



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE BIOCIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

**JULIANA FERREIRA DE MELLO**

**TAXONOMIA, FILOGENIA E PATOGENICIDADE DE ESPÉCIES DE  
BOTRYOSPHERIACEAE ASSOCIADAS COM A PODRIDÃO DE RAÍZES E  
RAMAS DE BATATA-DOCE (*Ipomoea batatas*) NO BRASIL**

Recife

2019

JULIANA FERREIRA DE MELLO

**TAXONOMIA, FILOGENIA E PATOGENICIDADE DE ESPÉCIES DE  
BOTRYOSPHAERIACEAE ASSOCIADAS COM A PODRIDÃO DE RAÍZES E  
RAMAS DE BATATA-DOCE (*Ipomoea batatas*) NO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

**Área de Concentração:** Micologia aplicada

**Orientador:** Dr. Alexandre Reis Machado

**Coorientador:** Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara

Recife

2019

Catálogo na fonte:  
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Mello, Juliana Ferreira de

Taxonomia, filogenia e patogenicidade de espécies de Botryosphaeriaceae associadas com a podridão de raízes e ramos de batata-doce (*Ipomoea batatas*) no Brasil / Juliana Ferreira de Mello - 2019.

63 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Alexandre Reis Machado

Coorientador: Marcos Paz Saraiva Câmara

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos. Recife, 2019.

Inclui referências.

1. Batata-doce 2. Fungos 3. Botryosphaeriaceae  
I. Machado, Alexandre Reis (orient.) II. Câmara, Marcos Paz Saraiva (coorient.) III. Título

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-308

JULIANA FERREIRA DE MELLO

**TAXONOMIA, FILOGENIA E PATOGENICIDADE DE ESPÉCIES DE  
BOTRYOSPHAERIACEAE ASSOCIADAS COM A PODRIDÃO DE RAÍZES E  
RAMAS DE BATATA-DOCE (*IPOMOEA BATATAS*) NO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 26/02/2019

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Alexandre Reis Machado (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof.<sup>a</sup> Neiva Tinti de Oliveira (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. André Angelo Medeiros Gomes (Examinador Externo)  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedico a Deus o autor e detentor de toda sabedoria. A meus pais Ana Rosa e Maviel Júnior,  
minha irmã Thaís Mello e meu noivo Fhylpe Anderson por todo apoio, carinho e  
compreensão em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, o autor e detentor de toda sabedoria por me capacitar e estar presente em minha vida em todos os momentos.

Aos meus pais Ana Rosa e Maviel Mello, por todo apoio, carinho, amor e compreensão demonstrados em cada passo da minha jornada científica e por sempre acreditarem em mim.

A minha irmã Thaís Mello, por sempre me encorajar a seguir em frente, por toda ajuda nos momentos que eu mais precisei, por ser a minha inspiração e por estar sempre comigo.

Ao meu esposo Fhylipe Anderson, pelo amor, cuidado, carinho, paciência, compreensão nas minhas ausências e por sua contribuição direta em cada detalhe desta dissertação.

Aos meus familiares e amigos por todo carinho e força.

A todos que fazem parte da minha igreja, minha segunda casa, por todas as orações e demonstrações de carinho.

Ao meu orientador Alexandre Reis Machado, por toda a paciência, cuidado e atenção que sempre demonstrou por mim ao longo desses dois anos, me mostrando que somos sim capazes de grandes coisas e por me ensinar grande parte de todo conhecimento que adquiri ao longo dessa jornada científica.

A minha dupla de todos os dias Amanda Brito, por toda força, parceria, ajuda e cuidado que sempre demonstrou por mim e que foi essencial para a finalização deste trabalho.

Aos meus amigos e amigas que fazem parte da família do Laboratório de Micologia Ambiental, pela força, atenção e companheirismos ao longo desses dois anos.

A todos que fazem parte do programa de Pós-graduação em biologia de fungos da Universidade Federal de Pernambuco e às agências de fomento CNPq, CAPES e Fapepe.

## RESUMO

A batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) é caracterizada pela produção de raízes tuberosas ricas em amido. No Brasil, é o quarto vegetal mais produzido e consumido. Diversos fatores podem limitar a produção de batata doce, dentre eles, doenças causadas por fungos podem ser destacadas, devido a sua alta incidência e perdas que causam. Entre os patógenos que causam a podridão da raiz da batata-doce, alguns Botryosphaeriaceae já foram relatados. No entanto, até o momento, nenhum estudo preciso foi realizado para a correta identificação das espécies nesta cultura no Brasil. Portanto, o objetivo deste trabalho foi a identificação de espécies de Botryosphaeriaceae associadas à podridão de ramos e raízes de batata-doce e a confirmação da patogenicidade. Ramos e raízes de batata doce com sintomas de podridão foram coletados em campos de produção. A identificação dos fungos baseou-se no estudo da morfologia das estruturas reprodutivas e na análise filogenética das regiões gênicas ITS e TEF1- $\alpha$ . As espécies identificadas foram: *Lasiodiplodia theobromae*, *L. hormozganensis*, *Macrophomina phaseolina*, *M. pseudophaseolina* e *Neoscytalidium dimidiatum*. Para o teste de patogenicidade, um isolado representativo de cada espécie foi utilizado. Após 10 dias, o experimento foi avaliado e lesões necróticas foram observadas em ramos e raízes resultando na morte de algumas repetições. Este é o primeiro relato de *L. hormozganensis*, *M. phaseolina*, *M. pseudophaseolina* e *M. euphorbiicola* como agentes causadores de podridão de ramos e raízes de batata-doce no Brasil. Este trabalho certamente contribuirá para futuros estudos de manejo de doenças em batata-doce.

