tabela 1 - Identificação dos isolados obtidos nos municípios de Alagoas e Pernambuco.

Localidade	Isolados
Arapiraca/AL	A-5, A-7, A-14.1, A-15, A-23, A-31, A-34, A-38, A-44 e A-48.
Delmiro Gouveia/AL	DG-1.2, DG-2, DG-3, DG-4, DG-5, DG-6, DG-8, DG-13, DG-19, DG-23 e DG-25.
Santana do Ipanema/AL	SI-1.1, SI-2, SI-3, SI-4, SI-5, SI-19 e SI-26.
Cacimbinhas/AL	C-1, C-2, C-4, C-5, C-6, C-8, C-9, C-19, C-29, C-36, C-42 e C-44.
Estrela de Alagoas/AL	EA-2.1, EA-4.4, EA-5.1, EA-6, EA-8, EA-11, EA-13.1, EA-15.1, EA-18, EA-26.1, EA-34, EA-26, EA-43, EA-45 e EA-50.
Bom Conselho/PE	BC-1, BC-2, BC-3, BC-4, BC-5, BC-6, BC-8, BC-10, BC-11, BC-12, BC-13, BC-14, BC-15, BC-16, BC-17, BC-18 e BC-19.
São João/PE	SJ-2, SJ-4, SJ-7, SJ-8, SJ-12, SJ-12.2, SJ-13, SJ-14.1, SJ-15, SJ-15.1, SJ-17, SJ-19, SJ-21, SJ-23, SJ-25, SJ-48 e SJ-50.
Lajedo/PE	L-1, L-2, L-2.1, L-3, L-4, L-5, L-7, L-8.1, L-9, L-10, L-11, L-12.1, L-14

3.3.2 Teste de patogenicidade

Nos testes de patogenicidade, todos os isolados que foram patogênicos à palma Miúda, causaram sintomas em torno do sétimo dia após as inoculações, consistindo de lesões circulares e necróticas que posteriormente foram observadas na outra face do cladódio. Só foram observados sintomas apenas em cladódio com ferimentos. Todos os isolados causaram lesões quando a inoculação se deu pela deposição de discos de meio de cultura contendo estruturas do patógeno. Porém, apenas os isolados identificados por morfologia como *Fusarium* sp. causaram lesões quando inoculados por meio de suspensão de inóculo (Figura 2).

Figura 2 - Sintomas causados por isolados patogênicos após oito dias de incubação. A - *Neopestalotiopsis*, B - *Macrophomina*, C - *Lasiodiplodia*, D - *Colletotrichum*, E - *Neofusicoccum* e F - *Fusarium*.



Fonte: Autor, 2016.

3.3.3 Caracterização Molecular, morfológica e cultural

Inicialmente, através das características morfológicas foram identificados nove gêneros fúngicos dentre os 118 isolados obtidos: *Altenaria* (15), *Colletotrichum* (17), *Diaporthe* (8), *Fusarium* (27), *Lasiodiplodia* (5), *Macrophomina* (6), *Neofusicoccum* (12), *Neoscytalidium* (21) e *Neopestalotiopsis* (7). Com base nesta morfologia, 27 isolados foram escolhidos aleatoriamente, sendo três representantes de cada gênero (C-8, L-1, SJ-14.1, BC-15, BC-4, SJ-12, DG-1.2, SI-19, SI-26, BC-12, EA-18, L-10, BC-1, BC-5, EA43, BC-14, BC-17, BC-25, L-5, L32.1, SJ-25, C-42, EA-26.1 e EA-36), os quais, foram caracterizados molecularmente utilizando sequências parciais do espaçador interno transcrito (ITS - rDNA).

Foram realizadas comparações com sequências do banco de dados NCBI utilizando a ferramenta, BLAST que revelou a identidade dos isolados como pertencentes a nove gêneros distintos: *Fusarium*, *Neoscytalidium*, *Colletotrichum*, *Macrophomina*, *Neopestalotiopsis*, *Altenaria*, *Lasiodiplodia*, *Diaporthe* e *Neofusicoccum*, confirmando a caracterização morfológica preliminar.

A caracterização morfológica desses isolados, através de análises microscópicas das estruturas dos fungos, esteve em total consonância com a caracterização molecular, ou seja, foram identificados nove gêneros, cada qual com três isolados. As características morfológicas e moleculares podem ser observadas na Tabela 2. sendo compatíveis também com as características culturais dos gêneros fúngicos obtidos neste estudo (Tabela 2; Tabela 3).

Tabela 2 - Morfologia e identificação dos 27 isolados obtidos de palma Míuda ao nível de gênero utilizando a região ITS como marcador molecular

Isolados	Características Morfológicas e identificação dos gêneros fúngicos			
	Estruturas	Comp.	Largura	Gênero
C-8	Microconídios hialinos de forma oval a cilíndrica sem presença de septos e macroconídios ausente.	1,90-4,27	0,51-160	<i>Fusarium</i>
L-1		2,15-4,11	0,64-1,55	
SJ-14.1		1,81-4,05	0,66-1,73	
C-6	Conídios pigmentados, cilíndricos, esféricos ou sub-esféricos, lisos e a grande maioria sem septo.	2,38-5,24	0,97-1,95	<i>Neoscytalidium</i>
EA-11		2,38-6,23	1,02-2,41	
L-3		1,82-6,07	0,80-2,15	
A-38	Conídios hialinos, com formato reto, cilíndrico, com ligeira constrição no centro, tendo as duas extremidades arredondadas ou com uma	c- 3,55-6,11	1,95-2,84	<i>Colletotrichum</i>
		a- 1,95-4,80	1,58-2,86	
BC-15	extremidade pontiaguda. Apressórios de coloração castanho médio a escuro, subglobosos ou irregular.	c- 6,16-9,41	2,58-4,49	
		a- 3,20-7,76	2,31-5,32	
EA-45		c- 4,64-7,33	1,36-2,74	
		a- 3,70-7,80	2,66-4,47	
DG-1.2	Formaram picnídios escuros e conídios hialinos unicelulares	6,74-10,48	2,95-4,98	<i>Macrophomina</i>
SI-19		6,68-10,35	3,04-5,02	
SI-26		7,68-10,45	3,24-4,64	
BC-12	Conídios com cinco células sendo à apical e basal	9,41-17,71	2,27-3,69	<i>Neopestalotiopsis</i>
EA-18	hialinas apresentando de dois a três apêndices as células medianas pigmentadas variando de marrom a castanho-escuro	7,33-13,03	2,08-4,00	
L-10		8,32-13,00	2,41-3,55	
BC-1	Conídios marrom claro, em forma de clava ou pera invertida, ovóides ou elipsóides. Apresentam septos em dois sentidos	6,07-14,97	2,23-5,66	<i>Altenaria</i>
BC-5		6,84-24,33	2,88-9,44	
EA-43		8,94-32,42	2,13-8,86	
BC-14	Conídios imaturos hialinos e unicelulares, parede celular espessa. Conídios maduros são bicelulares, com estrias e coloração marrom-escuro.	8,36-14,67	5,48-8,86	<i>Lasioidiplodia</i>
BC-17		8,71-14,75	5,71-9,32	
BC-25		8,16-13,73	4,35-8,04	
L-5	Alfa conídios hialinos, unicelulares de formato ovoide e também beta conídios hialinos, filiformes, a maioria curvos em uma das extremidades, sem presença de septos	α - 1,93-3,78	0,82-1,13	<i>Diaporthe</i>
L32.1		β - 7,00-12,40	0,96-1,35	
		α - 1,61-3,20	0,51-1,60	
		β - 10,12-17,35	0,48-1,61	
		α - 2,60-4,79	1,01-1,59	
SJ-25		β - 7,34-11,06	0,82-1,31	
C-42	Hialinos, fusiformes, asseptados, com parede fina, lisos, mais largos no centro, sub-obtuso e base truncada.	7,01-11,00	1,79-3,75	<i>Neofusicoccum</i>
EA-26.1		7,14-11,56	1,89-4,01	
EA-36		7,17-11,32	1,82-3,77	

*c=conídio, a=apressórios, α = α conídios e β = β conídios.

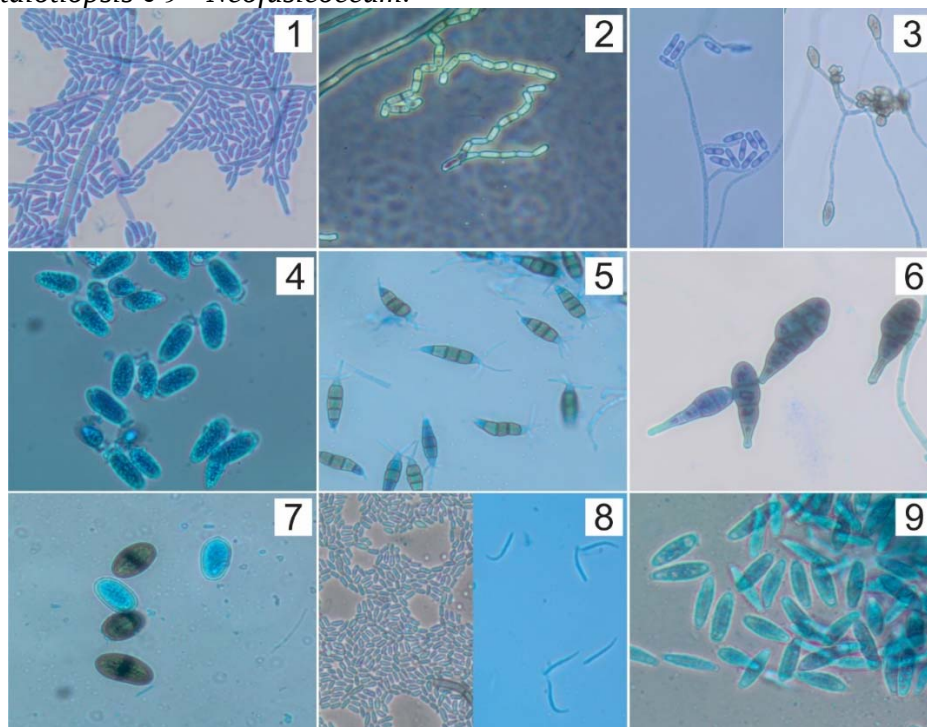
Tabela 3 - Características culturais de coloração das colônias e índice de crescimento micelial (mm/dia) dos 27 isolados obtidos das manchas de cladódios de palma miúda.

Gêneros	Isolados	Coloração das colônias		ICM (mm/dia)
		verso	reverso	
<i>Fusarium</i>	C-8	Avermelhado com borda branca	Amarronzado com borda branca	7,89
	L-1	Arroxeadado com borda branco	Arroxeadado com borda branca	8,77
	SJ-14.1	Amarelado com borda creme	Amarelado com borda creme	7,36
<i>Neoscytalidium</i>	C-6	Cinza claro	Cinza claro	11,38
	EA-11	Cinza esverdeado	Cinza claro	11,72
	L-3	Cinza escuro	Cinza escuro	10,48
<i>Colletotrichum</i>	A-38	Verde musgo com borda branca	Esverdeado com borda amarela	8,07
	BC-15	Branca	Amarela	7,77
	EA-45	Cinza com borda branca	Cinza claro com borda amarela	8,13
<i>Macrophomina</i>	DG-1.2	Cinza esverdeado	Cinza escuro	10,77
	SI-19	Cinza com borda branca	Cinza	11,06
	SI-26	Cinza esverdeado	Cinza escuro	10,74
<i>Neopestalotiopsis</i>	BC-12	Cinza com borda branca	Bege	9,76
	EA-18	Branca	Bege	11,00
	L-10	Branca	Bege	8,62
<i>Altenaria</i>	BC-1	Marrom	Verde musgo	5,03
	BC-5	Marrom com borda branca	Verde musgo com borda branca	4,30
	EA-43	Cinza com borda branca	Cinza escuro com borda creme	5,69
<i>Lasiodiplodia</i>	BC-14	Verde	Cinza esverdeado	9,71
	BC-17	Verde	Cinza esverdeado	9,65
	BC-25	Cinza	Cinza escuro	9,82
<i>Diaporthe</i>	L-5	Cinza com borda branca	Marrom com borda bege e verde	12,86
	L32.1	Cinza com borda branca	Cinza azulado com borda bege	11,90
	SJ-25	Cinza com borda esverdeada	Verde escuro	11,94
<i>Neofusicoccum</i>	C-42	Cinza	Cinza escuro	10,85
	EA-26.1	Cinza com borda marrom	Cinza escuro	10,23
	EA-36	Cinza escuro, borda cinza claro	Bege com borda cinza	10,98

Na figura 3, é possível visualizar as características morfológicas inerentes a cada gênero fúngico obtido neste estudo. Como os microconídios de *Fusarium*, conídios de *Neoscytalidium*, conídios e apressórios de *Colletotrichum*, conídios de *Macrophomina*, *Neopestalotiopsis* e *Altenaria*, conídios imaturos e maduros de *Lasiodiplodia*, α e β -

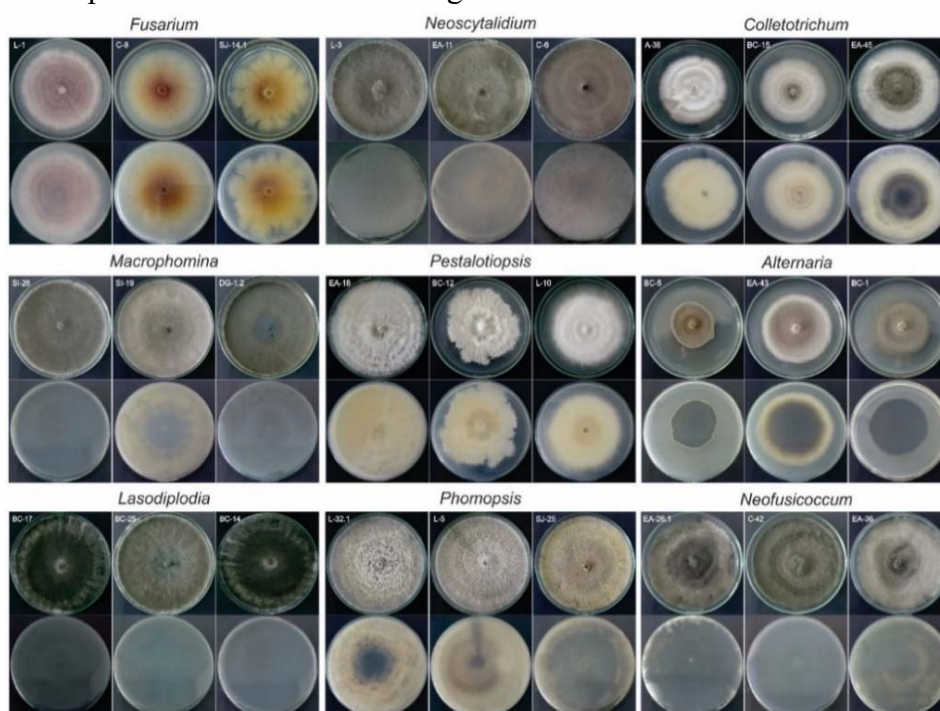
conídios de *Diaporthe* e conídios de *Neofusicoccum*. E na figura 4 podemos visualizar as colorações das colônias dos 27 isolados.

Figura 3 - Características morfológicas dos nove gêneros obtidos a partir das manchas de cladódios de palma miúda. 1 - *Fusarium*, 2 - *Neoscytalidium*, 3 - *Colletotrichum*, 4 - *Macrophomina*, 5 - *Neopestalotiopsis*, 6 - *Alternaria*, 7 - *Lasiodiplodia*, 8 - *Neopestalotiopsis* e 9 - *Neofusicoccum*.



Fonte: Autor, 2016.

Figura 4 - Aspecto das colônias dos nove gêneros obtidos dos 27 isolados caracterizados.

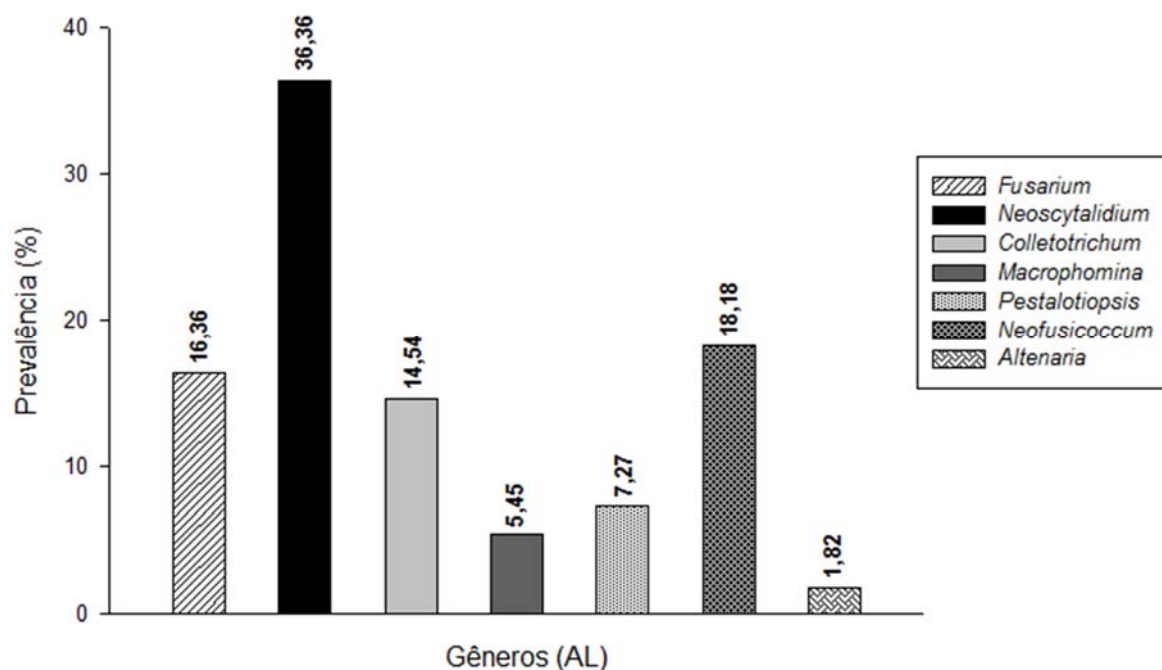


Fonte: Autor, 2016.

3.3.4 Prevalência dos isolados nos estados de Alagoas e Pernambuco

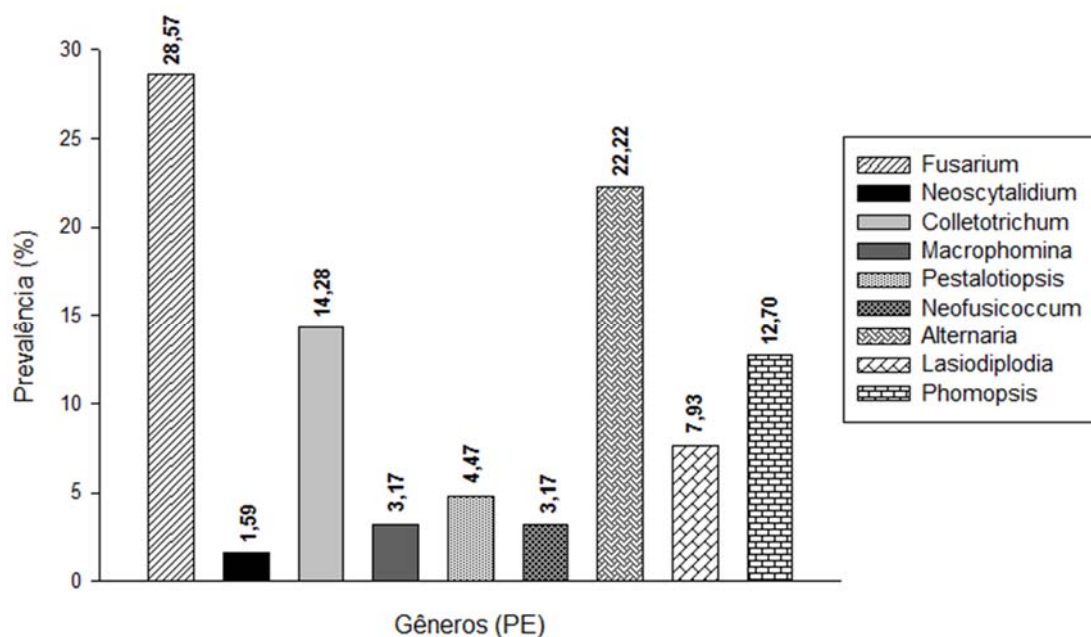
No Estado de Alagoas foram identificados, pelas características moleculares, morfológicas e culturais, sete gêneros fúngicos dentre os 55 isolados obtidos causando manchas nos cladódios de palma forrageira Miúda (*N. cochenillifera*). Destes, o gênero *Neoscytalidium* apresentou a maior prevalência, seguido dos gêneros *Neofusicoccum*, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Neopestalotiopsis*, *Macrophomina* e *Altenaria* (Figura 5).

Figura 5 - Prevalência dos gêneros fúngicos identificados no Estado de Alagoas.



No estado de Pernambuco, foram obtidos 63 isolados patogênicos em três áreas de coleta com 9 gêneros fúngicos identificados, onde, dos quais houve maior prevalência do gênero *Fusarium* com mais de 25% dos isolados obtidos. Os gêneros *Altenaria*, *Colletotrichum* e *Diaporthe* apresentaram moderada prevalência, seguidos dos gêneros, *Lasioidiplodia*, *Neopestalotiopsis*, *Macrophomina*, *Neofusicoccum* e *Neoscytalidium* (Figura 6).

Figura 6 - Prevalência dos gêneros fúngicos identificados no Estado de Pernambuco.

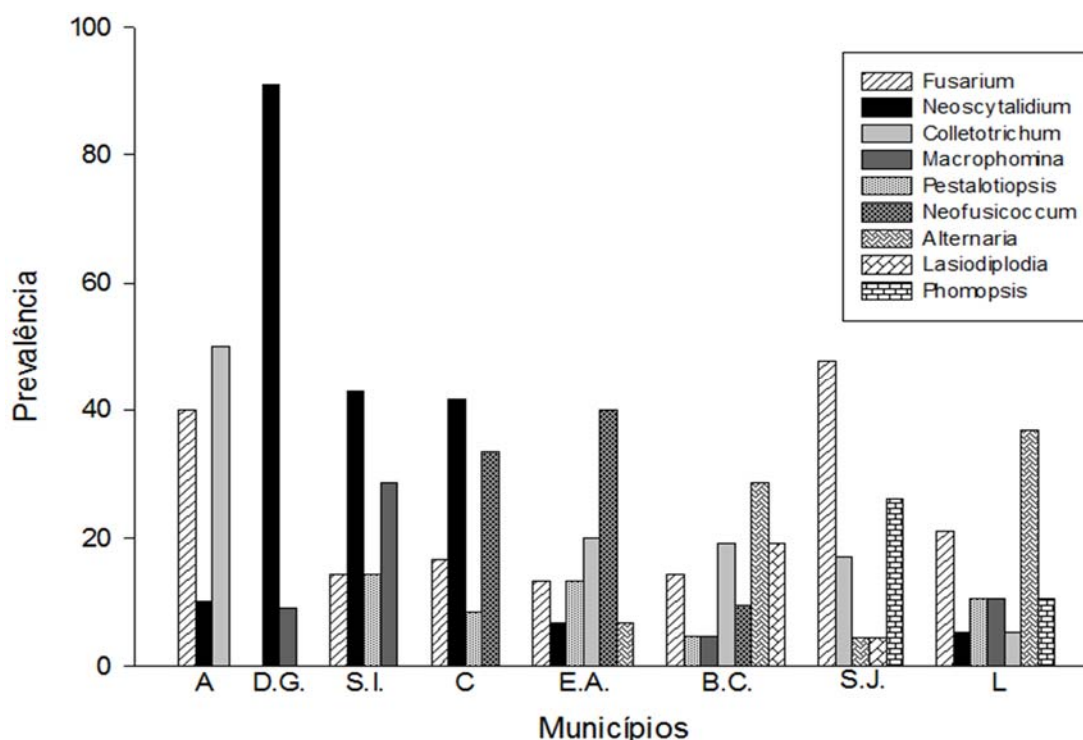


Ao analisar os isolados por localidade de coleta, percebe-se que em três municípios de Alagoas o gênero *Neoscytalidium*, foi prevalente (Delmiro Gouveia, Santana do Ipanema e Cacimbinhas). Em Arapiraca a prevalência foi do gênero *Colletotrichum*, seguido do gênero *Fusarium* que apresentou elevado número de isolados nessa região. Já no município de Estrela de Alagoas houve prevalência do gênero *Neofusicoccum* (Figura 7).

Dentre os isolados de menor prevalência, os gêneros *Macrophomina* e *Alternaria* já tem ocorrência relatada em palma forrageira, mas o gênero *Neopestalotiopsis* é a primeira vez que é relatado em palma Miúda no mundo.

O gênero *Fusarium* aparece com 80% dos municípios de coleta, entre Alagoas e Pernambuco, estando ausente apenas na região de Delmiro Gouveia. O gênero *Neopestalotiopsis* isolado em 60% dos municípios, os gêneros *Colletotrichum*, *Macrophomina* e *Neofusicoccum* em 40% dos municípios e por fim o gênero *Alternaria* que esteve presente em apenas 20% dos municípios. Em Pernambuco, o gênero *Alternaria* apresentou maior prevalência em dois dos três municípios de coleta, Bom Conselho e Lajedo. Já no município de São João, houve maior prevalência de isolados de *Fusarium*. Os dois gêneros isolados em 100% das áreas de coleta. Outro gênero que incidiu em 100% dos municípios de Pernambuco foi o *Colletotrichum* (Figura 7).