**Palavras-chave:** Etiologia. Filogenia. *Lasiodiplodia*. *Macrophomin.*, *Neoscytalidium*.  
Taxonomia.

## ABSTRACT

The sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) is characterized by production of tuberous roots rich in starch. In Brazil it is the fourth vegetable most produced and consumed. Several factors can limit the sweet potato production, among them, diseases caused by fungi can be highlighted, due to its high incidence and losses that cause. Among the pathogens that cause stem rot of sweet potato, some Botryosphaeriaceae already were reported. However, until now, no accurate study was performed for the correct identification of species in this crop in Brazil. Therefore, the aim of this work was the identification of Botryosphaeriaceae species associated with stems rot of sweet potato and confirmation of the pathogenicity. Stems of sweet potato with symptoms of rot were collected in fields of production. The identification of fungi was based on the study of the morphology of reproductive structures and phylogenetic analysis of the gene regions ITS and TEF1- $\alpha$ . The species identified were: *Lasiodiplodia theobromae*, *L. hormozganensis*, *Macrophomina phaseolina*, *M. pseudophaseolina* and *Neoscytalidium dimidiatum*. For the pathogenicity test, one representative isolate of the each species were used. After 10 days, the experiment was evaluated and necrotic lesions were observed in the stems resulting in the death of some replicates. This is the first report of *L. hormozganensis*, *Macrophomina phaseolina*, *M. pseudophaseolina* and *M. euphorbiicola* causing root and stems rot of sweet potato in Brazil. This work certainly will contribute for future studies of disease management in sweet potato.

**Key-words:** Etiology. *Lasiodiplodia*. *Macrophomina*. *Neoscytalidium*. Phylogeny. Taxonomy.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Sintomas de podridão de raízes de batata-doce.....	37
Figura 2-	Sintomas de podridão de ramas de batata-doce observados em áreas decultivo.....	38
Figura 3-	Árvore filogenética inferida a partir de análise bayesiana Baseada em as sequências combinadas do ITS e do TEF-1 $\alpha$ para o gênero <i>Lasiodiplodia</i> .....	40
Figura 4-	Árvore filogenética inferida a partir de análise bayesiana Baseada Em sequências combinadas do ITS e do TEF-1 $\alpha$ para os gêneros: <i>Macrophomina</i> e <i>Neoscytalidium</i> .....	41
Figura 5-	Aspectos morfológicos de <i>Lasiodiplodia</i> e <i>Neoscytalidium</i> .....	47
Figura 6-	Resultado do teste de patogenicidade em raízes.....	50
Figura 7-	Resultado do teste de patogenicidade em mudas de batata-doce.....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Sequências dos isolados de <i>Lasiodiplodia Macrophomina</i> e <i>Neoscytalidium</i> utilizados para a realização das análises filogenéticas.....	32
Tabela 2-	Comparação das características morfológicas das espécies de <i>Lasiodiplodia</i> e <i>Neoscytalidium</i> examinadas neste estudo com Estudos anteriores.....	46

## LISTA DE SIGLAS

BDA	Batata Dextrose Ágar
TEF	Fator de alongação da tradução
ITS	Espaço interno transcrito
FAO	FAOSTAT

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	15
2.1	A CULTURA DA BATATA-DOCE.....	15
2.2	PRODUTIVIDADE DA BATATA-DOCE.....	17
2.3	DOENÇAS DA BATATA-DOCE.....	18
2.4	PODRIDÕES RADICULARES E DAS RAMAS CAUSADAS POR FUNGOS.....	20
2.4.1	Mal-do-pé ( <i>Plenodomus destruens</i> ).....	21
2.4.2	Doença da morte descendente podridão de <i>Lasiodiplodia</i> .....	21
2.4.3	Podridão mole ( <i>Rhizopus sp.</i> ).....	22
2.4.4	Podridão negra da batata-doce ( <i>Ceratocystis fimbriata</i> ).....	23
2.4.5	Sarna da batata-doce ( <i>Monilochaeres infuscans</i> ).....	23
2.4.6	Murcha de <i>Fusarium</i> .....	23
2.5	FAMÍLIA BOTRYOSPHAERIACEAE.....	24
2.5.1	Doenças causadas por espécies da família Botryosphaeriaceae.....	26
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
3.1	COLETA DE AMOSTRAS E ISOLAMENTO DOS FUNGOS .....	28
3.2	IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA.....	29
3.3	EXTRAÇÃO DE DNA, REAÇÃO DE PCR, SEQUENCIAMENTO E PURIFICAÇÃO.....	30
3.4	ANÁLISES FILOGENÉTICAS.....	31
3.5	TESTES DE PATOGENICIDADE.....	34
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	36
4.1	SINTOMATOLOGIA EM RAÍZES E RAMAS DE BATATA-DOCE.....	36
4.2	ANÁLISES FILOGENÉTICAS E SEQUENCIAMENTO DO DNA.....	38
4.3	IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA.....	42
4.3.1	Descrição das espécies.....	42
4.4	TESTE DE PATOGENICIDADE E AGRESSIVIDADE DOS ISOLADOS.....	48
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	52

<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>56</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>57</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) é uma espécie da família Convolvulaceae (SOUZA & LORENZI, 2008), caracterizada por ser uma hortaliça tuberosa com raízes ricas em amido e altamente produtiva. É considerada de fácil cultivo devido a sua rusticidade e por possuir ampla adaptação aos mais variados climas, fatores estes que permitem o seu cultivo em escala mundial (QUEIROGA, et al. 2007).