Figura 7 - Prevalência dos gêneros fúngico por município de coleta englobando os Estados de Alagoas e Pernambuco.



*A - Arapiraca, DG - Delmiro Gouveia, SI - Santana do Ipanema, C - Cacimbinhas, EA - Estrela de Alagoas, BC - Bom Conselho, SJ - São João e L - Lajedo.

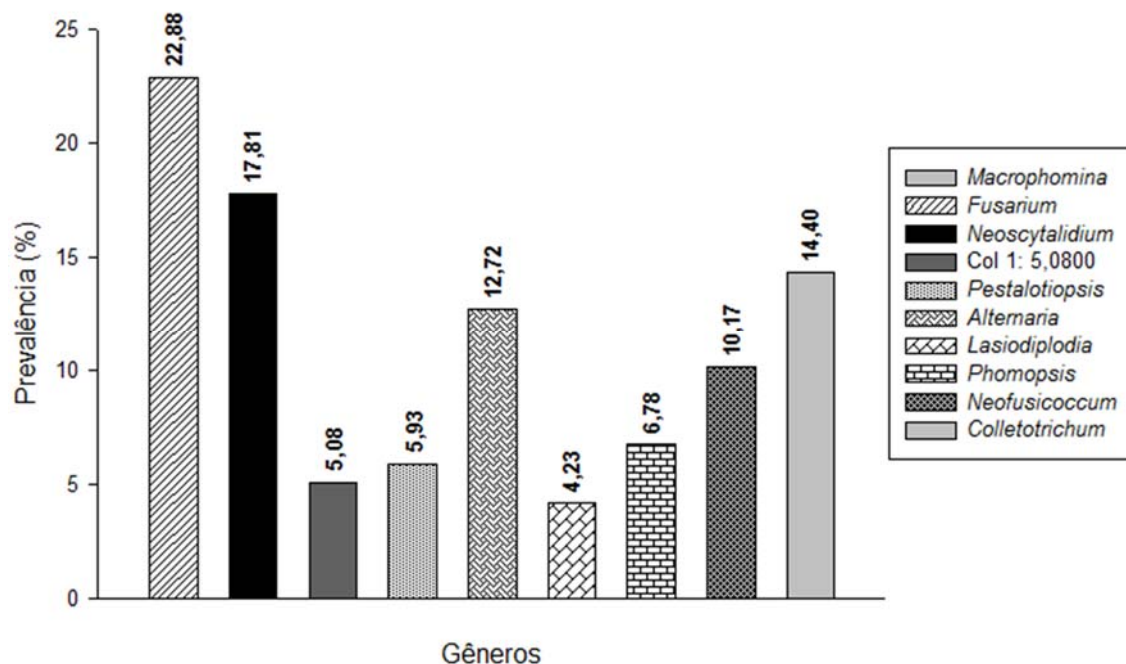
Bom Conselho e São João foram os únicos locais de coleta em que foram obtidos isolados do gênero *Lasiodiplodia*. Já o gênero *Diaporthe*, foi isolado apenas nos municípios de São João e Lajedo, apresentando patogenicidade em cladódios de palma Miúda, sendo este também a primeira ocorrência deste gênero nessa cultura.

Dentre os 118 isolados obtidos neste estudo, a maior prevalência foi do gênero *Fusarium* com 28 isolados, presente em sete dos oito municípios de coleta, nos Estados de Alagoas e Pernambuco (Figura 7). Esse gênero esteve ausente apenas no município de Delmiro Gouveia. Esta ausência poderia estar relacionada ao clima quente na época que as coletas foram realizadas nesse município (meados de maio de 2015), porém, foram obtidos isolados desse gênero no município de Santana do Ipanema, que também engloba o sertão de Alagoas juntamente com Delmiro Gouveia.

Na figura 8, observa-se também que o gênero *Neoscytalidium*, apresentou elevada prevalência com 21 isolados dentre os 118 obtidos neste estudo, apresentando maior quantidade de isolados no município de Delmiro Gouveia, porém, no Estado de Pernambuco, foi isolado apenas no município de Lajedo. Houve também elevada

prevalência dos isolados de *Colletotrichum* e *Alternaria*, que estiveram presentes em 60% e 50% respectivamente (Figura 7), nos municípios visitados entre Alagoas e Pernambuco.

Figura 8. Prevalência dos gêneros fúngicos de acordo com o total de isolados patogênicos obtidos nos oito municípios de coleta.



3.4 DISCUSSÃO

O presente estudo identificou com base nas características morfologias e sequenciamento da região ITS, nove gêneros fúngicos associados a duas principais doenças da palma forrageira miúda encontradas na região do Nordeste brasileiro, mancha marrom (*Alternaria*, *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Macrophomina*, *Neopestalotiopsis* e *Neofusicoccum*) e mancha escamosa (*Neoscytalidium*).

Nos testes de patogenicidade os sintomas observados foram semelhantes aos relatados por outros autores em estudos de etiologia fúngica em cladódios de palma forrageira, com lesões circulares e deprimidas, podendo ser observadas na outra face do cladódio (LIMA et al., 2011, FLORES-FLORES et al., 2013). Assim como outros autores observaram, as lesões só foram visualizadas nas inoculações com ferimento, e de acordo com Varvaro et al. (1993), afirmaram que doenças nos cladódios de palma estão sempre associadas a ferimentos em sua superfície em condições controladas, corroborando com os testes realizados neste estudo. No campo, estes ferimentos podem ser causados pelo

rebanho no pastejo direto, por roedores ou pela retirada dos cladódios para alimentação dos animais no cocho (SOUZA et al., 2010).

Nas análises moleculares, é sabido que a caracterização filogenética utilizando apenas a região ITS para identificação de espécies fúngicas apresenta algumas limitações, e o conhecimento de marcadores mais informativos tornou-se cada vez mais necessário (SHARMA et al., 2013; WEIR et al., 2012), principalmente para o gênero *Colletotrichum* que necessita de vários genes como a proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), actina (ACT), Quitina sintetase (CHS), β -tubulina (β -tub), Calmodulina (CAL) região ITS, entre outros (WEIR et al., 2012; DAMM et al., 2012a; DAMM et al., 2012b; DAMM et al., 2014; CANNON et al., 2012). Contudo, para a identificação ao nível de gênero, a caracterização molecular baseada na região ITS foi suficiente.

Em relação a morfologia, a maioria dos gêneros fúngicos apresentaram características compatíveis de tamanho e forma dos conídios com outros trabalhos, exceto para os isolados do gênero *Fusarium* que apresentaram apenas microconídios (CROUS et al., 2006; PRIHASTUTI et al., 2009; MACHADO et al., 2010; PHILLIPS et al., 2013; HYDE et al., 2014; SARR et al., 2014) (Tabela 3; Tabela 4). Apesar dos isolados pertencentes ao gênero *Fusarium* não produzirem macroconídios, outros autores citam que mesmo não sendo uma característica usual é possível que possa ocorrer (DORIA, 2012), uma vez que a taxonomia desse gênero é bastante controversa em relação a identificação de espécies, sendo de fundamental importância a caracterização filogenética utilizando genes específicos como o Fator de alongação (EF1- α) e RNA polimerase II (RPBII).

A caracterização dos gêneros *Lasiodiplodia*, *Macrophomina*, *Neofusicoccum* e *Neoscytalidium*, que são pertencentes a família Botryosphaeriaceae por morfologia é bastante confusa, sendo necessário o uso de métodos moleculares como o uso da região ITS, e dos genes EF1- α e β tubulina para a identificação precisa das espécies. A caracterização molecular utilizando apenas um gene pode subestimar a identificação de espécies estritamente relacionadas dentro das inúmeras espécies dessa família (Taylor et al., 2000).

Nos testes de prevalência, no Estado da Paraíba, o gênero *Scytalidium*, atualmente reclassificado para *Neoscytalidium*, foi detectado em 100% das áreas visitadas nos municípios dessa região, causando a doença conhecida como mancha-escamosa em palma Gigante (*O. ficus-indica*) (SOUZA et al., 2010). Esta doença é de ocorrência comum na palma Gigante, sendo observada em vários estados do Nordeste (SANTOS et

al., 2006). A doença caracteriza-se pelo surgimento de ondulações semelhantes a escamas sobre a área da lesão no cladódio que podem surgir no centro, na extremidade ou no local de inserção dos artículos primário, secundário ou terciário, chegando a atingir toda área do cladódio (LOPES et al., 2007). É uma doença pouco estudada e o patógeno é de difícil controle podendo acarretar prejuízos significativos ao produtor, ocasionando queda de parte da planta e por consequência causar redução da produtividade (SOUZA et al, 2010; BARBOSA et al, 2012). No entanto, essa é o primeiro registro de mancha escamosa em palma Miúda no Brasil.

Além da palma forrageira, o gênero *Neoscytalidium* foi também relatado em outras culturas como mangueira, causando podridão peduncular (GHINI; KIMATI, 1984), baunilha, ocasionando manchas em folhas, hastes e frutos (VERZIGNASSI et al., 2007), murcha em citrus (OREN et al., 2001) e a podridão negra em raízes de mandioca (LARANJEIRA et al., 1994; POLTRONIERI et al., 1998; MUNIZ et al., 1999; MSIKITA et al., 2005, MACHADO et al., 2014).

No estado de Alagoas, verificou-se a prevalência de três gêneros fúngicos: *Neofusicoccum*, *Fusarium* e *Colletotrichum*. Dentre estes o gênero *Neofusicoccum*, que é considerado um importante fitopatógeno de espécies lenhosas em regiões temperadas do mundo (PHILLIPS 2002; VAN NIEKERK et al 2004; INDERBITZIN et al. 2010; CHEN et al. 2011), foi relatado pela primeira vez no Brasil causando doença na mangueira (COSTA et al., 2010; MARQUES et al., 2013). Em palma forrageira Miúda esse gênero foi relatado pela primeira vez em Pernambuco (CONFORTO et al., 2016), no entanto, é o primeiro relatado de *Neofusicoccum* causando mancha marrom em Alagoas.

Fusarium é um importante gênero fúngico causador de várias doenças nos mais variados hospedeiros vegetais (SUMMERELL; LESLIE, 2011). Em palma forrageira a espécie *F. solani* já foi relatada em cladódios e frutos de *O. fícus-indica*, causando podridão nos cladódios em diversos países (MORALES, HERNÁNDEZ, 2002; AMMAR et al., 2004).

Já o gênero *Altenaria*, ocorre frequentemente em cladódios de palma forrageira miúda causando mancha de *Altenaria*. Os sintomas se caracterizam por numerosas manchas pequenas, quase pretas de formato circular (LIMA et al., 2011). Estudos com cladódios na África do Sul (SWART, KRIEL, 2002) e nos Estados Unidos (FARR et al., 1989), relataram esse gênero como causador de necrose em cladódios de *O. fícus-indica*. Pesquisas realizadas por Souza et al. (2010) também apontam este gênero como patógeno de palma forrageira no Brasil.

O gênero *Colletotrichum* foi identificado pela primeira vez causando doença em palma forrageira no México, através das características morfológicas do patógeno, (MÉNDEZ-GALLEGOS et al., 2008; QUEZADA-SALINAS et al., 2006). No Brasil, o gênero *Colletotrichum*, foi relatado em palma miúda, utilizando técnicas moleculares por Rosa et al. (2008) mas, estudos relacionados a esse gênero ainda são bastante escassos.

Já o gênero *Diaporthe* foi descrito causando doença em diversas culturas, mas, é a primeira vez que é relatado em palma forrageira miúda. Esse gênero, inclui espécies fitopatogênicas de ocorrência cosmopolita, que podem infectar uma grande variedade de plantas herbáceas e lenhosas, podendo causar perdas de importância econômica. Podem provocar sintomas como, murchas, necroses, cancos, podridões, secamento de hastes e ramos, podendo resultar na morte da planta parasitada (KRUPPA et al., 2012).

Observa-se também que no Estado de Alagoas, o gênero *Neoscytalydium* aparece em 100% dos locais de coleta, assim como ocorreu nos municípios do estado da Paraíba, demonstrando está amplamente distribuído nessas regiões (SOUZA et al., 2010). Já em Pernambuco, este patógeno foi apenas identificado no município de Lajedo. Como foi mencionado anteriormente, este gênero ataca diversos hospedeiros. Uma das hipóteses para sua ampla distribuição no Estado de Alagoas, pode ser a migração do patógeno de uma planta cultivada para outra, uma vez que, no Brasil é relatada apenas uma espécie desse gênero ou até mesmo, pelo livre transporte de material vegetal infectado (MACHADO et al., 2014; CORREIA et al., 2016).

Neste estudo, fica evidenciado a presença de duas manchas distintas que são comumente encontradas em cladódios de palma forrageira: mancha escamosa e mancha-marrom no Brasil. A mancha-escamosa é causada por um único gênero fúngico, *Neoscytalydium*, sendo este o primeiro estudo relatando este patógeno em palma Miúda (*N. cochenilifera*) no mundo, uma vez que, até então, era de ocorrência comum apenas em palma Gigante (*O. ficus-indica*).

Já a mancha-marrom ocorre na cultura da palma forrageira Miúda em diversos países e sua etiologia tem sido bastante conflitante, pois diversos gêneros fúngicos foram relatados como causador desta doença: *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium* e *Pseudocercospora* (SOUZA et al., 2010; BARBOSA et al., 2012; FLORES-FLORES et al., 2013).

No Brasil, essa doença foi relatada pela primeira vez no município de São Bento do Una - PE no ano de 2001, com alta incidência e severidade em palma forrageira Miúda. Atualmente ocorre de forma generalizada em diversos municípios do agreste e sertão nos

Estados de Alagoas, Pernambuco e Paraíba, sendo sempre atribuída erroneamente ao gênero *Altenaria* (LIMA et al., 2011; BARBOSA et al., 2012).

Porém, este estudo demonstra que no Brasil esta doença não é causada apenas pelo gênero *Altenaria* como descrito anteriormente, uma vez que diversos gêneros fúngicos, tais como: *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Macrophomina*, *Neofusicoccum*, *Neopestalotiopsis* e *Diaporthe*, foram observados causando a mancha-marrom. Destes, apenas o gênero *Neofusicoccum* foi relatado recentemente associado a mancha-marrom no Estado de Pernambuco (CONFORTO et al., 2016). Ressalta-se também que, os gêneros *Lasiodiplodia* e *Macrophomina* já haviam sido relatados em palma forrageira causando podridão negra e podridão de *Macrophomina*, respectivamente (GRANATA, 2001; AMMAR et al., 2004; SOUZA et al., 2010), contudo, esta é a primeira vez que estes gêneros são associados a mancha marrom no mundo.

Este trabalho demonstra também a escassez de estudos relacionados a etiologia das manchas de cladódio de palma forrageira Miúda, principalmente sobre a mancha-marrom que durante vários anos eram exclusivamente associadas ao gênero *Altenaria*.

3.5 CONCLUSÕES

- Os gêneros fúngicos, *Fusarium*, *Neoscytalidium*, *Colletotrichum*, *Macrophomina*, *Neopestalotiopsis*, *Altenaria*, *Diaporthe*, *Lasiodiplodia*, *Neopestalotiopsis* e *Neofusicoccum*, são causadores de manchas em cladódios de palma forrageira Miúda.
- *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Macrophomina*, *Neopestalotiopsis*, *Altenaria*, *Lasiodiplodia*, *Diaporthe* e *Neofusicoccum*, são associados a mancha marrom da palma Miúda.
- *Neoscytalidium* é o único gênero associado a mancha escamosa.
- Os gêneros *Fusarium* e *Neoscytalidium*, são os mais prevalentes.

REFERÊNCIAS

- AMMAR, M. I. et al. Cladode and Fruit Rots of Prickly Pear (*Opuntia ficus-indica* L. Mill.) in Egypt. **Egyptian Journal of Phytopathology**, v. 32, n. 1-2, p. 119-128, 2004.
- BARBOSA, R. S. et al. Doenças da Palma Forrageira. In: LOPES, E. B. (Ed.) **Palma forrageira: Cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semiárido nordestino**. João Pessoa: EMEPA/FAEPA, p. 81 – 98, 2012.
- BENNA, A. **As cactáceas forrageiras nas terras secas do Nordeste**. Brasil Agrícola 2 (6):173-176, 1991.
- CHEN, S.F. et al. **Characterization of Botryosphaeriaceae from plantation grown Eucalyptus species in South China**. Plant Pathology, v. 60, p. 739–751, 2011.
- 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.
- CANNON, P.F. et al. *Colletotrichum*- current status and future directions. Studies in Mycology. v.73, p.181-213, 2012.
- CORREIA, K.C., SILVA, M.A., MORAIS JR, M.A., ARMENGOLD, J., PHILLIPS, A.J.L., CÂMARA, M.P.S., MICHEREFFB, S.J. Phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of table grape in the main Brazilian exporting region. **Plant Pathology** 65, 92–103, 2016.
- CROUS, P.W., SLIPPERS, B., WINGFIELD, M.J., RHEEDER, J., MARASAS, W.F.O., PHILLIPS, A.J.L., ALVES, A., BURGESS, T.I., BARBER, P.A., GROENEWALD, J.Z. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Studies in Mycology**, v. 55, p. 235-253, 2006.
- CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L V. **Introduction to Plant Disease Epidemiology**. New York. John Wiley & Sons. 532p, 1990.
- CONFORTO C.; LIMA N. B.; GARCETE-GÓMEZ J. M.; CÂMARA M. P. S.; MICHEREFF S. J. First Report of Cladode Brown Spot in Cactus Prickly Pear Caused by *Neofusicoccum batangarum* in Brazil Plant Disease, v. 100, p.1238, 2016.
- DAMM, U. et al. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p.1-36, 2012a.
- DAMM, U. et al. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology**, v.73, p. 37–113, Aug., 2012b.
- DAMM, U. et al. The *Colletotrichum destructivum* species complex – hemibiotrophic pathogens of forage and field crops. **Studies in Mycology**, v. 79, p. 49–84, Sept., 2014.
- DOYLE, J.J.; DOYLE J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry**, v.19, p.11-15, 1987.

DORIA, K. A. B. V.S. Caracterização morfológica, cultural, molecular e enzimática de isolados de *Fusarium* spp. e seringueira. UNESP, Botucatu, 2012. 130p. Tese (Doutorado).

FARR, D.F. et al. **Fungi on Plants and Plant Products in the United States**. St Paul, MN, USA, APS Press. 1989.

FEIJÓ F. M.; RAMOS-SOBRINHO R.; SILVA M. J. S.; Barbosa L. F.; PINHO D. B.; ASSUNÇÃO I. P.; LIMA G. S. A., First Report of Cladode and Foot Rots Caused by *Pythium aphanidermatum* on Cactus (*Nopalea cochenillifera*). **Plant Disease**, v. 100, p.1797, 2016.

FLORES - FLORES, R. et al. Identification of Fungal Species Associated with Cladode Spot of Prickly Pear and Their Sensitivity to Chitosan. **Journal of Phytopathology**, v. 161, p. 544–552, 2013.

GHINI, R.; KIMATI, H. Podridão peduncular em mangueira. **Summa Phytopathology**, v.10, n. 79, 1984.

GRANATA G. Doenças bióticas e abióticas. In: BARBERA et al. **Agroecologia, cultivo e usos da palma forrageira**. FAO / SEBRAE – PB, p. 112 – 122, 2001.

GROENEWALD, Johannes Z. et al. Genetic diversity in *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 53, n. 2, p. 250-268, 2014.

HYDE, KEVIN D. et al. One stop shop: backbones trees for important phytopathogenic genera: I (2014). **Fungal Diversity**, v. 67, n. 1, p. 21-125, 2014.

INDERBITZIN, P. et al. Six locus phylogeny reveals high species diversity in Botryosphaeriaceae from California almond. **Mycologia**, v. 102, n. 6, p. 1350–1368, 2010.

INGLESE, P. Plantação e manejo do pomar. In: BARBERA, G.; INGLESE, P. (Eds.). **Agroecologia, cultivo e usos da palma forrageira**. Paraíba: SEBRAE/PB, 2001, p.79-93.

KRUPPA, P. C. et al. Ocorrência de *Phomopsis* sp. em sementes de urucum. **Biológico**, v.74, n.1, p.55-57, 2012.

LARANJEIRA, D. et al. Ocorrência da podridão negra da maniva e raiz da mandioca (*Manihot esculenta*) causada por *Scytalidium lignicola* no estado de Pernambuco, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 19, n.3, p. 466-469, 1994.

LIMA, G. S. A. et al. Development and validation of a standard area diagram set for assesment of *Altenaria* Spot on cladodes of the prickly pear cactus. **Journal of Plant Pathology**, v. 93, p. 691- 695, 2011.

LOPES, E. B. et al. **Palma forrageira: cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semiárido nordestino**. João Pessoa: EMEPA/FAEPA, 130p., 2007.

MACHADO A.R., PINHO D.B., PEREIRA O.L., 2014. Phylogeny, identification and pathogenicity of the Botryosphaeriaceae associated with collar and root rot of the

- biofuel plant *Jatropha curcas* in Brasil, with a description of new species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Diversity** 67, 231–47.
- MARQUES, M. W. et al. *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* and *PseudoFusicoccum* species associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, v. 61, p. 195-208, 2013.
- MÉNDEZ-GALLEGOS, S.J.; et al. Identificación y control de las principales enfermedades del nopal. **Revista Salud Pública y Nutrición**, v. 2, p. 2 – 13, 2008.
- MENEZES, R. S. C.; SIMÕES, D. A.; SAMPAIO, E. V. S. B. **A palma no Nordeste do Brasil – Conhecimento atual e novas perspectivas de uso**. Recife: Ed. Universitária da UFRPE, 2005, v. único, p. 44. 2005.
- MORALES, L. J.; HERNANDEZ, L. Y. Efecto de biofungicidas en el control de la mancha foliar del nopal verdura (*Opuntia ficus-indica* Mill.) en Tlanepantla, Morelos. (**Dissertação**). Chapingo, Estado de México, México, Universidad Autonoma de Chapingo. 2002.
- MSIKITA, W. et al. Prevalence and severity of *Nattrassia mangiferae* root and stem rot pathogen of cassava in Bénin. **Plant Disease**, v. 89, p. 12-16, 2005.
- MUNIZ, M. F.S. et al. *Scytalidium lignicola*: patógeno da mandioca no estado de Alagoas. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 25, p. 156-158, 1999.
- OREN, Y. et al. Scytalidium wilt of citrus. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, n. 4, p. 467-470, 2001.
- PHILLIPS, A. J. L. et al. A reassessment of the anamorphic fungus *Fusicoccum luteum* and description of its teleomorph *Botryosphaeria lutea* sp. nov. **Sydowia**, v. 54, p. 59–77, 2002.
- PHILLIPS, A.J.L., ALVES, A., ABDOLLAHZADEH, J., SLIPPERS, B., WINGFIELD, M.J., GROENEWALD, J.Z., CROUS, P.W. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. **Studies in Mycology**, v.76, p.51–167, 2013
- PIMIENTA, B.E. **Estudio de las causas que producen el engrosamiento de los cladodios en nopal (Opuntia spp.) en la zona de Chapingo**. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. 1974.
- POLTRONIERI, L. S. et al. Ocorrência da podridão negra das raízes e do caule da mandioca no estado do Pará causado por *Scytalidium lignicola*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, n. 3, p. 411, 1998.
- QUEZADA-SALINAS, A. et al. Etiología de la mancha negra del nopal (*Opuntia ficus-indica* Mill) en Tlanepantla, Morelos, México. **Agrociencia**, v. 40, p. 641 – 653, 2006.
- ROSA, R. C. T. et al. Assinalamento de *Colletotrichum gloeosporioides* em palma forrageira cultivar doce (*Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck). In: XLI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2008, Belo Horizonte. **Anais**. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2008 (CD-ROM).

RUSSEL, C.E.; FELKER, P. The Prickly Pears (*Opuntia* spp. Cactaceae): a source of human and animal food in semiarid regions. *Econ. Bot.* 41: 433-445 pp. 2007.

SANTOS, D. C. et al. **Manejo e utilização da palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) em Pernambuco.** Recife: IPA, 2006. 48p. (IPA, Documento 30).

SHARMA, G. et al. ITS-based diversity of *Colletotrichum* from India. *Current Research in Environmental & Applied Mycology* v. 3, n. 2, p. 194–220. Outubro, 2013.

SOUZA, A. E. F. et al. Ocorrência e identificação dos agentes etiológicos de doenças em palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill.) no semiárido paraibano. **Revista Biotemas**, v. 23, n. 3, p. 11 – 20, 2010.

SWART, W.J.; KRIEL, W.M. Pathogens associated with necrosis of cactus pear cladodes in South Africa. **Plant Disease**, v. 86, p. 693, 2002.

SWART, W. J.; SWART, V. R. An Overview of Research on Diseases of Cactus Pear in South Africa. **Journal of the Professional Association for Cactus Development**. v. 15, p. 115 – 120. 2003.