Segundo estimativas da FAO, esta cultura ocupa a sétima posição em produção de alimentos mais importantes do mundo, atingindo cerca de 9 milhões de hectares em áreas cultivadas, produzindo uma média de 14 toneladas da raiz por unidade de área. No Brasil, a batata-doce é umas das hortaliças mais produzidas e consumidas. Apesar de ser cultivada em todas as regiões do país, verificou-se que as regiões que mais se destacaram na produção desta cultura foram respectivamente: A região sul, sudeste e nordeste (IBGE, 2018). Se tratando dos estados brasileiros produtores desta cultura os estados que possuem as maiores taxas de produtividade são: Rio Grande do Sul, seguido por São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Sergipe (IBGE, 2018). No estado de Pernambuco a produção e o consumo da batata-doce é bastante disseminado entre as regiões, com uma produção média aproximada de 25 mil toneladas/ano (IBGE, 2015).

Dentre os diversos fatores limitantes à produção e comercialização de batata-doce, as doenças causadas por fungos possuem grande destaque, devido às perdas que podem ocasionar antes e após a colheita. Os fungos constituem o maior grupo de patógenos que causam doenças radiculares, ocorrendo em diferentes sistemas agrícolas, causando doenças em diversas espécies hospedeiras e com uma variada gama de sintomas (MICHEREFF et al., 2005). A presença desses patógenos em produtos agrícolas após a colheita pode produzir diversos efeitos que depreciam a qualidade do produto a ser comercializado, como manchas que afetam o aspecto visual, podridões que provocam alterações na consistência e no sabor e a produção de micotoxinas que tornam os produtos inviáveis ao consumo humano (CHITARRA E CHITARRA, 2005). Na cultura da batata-doce, já foram relatadas podridões das raízes causadas por *Rhizopus* sp., *Monilochaetes infuscans* Halst. ex Harter, *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl, *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halst. e *Dhiaporte destruens* Harter, J. (COELHO et al., 2005). Em relação as podridões de ramas de batata-doce já foram relatados como agentes causais as espécies *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas* e *Lasiodiplodia theobromae*. As podridões radiculares e das ramas de batata-doce

constituem doenças de grande importância quando analisados os impactos gerados na produção desta cultura no Brasil e no mundo, sendo responsáveis por perdas progressivas nas áreas de cultivo e nas etapas de armazenamento, uma vez que irão atuar na depreciação do produto destinado a comercialização (MICHEREFF et al., 2005). Quando se trata das ramas, além das perdas ocasionadas pela morte das plantas, outro fator que possui destaque é a disseminação dos patógenos para novas áreas de cultivo quando as ramas doentes são utilizadas como material propagativo (MACHADO et al., 2018a).

Espécies de fungos da família Botryosphaeriaceae são conhecidos pela importância fitopatológica e são responsáveis por causar danos a uma elevada gama de hospedeiros, com sintomas que variam de acordo com o grau de severidade em cada hospedeiro e estão amplamente distribuídos em diversas regiões do mundo. Os sintomas podem ser observados no campo na fase em que os produtos agrícolas ainda estão na lavoura e também durante o período pós-colheita. Estes patógenos podem causar podridões radiculares, damping-off, podridão dos frutos, podridão dos ramos, podridão de sementes, podridão do caule, cancrios e morte descendente, resultando muitas vezes na morte das plantas infectadas (SLIPPERS e WINGFIELD 2007; SLIPPERS et al. 2017).

Representantes da família Botryosphaeriaceae já foram relatados causando podridões radiculares e das ramas na cultura da batata-doce em diferentes localidades, sendo responsáveis por diversos sintomas em seus hospedeiros. Alguns destes representantes são: *Lasiodiplodia theobromae* que foi relatada na China como o agente causador da podridão de ramas em áreas de cultivo (HUANG et al., 2016). A espécie *Lasiodiplodia theobromae* também foi relatada causando podridão negra da batata e dos brotos na América do Norte (CLARK et al., 2013). A espécie *Macrophomina phaseolina* foi relatada nos Estados Unidos como o agente causador da podridão das raízes pós-colheita, atuando em complexo com a espécie *Fusarium solani*, causando lesões necróticas nas raízes que se encontram em processo de armazenamento (DA SILVA et al., 2013). No Brasil foi relatado a espécie *Neoscytalidium dimidiatum* como agente causal da podridão de raízes de batata-doce em áreas dos Estados de Pernambuco e Minas Gerais. No entanto, até o momento, nenhum estudo mais abrangente e acurado foi realizado com intuito de verificar a diversidade de fungos causadores das podridões de raízes e das ramas dessa cultura no Brasil. Além disso, no passado, os trabalhos de diagnose de doenças fúngicas dessa cultura eram baseados apenas em características morfológicas, o que pode ter acarretado em identificações pouco precisas das espécies.

Historicamente a taxonomia de fungos era baseada apenas na comparação de caracteres morfológicos como cor, forma e dimensões de estruturas reprodutivas, além de taxa de crescimento de culturas entre outros. Entretanto, devido a plasticidade e sobreposição morfológica, esses caracteres tornaram-se insuficientes para a separação das espécies que, por sua vez, pode acarretar em uma subestimação da real diversidade. Contudo, nos últimos anos, o avanço das técnicas moleculares e a facilidade de obtenção de sequências de DNA revolucionaram a taxonomia de fungos e se tornaram ferramentas fundamentais para identificação precisa das espécies (TAYLOR et al., 2000; PINHO et al., 2016). Seguindo essa abordagem, aliado às análises morfológicas e/ou fisiológicas para o estudo dos fungos da família Botryosphaeriaceae foi possível a separação de diversas espécies crípticas e a resolução de diversas dificuldades taxonômicas envolvendo fungos desse grupo (CROUS et al. 2006; PHILLIPS et al. 2013; HYDE et al., 2014; SLIPPERS et al. 2017).

Desta forma, diante da elevada incidência de podridões radiculares na cultura de batata-doce em Pernambuco e da carência de estudos etiológicos envolvendo as doenças dessa cultura no Brasil, torna-se necessária a realização de estudos que visem a utilização de análises morfológicas, apoiadas por estudos filogenéticos, para uma identificação precisa dos agentes etiológicos. Estes estudos certamente servirão como base para futuros estudos voltados para o controle dessas doenças.

O presente trabalho teve como objetivos a identificação dos fungos da família Botryosphaeriaceae causadores de podridões radiculares e de ramas em batata-doce no Brasil, por meio de análises filogenéticas utilizando sequências de DNA, juntamente com a avaliação das características morfológicas e testar a patogenicidade dos isolados.

## **2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1 A CULTURA DA BATATA-DOCE**

A batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) é uma planta pertencente à família Convolvulaceae e ao gênero *Ipomoea*, sendo a única espécie representante desta família cultivada para fins alimentícios (HALL; PHATAK, 1993). Estudos realizados com base nos principais caracteres da batata-doce indicam que a sua origem é datada a cerca de 5000 anos atrás em regiões da América Tropical, situada entre a América Central e América do Sul sendo disseminada posteriormente para outras regiões do mundo (AUSTIN, et al. 1988).

A variabilidade genética desta cultura foi estabelecida por meio da utilização de marcadores moleculares que ratificaram a sua origem na América Tropical e indicaram a região da América Central como a que possui a maior diversidade de espécies (HUANG; SUN, 2000).

A batata-doce pode ser encontrada em diversas regiões do mundo por sua ampla adaptabilidade. No Brasil nas diversas regiões em que a cultura é encontrada pode-se observar uma notável variação genética, provavelmente decorrente das frequentes introduções de plantas desta mesma espécie originária de outras regiões e da diversidade no modo de cultivo (SILVA et al., 2004).

O cultivo desta hortaliça pode ser realizado através do plantio de raízes tuberosas subterrâneas, com a utilização de suas ramas ou com o plantio de mudas. Com cada planta geralmente apresentando de quatro a dez raízes de armazenamento (SOUZA & LORENZI, 2008). Entretanto, o mecanismo de propagação utilizando as raízes de armazenamento que são as próprias batatas, não é recomendado para comercialização, porque a sua produtividade diminui em consequência do aumento do ciclo e as batatas produzidas são de baixa qualidade o que favorece a transmissão de doenças (EMBRAPA, 1995). O método de plantio da batata-doce mais utilizado e indicado, é através de suas ramas, que são pequenas hastes responsáveis pela propagação de novas plantas e devem possuir de oito a dez entrenós, onde cada entrenó corresponde a uma folha. É recomendado para o plantio deixar as ramas murcharem em lugares com sombra, longe do sol, por um ou dois dias antes de ser realizado o plantio para evitar a quebra das ramas durante a semeadura. As ramas são obtidas em viveiros feitos com batatas ou em lavouras novas, que são as lavouras com até noventa dias, não sendo recomendado a utilização de ramas de lavouras com mais de noventa dias para plantio. As mudas obtidas por meio de batatas produzidas em viveiros, são bastante utilizadas com a finalidade de encurtar o tempo de plantio, no entanto, aumentam o custo de produção e o risco da transmissão de doenças causadas por nematóides e outros patógenos (EMBRAPA, 1995).

As raízes de armazenamento normalmente brotam da parte inferior da planta que foi usada para sua propagação e o aspecto dessas raízes ao término do seu desenvolvimento será fundamental para sua comercialização. As folhas possuem variação de tamanho, coloração e formas e a coloração de suas flores pode variar de branco até um tom de rosa claro. A batata-doce é uma cultura definida como rústica por ser de fácil cultivo, possuindo tolerância as

regiões mais secas e com altas temperaturas e umidade, possui crescimento rápido, amadurecimento acelerado e adaptação aos mais variados tipos de solo o que a torna uma cultura de significativa importância econômica e bastante popular (QUEIROGA, et al. 2007).

Além de todas as características apresentadas pela cultura da batata-doce o seu alto índice de produção por unidade de área é um fator primordial que fortalece a relação custo benefício desta cultura com um tempo de cultivo de 100 a 150 dias após o seu plantio (EMBRAPA, 1995). Outro aspecto fundamental que reforça a sua importância econômica é a versatilidade que esta cultura possui, podendo ser utilizada para diversas finalidades desde a alimentação, que representa a maior porcentagem da sua utilização, produção de tecidos e cosméticos até a produção de biocombustíveis (CARDOSO et al., 2005).

Esta cultura tem um papel fundamental na alimentação humana e animal devido ao seu alto teor nutricional, presente tanto nas suas raízes tuberosas quanto nas suas ramas. A composição de todas as suas variedades é basicamente formada de vitaminas, amido, beta-caroteno, ferro e potássio (HILL et al., 1992). Todos esses componentes a tornam bastante popular principalmente no ramo gastronômico onde a mesma pode ser utilizada em pratos fritos, crus, cozidos no vapor e fervidos. Seu consumo também possui caráter social, sendo elevado e imprescindível nos países de terceiro mundo para a nutrição de milhares de crianças que sofrem de doenças relacionadas a alimentação inadequada, sua produção tem sido fundamental ao longo dos tempos para o alívio da fome e fornecimento de uma segurança alimentar. A alta taxa de produtividade é considerada um fator primordial para o alto consumo desta cultura (LOEBENSTEIN et al., 2009).

As raízes tuberosas de armazenamento da batata-doce são o principal produto comercial, dessa maneira é de fundamental importância que o material genético utilizado para cultivo seja adequado e resistente aos patógenos encontrados no solo, que danificam as raízes, podendo torná-las imprestáveis e impróprias para o consumo e a comercialização (MASSAROTO et al., 2014).