SUMMERELL, B. A.; LESLIE, J.F. Fifty years of *Fusarium*: how could nine species have ever been enough? **Fungal Diversity**, v. 50, p. 135–144, 2011.

TAYLOR, J. W. et al. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 31, n. 1, p. 21–32, 2000.

VAN NIEKERK, J. M. et al. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. **Mycologia**, v. 96, n. 4, p. 781–798, 2004.

VARVARO, L. et al. Severe *Erwinia* sp. damage on *Opuntia ficus-indica* in Italy. **Journal of Phytopathology**. v. 138, p. 325-330, 1993.

VERZIGNASSI, J.R. et al. *Scytalidium lignicola* causando manchas em folhas, hastes e frutos de baunilha. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n.1, p. 84, 2007.

WEIR, B. S. et al. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 115–180, 2012.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: INNIS, M. A. et al. (eds). A guide to methods and applications. **Academic Press**, New York, USA: p. 315-322, 1990.

4 CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE BOTRYOSPHAERIACEAE CAUSADORAS DE MANCHAS NOS CLADÓDIOS DA PALMA FORRAGEIRA MIÚDA NO NORDESTE DO BRASIL, COM UMA NO ESPÉCIES DE *Macrophomina*.

RESUMO

A palma forrageira (*Nopalea cochenillifera*) constitui uma alternativa importante para alimentação animal nas regiões mais áridas do nordeste brasileiro. Contudo, poucos trabalhos têm investigado as doenças que afetam a cultura, o que dificulta sua consolidação. Este estudo teve como objetivo identificar e caracterizar espécies de fungos pertencentes à família Botryosphaeriaceae associadas a manchas em cladódios de palma forrageira no Nordeste do Brasil. As identificações foram realizadas com base na morfologia e em análises filogenéticas utilizando sequências parciais do Espaçador Interno Transcrito (ITS), do Fator de Elongação (EF1- α) e do gene que codifica para β -tubulina. Foram identificadas cinco espécies: *L. theobromae*, *L. jatrophiicola*, *Macrophomina alagoensis* sp. nov., *Neofusicoccum batangarum* e *Neoscytalidium hyalinum*, sendo as quatro primeiras associadas à manchamarrom, enquanto que *N. hyalinum* foi associada à mancha-escamosa. As espécies *L. theobromae* e *N. batangarum* já foram descritas ocorrendo em palma Miúda, contudo, o presente estudo constitui os primeiros registros de *L. jatrophiicola*, *M. alagoensis* e *N. hyalinum* nessa cultura no mundo.

Palavras-chave: *Nopalea cochenillifera*. Doenças da Palma. Taxonomia. Filogenia.

ABSTRACT

Nopalea cochenillifera, is an important alternative for animal feeding in the more arid regions of the Brazilian northeast. However, few studies have investigated the diseases that affect culture, which makes it difficult to consolidate. The objective of this study was to identify and characterize fungal species belonging to the family Botryosphaeriaceae associated to patches of forage palm cladodes in Northeast Brazil. Identifications were performed based on morphology and phylogenetic analyzes using partial sequences of the Transcribed Internal Space (ITS), the Stretching Factor (EF1- α) and the gene encoding β -tubulin. Five species have been identified: *Lasiodiplodia theobromae*, *L. jatrophicola*, *Macrophomina alagoensis* sp. nov., *Neofusicoccum batangarum* and *Neoscytalidium hyalinum*, the first four being associated with brown spot, while *N. hyalinum* was associated with spot-squamous. The species *L. theobromae* and *N. batangarum* have already been described occurring in small palm, however, the present study constitutes the first records of *L. jatrophicola*, *M. alagoensis* and *N. hyalinum* in this culture.

Keywords: *Nopalea cochenillifera*. Cactus Diseases. Taxonomy. Phylogeny.

4.1 INTRODUÇÃO

No Nordeste brasileiro, a palma forrageira vem sendo uma cultura bastante explorada principalmente como fonte de alimento para o gado leiteiro nos prolongados períodos de estiagem (SANTOS et al., 2006). Estima-se que no Brasil a área cultivada com essa cultura seja de aproximadamente 600 mil hectares, concentrados principalmente nos estados da região Nordeste, que atualmente detém mais de 90% da produção do país (MENEZES et al., 2005; DUBEUX JR. et al., 2010).

A cultura da palma forrageira é hospedeira de diversos agente fitopatogênicos que atacam preferencialmente os cladódios, ricos em água, causando podridões e principalmente manchas em sua superfície, podendo comprometer a produtividade (SWART et al., 2003; SOUZA et al., 2010; BARBOSA et al., 2012; FLORES-FLORES et al., 2013; FEIJÓ, et al., 2016).

Apesar de frequentes, as doenças da palma forrageira têm sido pouco estudadas no Brasil, onde ocorrem dois tipos de manchas nos cladódios, a mancha-marrom e a mancha-escamosa. Dentre os fungos patogênicos associados a estas doenças em palma forrageira no Nordeste do Brasil, estão os membros da família Botryosphaeriaceae (SOUZA et al., 2010; CONFORTO et al., 2016). Membros dessa família são cosmopolitas, ocorrem em diversas plantas hospedeiras e podem ser encontrados como parasitas, saprófitas ou endofíticos, podendo mudar o estilo de vida dependendo das condições de estresse que a planta hospedeira venha a sofrer, tornando-os patogênicos (CROUS et al., 2006).

A maioria das espécies citadas na literatura pertencentes à família Botryosphaeriaceae causando doenças em palma forrageira, foram descritas apenas por registros de ocorrência, descrições de sintomas, dados morfológicos ou por sequenciamento utilizando apenas a região ITS (SANTOS et al., 2006; SOUZA et al., 2010). No entanto, a taxonomia de espécies pertencentes a Botryosphaeriaceae, baseando-se apenas na morfologia ou no uso de filogenia utilizando apenas uma região genômica, podem subestimar a diversidade de espécies estritamente relacionadas ou crípticas (HYDE et al., 2014). Dessa forma, para a identificação precisa das espécies pertencentes a essa família, são recomendadas filogenias multilocus para resolver espécies enigmáticas de Botryosphaeriaceae (SLIPPERS et al., 2004; BURGESS et al., 2006).

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo identificar e caracterizar espécies de fungos pertencentes à família Botryosphaeriaceae associadas a manchas em cladódios de palma forrageira Miúda no Nordeste do Brasil.

4.2 MATERIAL E MÉTODO

4.2.1 Obtenção dos Isolados

Em 2015, cladódios de palma Miúda apresentando sintomas de manchamarrom e mancha-escamosa foram coletados em regiões produtoras de seis municípios, sendo quatro no Estado de Alagoas: Cacimbinhas (CA), Delmiro Gouveia (DG), Estrela de Alagoas (EA) e Santana do Ipanema (SI), e dois no Estado de Pernambuco: Bom Conselho (BC) e Lajedo (LA). Os cladódios foram lavados, e em seguida, retirados fragmentos da área de transição entre o tecido sadio e doente, os quais foram desinfestados com álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio 1% por 1,5 minutos, lavados em água destilada esterilizada (ADE) por 3 vezes, postos para secar em papel de filtro e posteriormente transferidos para placas de Petri contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar). Discos de meio de cultura contendo estruturas do patógeno, foram retirados das bordas das colônias, transferidos para placas de Petri contendo meio BDA e mantidos à temperatura de 25° C por 10 dias, até o surgimento das estruturas de reprodução do patógeno para posterior identificação.

4.2.2 Caracterização molecular

Para caracterização molecular realizou-se a extração de DNA genômico, seguindo o protocolo CTAB adaptado de Doyle & Doyle (1987). As reações para as amplificações foram realizadas via PCR utilizando os pares de primers ITS1/ITS4, 728F/986R e BT2A/BT2B que correspondentes a região ITS e aos genes EF1- α e β -tub (WHITE et al., 1990; CARBONE; GLASS; DONALDSON, 1995; KOHN, 1999;). Os produtos amplificados foram enviados para purificação e sequenciamento na empresa MacroGen (Seul, Coreia do Sul). As sequências de nucleotídeos obtidas do sequenciamento, foram montadas com o Software Codon Code Aligner v. 6.0.2, e analisadas visualmente. O arranjo dos nucleotídeos em posições ambíguas, foram corrigidos por comparação das sequências nos sentidos senso e anti-senso. Inicialmente as análises foram feitas com o algoritmo BLASTn. Sequências de referência para várias espécies foram obtidas no GenBank (Tabela 4) e utilizadas para reconstrução da árvore filogenética. As sequências

foram alinhadas usando o algoritmo MUSCLE (EDGAR, 2004) no programa MEGA v.6 (TAMURA et al., 2013).

Tabela 4 - Códigos das culturas e números de acesso GenBank de sequências de DNA de Botryosphaeriaceae utilizados na análise filogenética.

Espécies	Código da cultura	Nº de acesso no GenBank		
		ITS	EF1- α	β -tub
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CBS164 96	AY640255.1	AY640258.1	EU673110.1
<i>L. theobromae</i>	CMM3831	KF234556	KF226717	KF254940
<i>L. pseudotheobromae</i>	CMM3887	KF234559	KF226722	KF254943
<i>L. pseudotheobromae</i>	CBS 116459	KF766193	*	EU673111
<i>L. mahajangana</i>	CMW 27801	*	FJ900641	FJ900630
<i>L. subglobosa</i>	CMM 4046	KF234560	KF226723	KF254944
<i>L. macrospora</i>	CMM 3833	KF234557	KF226718	KF254941
<i>L. viticola</i>	UCD2553AR	HQ288227	HQ288269	HQ288306
<i>L. iraniensis</i>	IRAN1519C	GU945350	GU945338	*
<i>L. iraniensis</i>	IRAN1517C	GU945349	GU945337	*
<i>L. jatrophiicola</i>	CMM3610	KF234544	KF226690	KF254927
<i>L. jatrophiicola</i>	CMM 0409	KJ450868	KJ417868	*
<i>L. jatrophiicola</i>	CMM 0290	KJ450871	KJ417871	*
<i>Macrophomina phaseolina</i>	CPC 21512	KF951773	KF952137	KF952219
<i>M. phaseolina</i>	CPC 21516	KF951777	KF952139	KF952221
<i>M. pseudophaseolina</i>	CPC 21527	KF951801	KF952163	KF952242
<i>M. pseudophaseolina</i>	CPC 21528	KF951802	KF952164	KF952243
<i>Neofusicoccum batangarum</i>	CMW28315	FJ900606	FJ900652	FJ900633
<i>N. batangarum</i>	CMW28320	FJ900608	FJ900654	FJ900635
<i>N. batangarum</i>	CMW28363	FJ900607	FJ900653	FJ900634
<i>N. umdonicola</i>	CMW14079	EU821915	EU821885	EU821855
<i>N. umdonicola</i>	CMW14127	EU821926	EU821896	EU821866
<i>N. ribis</i>	CMW7773	AY236936	AY236878	AY236907
<i>N. ribis</i>	CMW7054	*	AY236879	AY236908
<i>N. cordaticola</i>	CMW14056	EU821903	EU821873	EU821843
<i>N. cordaticola</i>	CMW13992	EU821898	EU821868	EU821838
<i>N. occulatum</i>	CBS128008	EU301030	EU339509	EU339472
<i>N. occulatum</i>	CMW9070	AY615164	AY615156	AY615148
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	CBS 251 49	KF531819	KF531797	FM211166
<i>N. dimidiatum</i>	CBS 499 66	KF531820	KF531798	FM211167
<i>N. hyalinum</i>	CMM3566	KF234551	KF226709	KF254935
<i>N. hyalinum</i>	CMM3649	KF234550	KF226707	KF254934
<i>N. novaehollandiae</i>	CBS122072	EF585535	EF585581	*
<i>N. novaehollandiae</i>	CBS122610	EF585536	EF585578	*
<i>Melanops tulasnei</i>	CBS116805	FJ824769	FJ824774	FJ824780

4.2.3 Caracterização morfológica

O tamanho e forma dos esporos e de outras estruturas provenientes dos isolado foram visualizados com auxílio de microscópio óptico. A produção de esporos e de outras estruturas foram obtidas em meio BDA mantidos na temperatura de 25 ± 1 °C por 10 dias e fotoperíodo de 12 horas sob luz negra. As fotos foram capturas por câmera digital (Olympus IX2-SLP) acoplada ao microscópio óptico com aumento de 400x através do software Cellsenses Standard (SAMSUNG SDC-415®) e posteriormente, utilizadas para determinação do comprimento e largura de conídios.