## 2.2 PRODUTIVIDADE DA BATATA-DOCE

Embora seja uma cultura conhecida por sua produção de subsistência, a batata-doce possui importância em escala mundial. A batata-doce em termo de produtividade representa a sétima cultura alimentar de maior importância mundial. A produção média de batata-doce em

uma determinada área de 9 milhões de hectares é de cerca de 124 milhões de toneladas, com um rendimento médio estimado em 13,7 ton/ ha (FAOSTAT, 2006). A produção encontra-se centralizada predominantemente nos países em desenvolvimento, esses países representam cerca de 97% da produção mundial desta cultura, sendo a China uma das maiores produtoras com uma representatividade de 52% da área total de cultivo de batata-doce no mundo (SCOTT et al., 2000).

No Brasil em meados de 2007 a cultura da batata-doce ocupava a terceira posição dentre as hortaliças mais produzidas e consumidas, com uma produção estimada de 1.287.960 toneladas ao ano (FAOSTAT, 2008). No ano de 2010 segundo dados do IBGE foram produzidas 495,2 mil toneladas distribuídas em 41.999 hectares (IBGE, 2012). Apesar de ser cultivada em todo o país, de acordo com a última estimativa realizada pelo IBGE no ano de 2016, as regiões que mais se destacaram na produção de batata-doce foram sul, sudeste e nordeste. No ranking dos principais estados produtores ficaram: Rio Grande do Sul, seguido por São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Sergipe (IBGE, 2018).

O Estado de Pernambuco possui grande destaque no cultivo desta hortaliça, que ocupa o terceiro lugar dentre as hortaliças mais cultivadas no Estado, sendo produzida em larga escala em grandes áreas de plantio e em sua maioria por pequenos agricultores, o que a torna uma cultura de grande importância econômica para a região, com uma produção estimada em 25 mil toneladas ao ano (IBGE, 2015).

Nas regiões produtoras de batata-doce no Brasil, a maior utilização das raízes tuberosas é destinada à comercialização e alimentação humana. As raízes secas que não serão comercializadas juntamente com as ramas são trituradas e utilizadas como um componente energético adicionado ao alimento dos ruminantes (BOSCO et al., 2004). No entanto, doenças ocasionadas por uma gama de patógenos atuam limitando a produção desta cultura no Brasil e no mundo.

### 2.3 DOENÇAS DA BATATA-DOCE

Por possuir cultivo simples e crescimento rápido, o plantio da batata-doce muitas vezes é realizado sem a utilização de agrotóxicos. Contudo, a planta pode servir de hospedeiro para diversas espécies de fungos, bactérias, nematoides e micoplasmas. Os danos causados a planta

por um ou mais desses agentes patogênicos dependem do grau de severidade e da parte da planta que foi afetada (EMBRAPA, 1995).

Dentre os diversos fatores limitantes à produção e comercialização de batata-doce, pode-se destacar as doenças causadas por microorganismos, pelas perdas que podem ocasionar antes e após a colheita. Inúmeros patógenos já foram relatados no Brasil causando várias doenças nessa cultura, como: O vírus do mosqueado da batata-doce (SPFMV), podridão bacteriana do caule (*Pectobacterium chrysanthemi*), superbrotamento, também conhecido como vassoura-de-bruxa, causado por um fitoplasma do gênero *Phytoplasma*, mal do pé (*Diaporthe destruens*), murcha de fusarium (*Fusarium oxysporum* f. sp. batatas) e meloidogynose (*Meloidogyne* spp.) (COELHO et al., 2005).

Os vírus possuem papel de destaque quando se trata de doenças na cultura da batata-doce, algumas espécies de vírus já foram relatadas nesta cultura e estudos apontam que existem interações entre essas espécies. A doença mais comum causada por vírus é a causada pelo vírus *Feathery mottle virus* conhecido como o vírus do mosqueado, cuja principal característica é a formação de um padrão de mosaico no meristema das plantas. Os principais sintomas apresentados são: diminuição do tamanho das folhas, amarelecimento e diminuição da planta. Sendo que a principal maneira de disseminação é através de ramas e a principal estratégia de controle é a utilização de ramas sadias no plantio (PEREIRA et al., 2011).

As bactérias também representam um grupo importante de fitopatógenos desta cultura, dentre as diversas doenças que este grupo de agentes patogênicos pode causar, uma das doenças bastante comum é a podridão do caule causada pela bactéria *Pectobacterium chrysanthemi*, doença caracterizada por causar manchas marrons e com aspecto enegrecido por toda a raiz além de um forte odor característico desta doença (CLARK et al., 2009).

Os fungos por sua vez representam o maior grupo de patógenos para esta cultura, sendo responsáveis por diversas doenças que podem causar morte da planta pela podridão de ramas e raízes. Uma das principais doenças causadas por fungos que acomete esta cultura é o mal-do-pé, causado pelo *Diaporthe destruens* que é agente etiológico responsável por inúmeras perdas no campo.

Segundo dados obtidos pela EMBRAPA (2006) os fungos atuam negativamente na produção da cultura da batata-doce, onde são responsáveis por causar sintomas nas plantas

que podem variar desde murcha nas folhas a morte das plantas, fatores estes que influenciam diretamente no produto que irá ser comercializado.

#### 2.4 PODRIDÕES RADICULARES E DAS RAMAS CAUSADAS POR FUNGOS

No âmbito de patógenos que causam podridões radiculares e das ramas nessa cultura em questão, os fungos possuem grande destaque no que se refere a quantidade de perdas ocasionadas. Os fungos constituem o maior grupo de agentes etiológicos que causam doenças radiculares, ocorrendo em diferentes sistemas agrícolas, causando doenças em diversas espécies hospedeiras e com uma variada gama de sintomas (MICHEREFF et al., 2005). A presença desses patógenos em produtos agrícolas após a colheita, pode produzir diversos efeitos que depreciam a qualidade das raízes, como manchas que afetam o aspecto visual, podridões que provocam alterações na consistência e no sabor, e micotoxinas que tornam os produtos inviáveis ao consumo humano (CHITARRA E CHITARRA, 2005).