4.2.4 Patogenicidade

A patogenicidade de cada isolado foi testada em cladódios sadios destacados da palma forrageira Miúda. Ferimentos foram realizados na superfície dos cladódios com o auxílio de uma agulha previamente esterilizada, em seguida depositou-se discos de BDA contendo estruturas do patógeno. Na testemunha foi utilizada apenas discos de BDA. Posteriormente, cada cladódio foi acondicionado separadamente em sacos plásticos contendo um chumaço de algodão umedecido com ADE, e mantidos em incubadora tipo BOD a 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 horas por até 10 dias.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Obtenção dos Isolados

Foram obtidos 11 isolados, sete nos municípios de Alagoas, C6, C42, DG1.2, EA11, EA26.1, SI19 e SI26, e quatro nos municípios de Pernambuco, BC14, BC17, BC25 e L3. As culturas foram depositadas na Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos da Universidade Federal de Alagoas.

4.3.2 Caracterização molecular

Uma árvore de inferência bayesiana foi criada utilizando as sequencias concatenadas da região ITS, e dos genes EF1- α e β -tub. Os modelos evolutivos foram selecionados de acordo com o Critério de Informação de Akaike (AIC): GTR+I para ITS, GTR+G para EF1- α e HKY+G para β -tub. A análise filogenética foi realizada no webportal CIPRES. A árvore foi enraizada com *Melanops tulasnei* CBS116805.

As análises filogenéticas e morfológicas, revelaram quatro gêneros distintos de Botryosphaeriaceae causando manchas nos cladódios de palma Miúda: *Lasiodiplodia*,

Neoscytalidium, *Neofusicoccum* e *Macrophomina*. A árvore filogenética (Figura 9) foi constituída por 46 táxons, divididos em cinco ramos que separam os representantes dos gêneros *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium*, *Macrophomina*, *Lasiodiplodia* e *Melanops tulasnei* (outgroup). Os isolados identificados neste estudo agruparam com as espécies: *N. batangarum*, *N. hyalinum*, *L. theobromae* e *L. jatrophiicola*, exceto os isolados pertencentes ao gênero *Macrophomina* que se posicionaram em um clado separado das espécies já descritas, considerando tratar-se de uma nova espécie intitulada de *Macrophomina alagoensis* sp. nov. Verificou-se também valores de suporte para a maioria dos clados formados, principalmente, para os clados que separam as espécies de *Macrophomina*.

No caso de *Macrophomina* foram construídas três árvores de inferência Bayesiana adicionais, para cada gene ou região genômica isoladamente, com a finalidade de se comprovar a natureza filogenética distinta entre a nova espécie identificada nesse estudo e as espécies de *Macrophomina* já descritas – *M. phaseolina* e *M. pseudophaseolina* (Figura 10).

A filogenia realizada para cada gene isoladamente revelou que os três isolados de *Macrophomina* obtidos nesse estudo se posicionaram em um clado separado em relação às espécies já relatadas, mesmo quando se tratou da região ITS (Figura 10A), tida como muito conservada e que não foi capaz de separar as espécies *M. phaseolina* e *M. pseudophaseolina*. Já para os genes EF-1 α e β -tub (Figuras 10B e 10C), as árvores filogenéticas ficaram bem definidas, com valores de probabilidade de 100% e com as espécies *M. phaseolina* e *M. pseudophaseolina* em ramos distintos. Corroborando a hipótese que se trata de uma nova espécie.

Morfologicamente, as espécies do gênero *Macrophomina* são indistinguíveis, pois as características taxonômicas são bastante semelhantes, sendo necessário o uso de filogenia para a separação das mesmas.

Figura 9 - Árvore filogenética inferida a partir da análise Bayesiana com base nas sequências combinadas da região ITS, e dos genes EF-1 α e β -tub. A árvore foi enraizada com *Melanops tulasnei* (out-group). Isolados caracterizados neste estudo são destacadas em negrito.

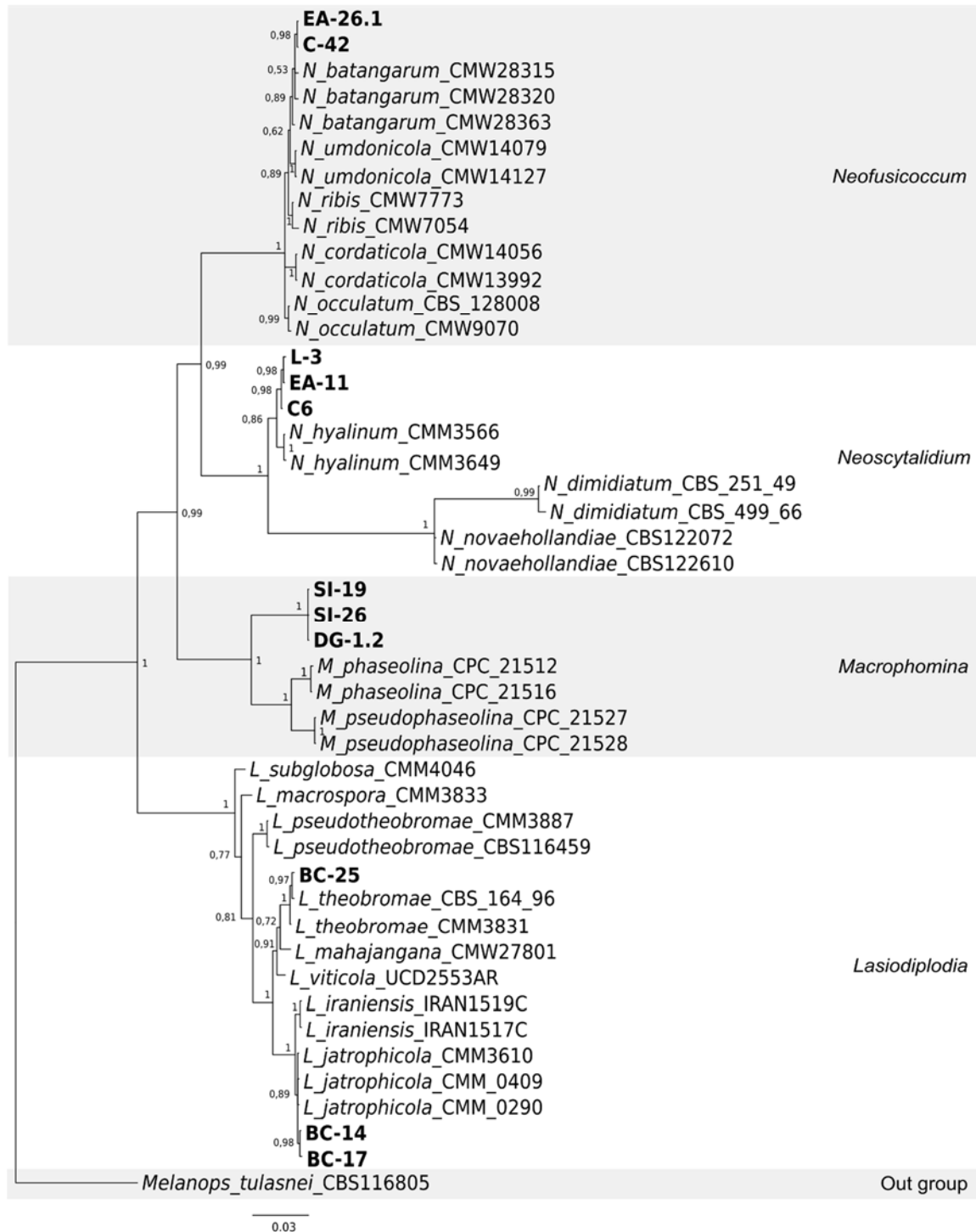
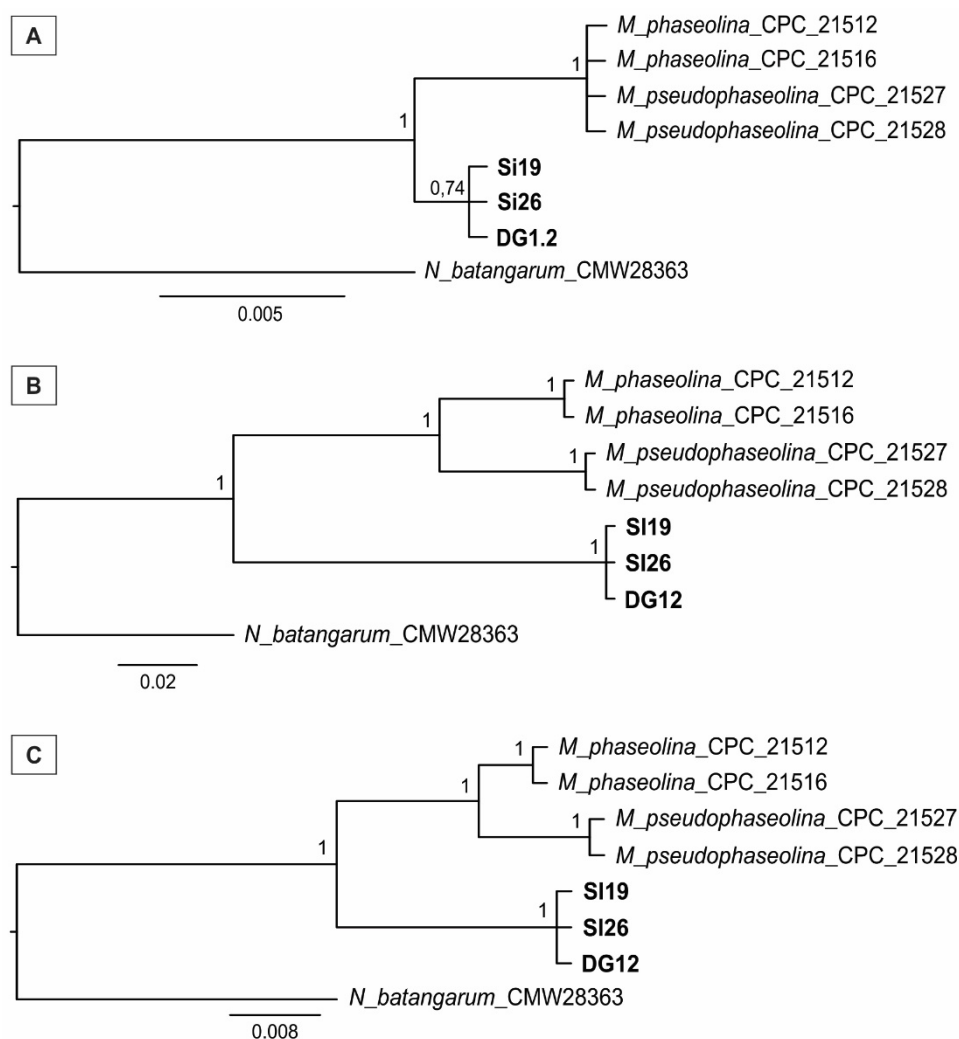


Figura 10 - Árvores filogenéticas de Inferência Bayesiana com isolados de *Macrophomina* spp. considerando a região ITS (A), e os genes EF-1 α (B) e β -tub (C). As árvores foram enraizadas com *Neofusicoccum batangarum* como outgroup.



4.3.3 Taxonomia

Macrophomina alagoensis F.M. Feijó & G.S.A. Lima, sp. nov. N° MycoBank:

Etimologia: O nome é referente a Alagoas, Estado onde o fungo foi encontrado pela primeira vez.

Foram obtidas colônias crescidas em meio de cultura BDA expostas a luz negra, onde foram produzidos conídios hialinos, granular, elipsoide a obovoide, mais largo no terço superior, apresentando apêndices mucoides no ápice dos conídios, com dimensões variando de 13-15 x 6-9 μ m.

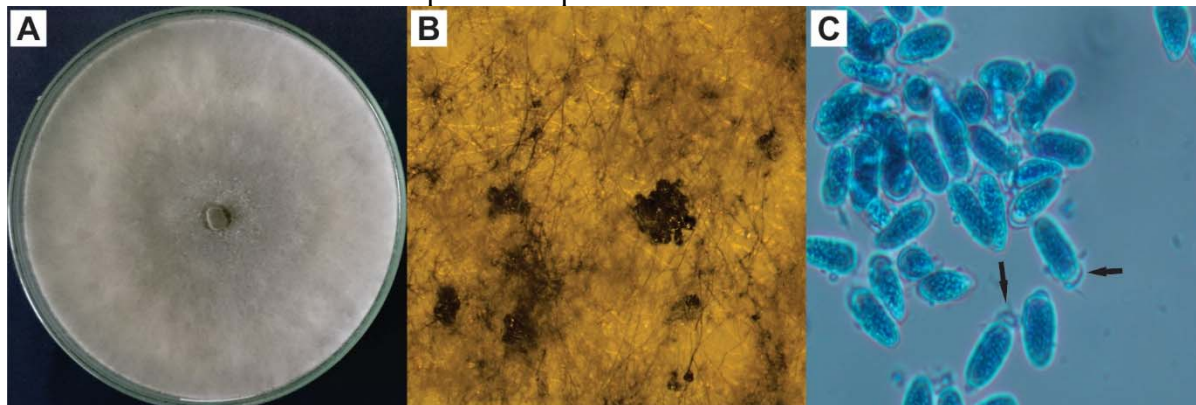
Características culturais: Colônias com micélio aéreo abundante, coloração cinza esverdeado no verso e cinza escuro no reverso das placas em meio BDA, com densa massa de escleródios pretos. Colônias apresentando taxa de crescimento micelial de 11,23 mm.dia à 25°C.