As raízes e as ramas consistem em estruturas vitais para o desenvolvimento da planta. A raiz pela sua função de retenção de água e sais minerais do solo e que serão utilizadas por toda a planta e as ramas que são utilizadas como o principal método propagativo desta espécie (EMBRAPA, 1995). Desse modo, pela sua vital importância para a manutenção das plantas as doenças que afetam essas estruturas são consideradas graves e de grande importância.

Podridões radiculares e das ramas estão entre as doenças mais comuns causadas por fitopatógenos que habitam o solo, podendo permanecer no solo na ausência de um hospedeiro específico na forma de esclerócios em restos culturais ou na forma de esporos. Nessas doenças, as raízes das plantas são afetadas e os tecidos radiculares tornam-se necróticos e morrem. O sistema radicular inteiro da planta hospedeira ou somente uma pequena área próxima ao local de penetração do patógeno pode tornar-se infectada. Muitas podridões radiculares e das ramas causam a morte rápida da planta, enquanto outras causam somente sintomas leves e têm impacto mínimo no desenvolvimento da planta. Os patógenos causadores de podridões radiculares normalmente atuam em seus hospedeiros utilizando substâncias enzimáticas que serão essenciais no processo de infecção (WHEELER E RUSH, 2001).

Dentre as podridões fúngicas que afetam a cultura da batata-doce, podemos citar algumas doenças importantes para esta cultura como por exemplo: o mal-do-pé causada pelo *Diaporthe destruens*, a doença da morte descendente causada pelo agente etiológico *Lasiodiplodia theobromae*, a podridão mole das raízes causada por *Rhizopus* sp. , a podridão negra da batata-doce causada por *Ceratocystis fimbriata*, a sarna da batata-doce que possui como agente etiológico o *Monilochaetes infuscans* e a Murcha de *Fusarium* causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas* (COELHO et al., 2005).

#### **2.4.1 Mal-do-pé (*Diaporthe destruens*)**

O mal-do-pé é uma doença causada pelo fungo *Diaporthe destruens* (= *Phomopsis destruens*, *Plenodomus destruens*) (BOEREMA et. al., 1996). É uma das doenças radiculares mais comuns e mais agressivas que acometem esta cultura, fator determinante para as inúmeras perdas que ocasiona, sendo capaz de tornar o cultivo inviável em uma determinada área por muitos anos, devido à presença do patógeno no solo (PEREIRA et. al., 2011). O fungo *Diaporthe destruens* possui como características morfológicas a presença de picnídios escuros, que são produzidos de forma isolada ou agrupada com formato que pode variar de arredondado a irregular. Os conídios que são produzidos dentro dos picnídios são hialinos unicelulares e medem cerca de 7-10 x 3-4 µm (PEREIRA et. al., 2011).

A doença do mal-do-pé é caracterizada pela presença de lesões necróticas que surgem primeiramente no caule, afetando suas ramas, com a formação de pequenos pontos escuros que irão aumentar gradativamente se espalhando pelo caule, que ficará com aspecto enegrecido, sua disseminação ocorre por meio de raízes tuberosas. Como consequência desta infecção frequentemente ocorre a murcha das folhas e morte da planta (PEREIRA et. al., 2011). A identificação desta doença pode ser realizada através da presença de folhas em estágio de amarelecimento que se encontrem próximas ao caule. A doença geralmente surge na área de plantio devido a utilização de mudas contaminadas ou solo contaminado e pode aparecer no campo ou apenas quando a planta se encontrar no período pós-colheita (CLARK et al., 2009).

#### **2.4.2 Doença da morte descendente podridão de *Lasiodiplodia***

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* pertence a família Botryosphaeriaceae e já foi relatado causando murchas e queda de folhas em pimenta-do-reino e eucalipto, causando

deteriorização de frutos como a banana, goiaba e manga que pode acontecer nos processos antes e depois da colheita (TREMACOLDI et al., 2010; MARQUES et al., 2003). Este fungo também já foi relatado causando doenças nos ramos de: cajueiro, macieira, coqueiro, abacateiro, dentre outros. No caso da cultura da batata-doce o fungo é responsável por causar podridão radicular e das ramas, as raízes são principalmente afetadas na etapa de armazenamento, pós-colheita, onde normalmente surgem por meio da presença de lesões e ferimentos nas raízes durante o processo de armazenagem que facilitam a penetração do fungo (KRANZ et al., 1977). Os sintomas apresentados pelo hospedeiro podem não ser percebidos a princípio pelo tipo de infecção que causa na planta, afetando os seus tecidos internos e aumentando a severidade da necrose com o decorrer do tempo.

O patógeno tem a capacidade de se desenvolver rapidamente em solos argilosos com umidade elevada. É típico de regiões tropicais e subtropicais onde pode atuar em um vasto número de espécies agrícolas. O fungo quando cultivado em meio de cultura apresenta a colônia com aspecto enegrecido, característico deste gênero, com presença abundante de micélio. Formam picnídios simples ou compostos, presença de conídios hialinos na fase jovem e pigmentados e estriados quando alcançam a maturidade (PHILIPS et al., 2013).

#### **2.4.3 Podridão mole (*Rhizopus* sp.)**

A podridão mole causada por espécies de *Rhizopus* corresponde a uma das doenças pós colheita de maior importância dentro da cultura da batata-doce, por ser mais comum o aparecimento dos sintomas nas raízes no período de armazenamento. Essa doença já foi relatada em diversas regiões do Brasil e a espécie de *Rhizopus* que frequentemente está relacionada a essa doença é *Rhizopus stolonizer*.

O agente etiológico da podridão mole é um fungo sapróbio, habitante do solo. É caracterizado por produzir zigósporos através de seu ciclo sexual, os seus esporangiósporos, na fase assexual, são facilmente disseminados pelo ar podendo se depositar na superfície das raízes onde germinam e penetram através de ferimentos que geralmente são ocasionados através do manejo das raízes durante a colheita e armazenamento. O mecanismo de ação do fungo nas raízes consiste na liberação de metabólitos secundários que degradam o tecido radicular causando a desintegração das células e causando a podridão mole das raízes. O fungo libera esporos na superfície radicular que possuem a capacidade de transformar as raízes em massas aquosas em um curto prazo de tempo (CLARK et al., 2009).

#### **2.4.4 Podridão negra da batata-doce (*Ceratocystis fimbriata*)**

O fungo *Ceratocystis fimbriata* é o agente etiológico da podridão negra da batata-doce, doença com ocorrência no Brasil (EMBRAPA, 1995) e que é responsável por causar lesões enegrecidas nas raízes da batata-doce deixando-as com um mau cheiro característico. As principais características morfológicas do fungo são: Ascósporos em forma de “chapéu”, peritécio escuro e globoso, podendo apresentar clamidósporos. O fungo também apresenta fiálides hialinas e cilíndricas (CLARK et al., 2009).

A ocorrência da doença é maior durante o processo de armazenamento onde as raízes ficam mais susceptíveis a penetração do fungo, os esporos atingem a superfície radicular das plantas, se espalhando e causando lesões enegrecidas em suas raízes, podendo afetar outras estruturas da planta culminando com a sua morte.

#### **2.4.5 Sarna da batata-doce (*Monilochaeres infuscans*)**

A sarna da batata-doce é uma doença bastante comum responsável pela depreciação das raízes durante o armazenamento. É caracterizada pelo aparecimento de manchas e lesões normalmente durante o processo de armazenamento, afetando negativamente a comercialização dessas raízes. O fungo responsável por causar a sarna da batata-doce é *Monilochaeres infuscans*, que possui como características morfológicas conídios unicelulares, hialinos, ovóides a oblongos (HARTER, 1916; RÉBLOVÁ et al., 2011).

O fungo causa manchas escuras e espaçadas pela estrutura da raiz, embora a polpa da raiz não seja afetada, é uma doença de grande importância por desvalorizar o aspecto visual das raízes (PEREIRA et. al., 2011).

#### **2.4.6 Murcha de *Fusarium***

A murcha de *Fusarium* é uma doença que ocorre em grande parte das áreas de cultivo de batata-doce. O agente etiológico desta doença é o *Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas* que possui como principal mecanismo de disseminação da doença a sua presença nos materiais utilizados para propagação da batata-doce. Outros fatores como contaminação na água de irrigação e implementos agrícolas, também facilitam a disseminação da doença (COELHO et al., 2016).

Os principais sintomas apresentados são evidenciados pelo amarelecimento das folhas mais velhas e em casos mais severos causando a morte da planta, descoloração de ramos e caules podendo apresentar posterior escurecimento do sistema vascular (COELHO et al., 2016).

O fungo possui como características morfológicas: presença de macroconídios fusiformes e hialinos, em esporodóquios, e microconídios elipsoides, hialinos, em monofiálides curtas formadas no micélio aéreo. O fungo pode produzir clamidósporos, fator que lhe confere resistência e permanência duradoura em áreas de cultivo (LESLIE & SUMMERELL, 2006).

## 2.5 FAMÍLIA BOTRYOSPHAERIACEAE

Os fungos representantes da família Botryosphaeriaceae (Botryosphaeriales, Dothideomycetes, Ascomycota) são conhecidos por possuir ampla distribuição, o que resulta diretamente na quantidade e variedade de hospedeiros afetados pela presença desses fungos e na diversidade de sintomas causados em cada hospedeiro. As espécies afetadas já relatadas na literatura foram: monocotiledôneas, dicotiledôneas, gimnospermas e angiospermas podendo variar de espécies nativas a culturas de importância econômica. Devido a sua diversidade, esses fungos podem ser encontradas de três formas distintas na natureza, como saprófitos, endófitos e parasitas (SLIPPERS E WINGFIELD 2007).

A princípio em meados de 1950 a identificação desses fungos era baseada na morfologia geral dos ascósporos, sendo esses caracteres relevantes e filogeneticamente informativos para a identificação de fungos pertencentes a esta família. A partir dos anos 80 o aspecto morfológico das colônias passou a ter mais importância e surgiram como mais um aspecto taxonômico para identificação deste grupo (GURE et al. 2005). Na grande maioria dos casos, indivíduos da família Botryosphaeriaceae possuem um micélio aéreo que pode variar de cinza a preto e uma colônia com aspecto enegrecido facilmente visualizado em Placa de Petri. Esse caractere é importante para a realização de uma seleção inicial de indivíduos morfológicamente semelhantes aos fungos desta família (SLIPPERS E WINGFIELD 2007). A caracterização morfológica é realizada apenas por meio da identificação de sua forma anamorfa que é a mais encontrada na natureza. Os caracteres que são incluídos nessa identificação são: forma, tamanho, septação, cor, espessura da parede dos conídios e detalhes da conidiogênese (DENMAN et al., 2003). No entanto, a identificação morfológica na

categoria de espécie desses fungos é um trabalho complicado, devido sobreposição dos caracteres morfológicos.