Habitat: Em *Nopalea cochenillifera*.

Distribuição conhecida: Estado de Alagoas, Brasil. Tipo: Brasil, Alagoas, Delmiro Gouveia e Santana do Ipanema, em *Nopalea cochenillifera*, 2015.

Notas: *Macrophomina alagoensis* difere da espécie mais próxima, *M. phaseolina*, por alelos fixos únicos em três locus do DNA genômico, com base em alinhamentos dos locus separados depositados em TreeBASE: ITS posições 77 (C), 95 (C), 96 (C), 97 (G), 100 (T), 103 (C), 104 (G), 108 (A), 133 (C), 151 (G), 155 (A), 169 (G), 175 (G), 181 (T), 383 (T), 385 (GAP), 386 (GAP), 463 (C), 465 (G), 496 (T), 497 (T), 498 (T), 499 (T); EF-1 α posições 11 (G), 13 (G), 15 (A), 16 (T), 19 (C), 21 (T), 23 (A), 24 (G), 33 (A), 36 (T), 38 (T), 41 (G), 44 (G), 45 (T), 50 (G), 57 (C), 58 (A), 60 (A), 63 (T), 64 (T), 66 (G), 69 (A), 71 (C), 76 (G), 90 (C), 91 (G), 102 (C), 104 (C), 106 (T), 123 (G), 126 (A), 137 (A), 146 (A), 147 (C), 159 (GAP), 160 (GAP), 161 (GAP), 163 (G), 186 (A), 187 (T), 192 (C), 198 (C), 201 (C), 202 (C), 203 (C), 211 (C), 220 (C), 221 (A), 227 (A), 230 (C), 231 (G), 239 (C), 242 (A), 245 (C), 248 (G), 250 (C); β -tub posições 18 (T), 36 (C), 45 (C), 98 (C), 136 (T), 139 (C), 147 (G), 150 (G), 231 (T), 234 (A), 249 (A), 252 (T), 253 (C), 376 (G), 403 (G), 409 (T), 439 (C).

Figura 11- *Macrophomina alagoensis*. A - Coloração da colônia, B - Escleródios em meio BDA e C - Conídios com apêndices apicais.



Fonte: Autor, 2016.

4.3.4 Patogenicidade dos isolados

Todos os isolados foram patogênicos aos cladódios de palma Miúda, causando sintomas em torno do sétimo dia após as inoculações, consistindo de lesões circulares e necróticas que posteriormente foram observadas na outra face do cladódio. Não foram observados sintomas nas testemunhas. Os sintomas observados nesse estudo se assemelham aos observados no campo e descritos por outros autores em estudos de etiologia fúngica em cladódios de palma forrageira (LIMA et al., 2011, FLORES-FLORES et al., 2013).

4.4 DISCUSSÃO

Neste estudo, foram identificadas cinco espécies de fungos pertencentes à família Botryosphaeriaceae associadas às duas principais doenças dos cladódios da palma-forrageira que ocorrem no Brasil, a mancha-marrom e a mancha-escamosa. Quatro espécies foram associadas à mancha-marrom: *L. theobromae*, *L. jatrophiicola*, *M. alagoensis* e *N. batangarum*, enquanto uma espécie foi relacionada à mancha-escamosa: *N. hyalinum*. Com as exceções de *L. theobromae* e *N. batangarum*, as demais espécies descritas constituem o primeiro relato em palma Miúda (*Nopalea cochenilefera*) no mundo. Além disso, é a primeira ocorrência da mancha-escamosa na palma-Miúda, apesar de ser frequentemente associada à palma-Gigante (*O. ficus-indica*).

O gênero *Lasiodiplodia* apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo naturalmente em regiões tropicais e subtropicais, causando diversas doenças em grande variedade de hospedeiros vegetais, além de ser o gênero mais relatado entre os membros da família Botryosphaeriaceae (PUNITHALINGAM, 1976, 1980; PHILLIPS et al., 2013). As principais características morfológicas que distinguem este gênero dos outros gêneros nessa família, são a presença de paráfises e estrias longitudinais em conídios maduros (SUTTON, 1980; PHILLIPS et al., 2008).

No Brasil, a espécie *L. theobromae* é a mais comumente relatada como agente causal de doenças em diversas culturas de importância econômica como, abacate (*Persea americana* Mill.), banana (*Musa* spp.), acerola (*Malpighia glabra* L.), cajú (*Anacardium* spp. L.), citrus (*Citrus* spp.), coqueiro (*Cocos nucifera* L.), pinha (*Annona squamosa* L.), videira (*Vitis* sp.), goiaba (*Psidium guajava* L.), manga (*Mangifera indica* L.), melão (*Cucumis Melo* L.), maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims), graviola (*Annona muricata* L.) mamão (*Carica papaya* L.) e melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb.) (TAVARES, 2002; FREIRE et al., 2002, NETTO et al., 2014; NETTO et al., 2016).

Nos últimos anos com os avanços em estudos de caracterização filogenética como base para resolver espécies crípticas do gênero *Lasiodiplodia*, tem-se identificado várias espécies associadas a doenças que eram habitualmente atribuídas a *L. theobromae*, no mundo. No Brasil, só nos últimos anos, 15 espécies foram relatadas pertencentes a esse gênero, sendo oito dessas espécies, descritas pela primeira vez, *L. brasiliense* (NETTO et al., 2014), *L. marypalme* (= *L. euphorbicola*), *L. jatrophicola*, *L. subglobosa*, *L. macrospora* (MACHADO et al., 2014a) e *L. gravistriatas* (NETTO et al., 2016).

Em palma forrageira, a espécie *L. theobromae* já havia sido relatada, porém associada a outra doença conhecida como podridão negra, que é caracterizada por uma podridão com abundante exsudação de goma na área da lesão, ocorrendo geralmente a partir do local de inserção dos cladódios (SANTOS et al., 2006; SOUZA et al., 2010). Essa espécie também foi relatada no México, associada à mancha negra, considerada a principal doença da palma Gigante nesse país (FLORES-FLORES et al., 2013).

Já a espécie *L. jatrophicola*, foi descrita no Brasil causando doença na cultura do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), e mais recentemente foram feitos registros dessa espécie associada à gomose na cultura do cajueiro (*Anacardium* spp.) (MACHADO et al., 2014a; NETTO et al., 2016).

A espécie *M. alagoensis* descrita nesse trabalho como uma nova espécie do gênero *Macrophomina*, principalmente por apresentar características filogenéticas distintas da espécie mais próxima, *M. phaseolina*. A distância genética entre essas espécies pode ser constatada pela quantidade de nucleotídeos que diferem para cada um dos genes analisados, sendo 23 nucleotídeos da região ITS, 56 nucleotídeos do gene EF1- α e 17 nucleotídeos no gene β -tub. De acordo com, Hyde et al., 2014, entre os genes utilizados para a filogenia do gênero *Macrophomina*, o Fator de elongação (EF1- α), é considerado consistentemente mais variável que os outros genes, podendo isso explicar o maior número de nucleotídeos verificados para esse gene, contudo, o uso dessas três regiões genômicas em uma análise multilocus é fundamentalmente importante.

O gênero *Macrophomina*, é considerado de grande importância, principalmente em países tropicais e subtropicais (WRATHER et al., 2001), causando podridões de plântulas, raízes e haste, além de murchas (RAUT, 1983), em diversas culturas economicamente importantes como, algodão, amendoim, feijão, milho, soja e sorgo (DHINGRA; SINCLAIR, 1977).

O gênero *Macrophomina* tem como espécie tipo *M. phaseolina* (CROUS et al., 2006; SLIPPERS et al., 2013). De acordo como o MycoBank (acessado em dezembro de

2016), cinco espécies de *Macrophomina* foram relatadas anteriormente, porém, estudos filogenéticos recentes mostram a existência de apenas duas espécies a *M. phaseolina* e a *M. pseudophaseolina* (GROENEWALD et al., 2014; CLAUDINO et al., 2014).

A espécie *M. pseudophaseolina*, foi identificada recentemente no Senegal, através da caracterização morfológica e filogenética de isolados obtidos de plantas de *Arachis hypogaea* L., *Hibiscus sabdariffa* L. e *Vigna unguiculata* L. Essa espécie, até então, tem sua distribuição geográfica restrita ao Senegal (GROENEWALD et al., 2014). Porém, alguns autores acreditarem que sua distribuição seja mais abrangente (CLAUDINO et al., 2014). A nomenclatura *M. pseudophaseolina* foi dada pelas semelhanças morfológicas entre as duas espécies, com exceção dos conídios mais curtos observados em relação a *M. phaseolina*, mas taxonomicamente, essa particularidade não diferencia as espécies (GROENEWALD et al., 2014). Apesar das características morfológicas terem sido escassas para a espécie *M. alagoensis*, os conídios apresentaram morfologia semelhante aos das espécies *M. phaseolina* e da *M. pseudophaseolina*, no entanto com dimensões um pouco menores.

Na palma forrageira, a espécie *M. phaseolina* está associada a podridão de *Macrophomina*, doença que ocorre frequentemente no México, podendo causar perdas de até 50% das plantas nas áreas infectadas. Essa doença causa inicialmente manchas cloróticas na parte externa e verde escuras na parte interna dos cladódios, que ao evoluírem tornam-se pretas (GRANATA, 2001).

A espécie *N. batangarum* foi recentemente relatada como agente causal da mancha-marrom na palma forrageira Miúda no Estado de Pernambuco (CONFORTO et al. 2016). No entanto, essa é a primeira ocorrência dessa espécie causando doença em palma Miúda no Estado de Alagoas. Estudos recentes em Camarões, relatam *N. batangarum* como fungo endofítico em *Terminalia catappa*, árvore conhecida popularmente no Brasil como chapéu-desol, amendoeira, entre outros (BEGOUDE et al., 2010). Ainda de acordo com Begoude et al. (2010), este fungo pode mudar de um estilo de vida endofítico para um patógeno agressivo, dependendo das condições ambientais. Além dessas culturas, *N. batangarum* também foi identificado como agente etiológico da gomose do cajueiro no Brasil (NETTO et al., 2016).

No Brasil, outras espécies do gênero *Neofusicoccum* já foram relatadas causando cancro, morte decente e podridão peduncular em hospedeiros como, abacateiro (FIRMINO et al., 2016), videira (CORRERIA et al., 2016), goiabeira (JUNIOR;

NOGUEIRA et al., 2016), mangueira (MARQUES et al., 2013) e em grande diversidade de espécies arbóreas da caatinga (GONÇALVES et al., 2016).

Esse é o primeiro relato da espécie *N. hyalinum* em palma Miúda, porém, esse patógeno já foi relatado causando doenças em outras culturas economicamente importantes como, pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), mangueira (*Mangifera indica* L.) e videira (*Vitis vinífera* L.) (AL-SAADOON et al., 2012; MACHADO et al., 2012a; MARQUES et al., 2013; ROLSHAUSEN et al., 2013; MACHADO et al., 2014b; CORREIA et al., 2016). Esse estudo também relata pela primeira vez a ocorrência da mancha-escamosa em palma Miúda (*N. cochenillifera*), doença relatada comumente em palma Gigante (*O. fícus-indica*) (SANTOS et al., 2006; SOUZA et al., 2010).

Em palma Gigante, o agente causal da mancha-escamosa foi relatado apenas por características morfológicas, estando atualmente associada a espécie *Scytalidium lignicola*, contudo, a etiologia dessa doença precisa ser revista com base na caracterização filogenética, uma vez que, espécies pertencentes ao gênero *Scytalidium* foram reclassificadas no gênero *Neoscytalidium* (SEIFERT et al., 2011).

Chuang et al. (2012), relataram a primeira ocorrência de *N. dimidiatum* em Taiwan, através de caracterizações morfológicas e moleculares em plantas de pitaya (*Hylocereus undatus* e *H. polyrhizus* Britt. & Rose), cultivadas em diversas regiões do mundo, pelo alto valor comercial de seus frutos, sendo este o primeiro relato de uma espécie pertencente ao gênero *Neoscytalidium* causando doença em uma cactácea no mundo.

Espécies do gênero *Neoscytalidium*, ocorrem em países tropicais e em zonas temperadas, sendo associados a diversos hospedeiros (PHILLIPS et al., 2013). De acordo com Hyde et al. (2014), este gênero possui no mundo apenas três espécies, *N. hyalinum*, *N. dimidiatum* e *N. novaehollandiae*, e dentre estas, apenas a primeira é tem sido relatada no Brasil.

É de conhecimento de muitos pesquisadores que a caracterização dos gêneros pertencentes a família Botryosphaeriaceae por morfologia é bastante confusa, podendo levar a erros na distinção das espécies, por serem estritamente relacionadas, sendo necessário o uso de métodos moleculares, baseando-se na análise combinada dos genes/regiões: ITS, EF1- α e β -tub, uma vez que, nenhuma região genômica separadamente é suficiente para distinguir todas as espécies do gênero (MACHADO et al., 2012a; MARQUES et al., 2013; ROLSHAUSEN et al., 2013; HYDE et al., 2014;

MACHADO et al., 2014b; CORREIA et. al., 2016; NETTO et al., 2016). Segundo Taylor (2000), o uso de apenas um gene pode subestimar a identificação de espécies estritamente relacionadas dentro das inúmeras espécies dessa família. De acordo com Liu et al. (2011), a aplicação de ferramentas moleculares facilitou o reconhecimento de espécies de Botryosphaeriaceae, com numerosas espécies recentemente descritas na vegetação nativa e culturas economicamente importantes.

Baseando-se nas descobertas de novas espécies nos mais variados hospedeiros, como foi exposto anteriormente, é provável que outras espécies e/ou gêneros pertencentes à família Botryosphaeriaceae estejam associadas às manchas dos cladódios da cultura da palma forrageira, não só no Brasil, mas também em outras localidades do mundo.

4.5 CONCLUSÕES

- Pelo menos cinco espécies pertencentes à família Botryosphaeriaceae podem causar manchas em cladódios da palma forrageira (*N. cochenillifera*), *L. theobromae*, *L. jatrophiicola*, *M. alagoensis*, *N. batangarum*, *N. hyalinum*.
- As espécies *L. theobromae*, *L. jatrophiicola*, *M. alagoensis* sp. nov., *N. batangarum*, são associadas a mancha-marrom.
- A espécie *N. hyalinum* é o agente causal da mancha-escamosa.

REFERÊNCIAS

- AL-SAADON, ABDULLAH H. et al. First report of grapevine dieback caused by *Lasioidiplodia theobromae* and *Neoscytalidium dimidiatum* in Basrah, Southern Iraq. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 95, p. 16165-16171, 2012.
- BARBOSA, R.S. et al. Doenças da palma. In: Lopes, E.B. (Ed.). Palma forrageira: cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semiárido nordestino. João Pessoa: EMEPA/FAEPA, 2012. p. 46-55.
- BEGOUDE, B.A.D., SLIPPERS, B., WINGFIELD, M.J., ROUX, J. Botryosphaeriaceae associated with *Terminalia catappa* in Cameroon, South Africa and Madagascar. **Mycological Progress**, v.9, p.101–23, 2010.
- BURGESS TI, BARBER PA, MOHALI S, PEGG G, DE BEER W, WINGFIELD MJ, 2006. Three new *Lasioidiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. **Mycologia** 98: 423 a 435.
- CARBONE I, ANDERSON JB, KOHN LM, 1999. A method for designing primer sets for the speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia** 91, 553–6.
- CARBONE I, KOHN L.M. (1999) A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia** 91:553–556.
- CHUANG, M. F. et al. First report of stem canker disease of Pitaya (*Hylocereus undatus* and *H. polyrhizus*) Caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in Taiwan. **Plant Disease**, v. 96, n. 6, p. 906-906, 2012.
- CLAUDINO, MONALIZA R.; SOARES, DARTANHA J. Pathogenicity and aggressiveness of *Macrophomina phaseolina* isolates to castor (*Ricinus communis*). **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 6, p. 453-456, 2014.
- CONFORTO C.; LIMA N. B.; GARCETE-GÓMEZ J. M.; CÂMARA M. P. S.; MICHEREFF S. J. First Report of Cladode Brown Spot in Cactus Prickly Pear Caused by *Neofusicoccum batangarum* in Brazil. **Plant Disease**, v. 100, p.1238, 2016.
- CORREIA, K.C., SILVA, M.A., MORAIS JR, M.A., ARMENGOLD, J., PHILLIPS, A.J.L., CÂMARA, M.P.S., MICHEREFFB, S.J. Phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasioidiplodia* species associated with dieback of table grape in the main Brazilian exporting region. **Plant Pathology** 65, 92–103, 2016.
- CROUS, P.W., SLIPPERS, B., WINGFIELD, M.J., RHEEDER, J., MARASAS, W.F.O., PHILLIPS, A.J.L., ALVES, A., BURGESS, T.I., BARBER, P.A., GROENEWALD, J.Z. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Studies in Mycology**, v. 55, p. 235-253, 2006.
- Dhingra O.D. and J.B. Sinclair, 1977. An Annotated Bibliography of *Macrophomina phaseoli* (1905–1975). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Viçosa, Brazil.
- DOYLE J.J., DOYLE JL (1987). A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. **Phytochemistry Bulletin** 19:11-15.

- DUBEUX, JR. J.C.B.; ARAÚJO FILHO, J.T.; SANTOS, M.V. F. et al. Adubação mineral no crescimento e composição mineral da palma forrageira clone IPA- 20. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 5, n. 1, p. 129-135. 2010.
- EDGAR R.C. (2004). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **BMC Bioinformatics** 5:1–19.
- FEIJÓ F. M.; RAMOS-SOBRINHO R.; SILVA M. J. S.; Barbosa L. F.; PINHO D. B.; ASSUNÇÃO I. P.; LIMA G. S. A., First Report of Cladode and Foot Rots Caused by *Pythium aphanidermatum* on Cactus (*Nopalea cochenillifera*). **Plant Disease**, v. 100, p.1797, 2016.
- FIRMINO, A.C., FISCHER, I.H., TOZZE JÚNIOR, H.J., ROSA, D.D., FURTADO, E.L. Identification of *Fusicoccum* species causing rot in avocado fruits. **Summa Phytopathologica**, v.42, n.1, p.100-102, 2016.
- FLORES - FLORES, R. et al. Identification of Fungal Species Associated with Cladode Spot of Prickly Pear and Their Sensitivity to Chitosan. **Journal of Phytopathology**, v. 161, p. 544–552, 2013.
- FREIRE F.C.O., CARDOSO J.E., SANTOS A.A., VIANA F.M.P., 2002. Diseases of Cashew (*Anacardium occidentale* L.) in Brazil. **Crop Protection** 21: 489e494.
- GLASS, N.L., DONALDSON, G.C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.1323–30, 1995.
- GONÇALVES, F.J.T., FREIRE, F.C.O., LIMA, J.S., MELO, J.G.M., CÂMARA, M.P.S. Patogenicidade de espécies de Botryosphaeriaceae endofíticas de plantas da Caatinga do estado do Ceará em manga e umbu-cajá. **Summa Phytopathol.**, v. 42, n. 1, p. 43-52, 2016.
- GRANATA G. Doenças bióticas e abióticas. In: BARBERA et al. **Agroecologia, cultivo e usos da palma forrageira**. FAO / SEBRAE – PB, p. 112 – 122, 2001.
- GROENEWALD, Johannes Z. et al. Genetic diversity in *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 53, n. 2, p. 250-268, 2014.
- HYDE, KEVIN D. et al. One stop shop: backbone trees for important phytopathogenic genera: I (2014). **Fungal Diversity**, v. 67, n. 1, p. 21-125, 2014.
- JÚNIOR, ANTONIO F. NOGUEIRA et al. Identification of Botryosphaeriaceae species that cause stylar-end rot of guavas and characterisation of the disease monocycle. **European Journal of Plant Pathology**, v. 144, n. 2, p. 271-287, 2016.
- LIMA, G. S. A. et al. Development and validation of a standard area diagram set for assesment of *Altenaria* Spot on cladodes of the prickly pear cactus. **Journal of Plant Pathology**, v. 93, p. 691- 695, 2011.
- LIU JK, PHOOKAMSAK R, DOILOM M, WIKKE S, LI YM, ARIYAWANSHA H, BOONMEE S, CHOMNUNTI P, DAI DQ, BHAT JD, ROMERO AI, ZHUANG WY, MONKAI J, JONES EBG, CHUKEATIROTE E, KOKO TW, ZHAO YC, WANG Y,

- HYDE KD, 2012. Towards a natural classification of Botryosphaeriales. **Fungal Diversity** 57: 149e210.
- MACHADO A.R., PINHO D.B., OLIVEIRA S.A.S., PEREIRA O.L., 2014b. New occurrences of Botryosphaeriaceae causing black root rot of cassava in Brasil. **Tropical Plant Pathology** 39, 464–70.
- MACHADO A.R., PINHO D.B., PEREIRA O.L., 2014a. Phylogeny, identification and pathogenicity of the Botryosphaeriaceae associated with collar and root rot of the biofuel plant *Jatropha curcas* in Brasil, with a description of new species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Diversity** 67, 231–47.
- MARQUES, M.W., LIMA, N.B., MORAIS JR, M.A., MICHEREFF, S.J., PHILLIPS, A.J.L., CÂMARA, M.P.S. *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* and *Pseudofusicoccum* species associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, v. 61, p.195- 208, 2013.
- MENEZES, R. S. C.; SIMÕES, D. A.; SAMPAIO, E. V. S. B. A palma no Nordeste do Brasil – Conhecimento atual e novas perspectivas de uso. Recife: Ed. Universitária da UFRPE, 2005, v. único, p. 44. 2005.
- NETTO, M.S.B., ASSUNÇÃO, I.P., LIMA, G.S.A. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brasil. **Fungal Diversity**, v.67, p.127–41, 2014.
- NETTO, MARIOTE S.B. et al. Analysis of phylogeny, distribution, and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with gummosis of *Anacardium* in Brazil, with a new species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Biology**, 2016.
- PHILLIPS A.J.L., ALVES A, PENNYCOOK S.R., JOHNSTON P.R., RAMALEY A, AKULOV A, CROUS P.W. (2008) Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the Botryosphaeriaceae. **Persoonia** 21:29–55.
- PHILLIPS, A.J.L., ALVES, A., ABDOLLAHZADEH, J., SLIPPERS, B., WINGFIELD, M.J., GROENEWALD, J.Z., CROUS, P.W. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. **Studies in Mycology**, v.76, p.51–167, 2013.
- PUNITHALINGAM E, 1976. *Botryodiplodia theobromae*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, No. 519. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
- PUNITHALINGAM E, 1980. Attributed to *Botryodiplodia theobromae* Pat. Cramer, Vaduz. **Plant Diseases**.
- RAUT J.G., 1983. Transmission of seed borne *Macrophomina phaseolina*.
- SANTOS, D. C. et al. **Manejo e utilização da palma forrageira (Opuntia e Nopalea) em Pernambuco**. Recife: IPA, 2006. 48p. (IPA, Documento 30).
- SEIFERT KEITH, et al. Os gêneros de Hyphomycetes. Utrecht: CBS-KNAW fúngica Centro de Biodiversidade, 2011.
- SLIPPERS B, BOISSIN E, PHILLIPS A.J.L. et al., 2013. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriales: a systematic and evolutionary framework. **Studies in Mycology** 76, 31-49.

- SLIPPERS B, CROUS PW, DENMAN S, COUTINHO TA, WINGFIELD BD, WINGFIELD MJ, 2004. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. **Mycologia** 96: 83 e 101.
- SOUZA, A. E. F. et al. Ocorrência e identificação dos agentes etiológicos de doenças em palma forrageira (*Opuntia fícus-indica* Mill.) no semiárido paraibano. **Revista Biotemas**, v. 23, n. 3, p. 11 – 20, 2010.
- SUTTON B.C. (1980) The coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervular and stromata. Commonw Mycol Inst, Kew.
- SWART, W. J.; SWART, V. R. An Overview of Research on Diseases of Cactus Pear in South Africa. **Journal of the Professional Association for Cactus Development**. v. 15, p. 115 – 120. 2003.
- TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, FILIPSKI A, KUMAR S (2013) **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0**. Molecular Biology and Evolution 30:2725-2729.
- TAVARES, S.C.C.H. Epidemiologia e manejo integrado de *Botryodiplodia theobromae* - situação atual no Brasil e no mundo. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p.46–52, 2002.
- TAYLOR, J. W. et al. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 31, n. 1, p. 21–32, 2000.
- WHITE T.J. BRUNS T, LEE S, TAYLOR J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York, NY, USA: Academic Press, 315–22.
- WRATHER J.A., T.R. ANDERSON, D.M. ARSYAD, Y. TAN, L.D. PLOPER, A. PORTA-PUGLIA, H.H. RAM and J.T. YORINORI, 2001. Soybean disease loss estimates for the top 10 soybean producing countries in 1998. **Canadian Journal of Plant Pathology** 23, 115–221.