Com o passar dos anos por meio dos significativos avanços tecnológicos nas diversas áreas, a utilização de ferramentas moleculares passou a ter papel fundamental na identificação dos fungos desta e de outras famílias, possibilitando a união de aspectos morfológicos e de aspectos moleculares de cada indivíduo solucionando grande parte desta problemática, sendo possível estabelecer um forte suporte taxonômico para a separação de gêneros e espécies dentro da família, além de reclassificar indivíduos que antes acreditava-se fazer parte desse grupo. (CROUS et al. 2006; SLIPPERS E WINGFIELD 2007).

Um estudo de grande impacto para esta família foi realizado por Crous et al. (2006) onde culturas fúngicas com características semelhantes aos indivíduos pertencentes à família Botryosphaeriaceae foram submetidos ao uso de ferramentas moleculares a fim de se estabelecer alguma ligação filogenética entre os grupos. O estudo revelou que existiam cerca de 10 linhagens dentro de Botryosphaeriaceae que estavam descritos como pertencendo a gêneros distintos.

A princípio a metodologia utilizada para a identificação molecular desses fungos e diferenciação das espécies era baseada na análise das sequências de DNA da região ITS. Entretanto, verificou-se que apenas a utilização do gene ITS (Espaço interno transcrito) não era capaz de diferenciar espécies crípticas dentro desta família, foi então que foi acrescido na identificação molecular destes fungos com o sequenciamento parcial do fator de alongação (TEF- $\alpha$ ) que passou a ser utilizado em associação com o gene ITS promovendo resultados promissores na identificação de indivíduos desta família (PHILIPS et al., 2013).

Diversos estudos filogenéticos acerca da família Botryosphaeriaceae foram realizados posteriormente, a fim de se estabelecer o nível de diversidade de gêneros que a família possui. Um dos trabalhos mais recentes para este fim foi o de Phillips et al. (2019) que fortaleceu o posicionamento filogenético desta família, com base em estudos evolutivos, análises morfológicas e filogenéticas. O estudo estabeleceu 18 gêneros associados a esta família, sendo eles: *Diplodia*, *Alanphillipsia*, *Neofusicoccum*, *Macrophomina*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum*, *Barriopsis*, *Dothiorella*, *Phaeobotryon*, *Sphaeropsis*, *Oblonbocollomyces*, *Tiarosporella*, *Neodeightonia*, *Phaeobotryon*, *Botryobambusa*, *Botryosphaeria*, *Cophinforma* e *Endomelanconiopsis*.

O estudo da diversidade de espécies relacionadas a esta família é de suma importância quando observado a diversidade de hospedeiros e de regiões que favorecem o desenvolvimento destes fungos. No nordeste brasileiro estudos foram realizados e obtiveram resultados bastante significativos quando à riqueza de espécies. Indivíduos desta família foram relatados causando podridão em mangueira (MARQUES et al., 2013), em mandioca (MACHADO et al., 2014) em raízes de batata-doce (MELLO et al., 2018), em culturas oleaginosas (MACHADO et al., 2018) dentre outras. Espera-se que com a realização de mais estudos na região Nordeste do Brasil, muitas outras espécies sejam relatadas ou descritas pela primeira vez.

### **2.5.1 Doenças causadas por espécies da família Botryosphaeriaceae**

As espécies de fungos pertencentes a família Botryosphaeriaceae são encontrados em sua maioria como fungos fitopatogênicos capazes de causar uma gama de sintomas em diversos hospedeiros, principalmente aqueles relacionados a espécies de angiospermas. As espécies desta família podem ser especificidade a um hospedeiro, quando estão associadas a um único hospedeiro ou mais generalistas, quando podem afetar mais de um hospedeiro (SLIPPERS E WINGFIELD 2007).

Segundo Slippers e Wingfield (2007) os fatores que influenciam na associação a um ou mais hospedeiros podem estar relacionados com competição com outras espécies endofíticas, fatores ambientais abióticos, variação fisiológica dos hospedeiros e outros fatores que ainda precisam ser identificados. Esses fungos são responsáveis por causar doenças pós-colheita em diversas culturas de grande importância econômica no Brasil e no mundo.

As infecções causadas por esses fungos podem se iniciar através de ferimentos nos tecidos de seus hospedeiros. No entanto, as infecções através de estruturas sadias de seus hospedeiros, como os estômatos, tem sido relatados por meio da dispersão de esporos tem sido bastante relatadas em todo o mundo (SMITH et al., 2001). A forma de expressão de doenças dos fungos da família Botryosphaeriaceae é praticamente exclusiva da ocorrência de algum estresse ou alguma interferência no crescimento das plantas (STANOSZ et al. 2001). Os principais sintomas estão associados a podridão radiculares durante a fase em que os produtos agrícolas ainda estão na lavoura e também durante o período pós-colheita, com a presença de lesões necróticas nas raízes da planta que se estendem pelo caule, podridão dos frutos, podridão dos ramos, morte de sementes, mancha azul, podridão do caule, resultando na morte das plantas

infectadas (SWART E WINGFIELD 1991). Os impactos provocados pelas doenças causadas por esses fungos são relatados em diversas culturas e em se tratando de doenças em sistemas agrícolas o impacto está diretamente associado a perdas no âmbito econômico.

Dentre os hospedeiros que são susceptíveis a espécies desta família, pode-se citar como exemplo: batata-doce, mandioca, mangueira, videira, goiabeira, bananeira, eucalipto, cajueiro, macieira, mamão, abacateiro, melancia, pinhão manso entre muitos outros (URBEZ-TORRES et al. 2012; MARQUES et al., 2013; MACHADO et al. 2014; BARRADAS et al. 2016; NETTO et al., 2017).

No nordeste brasileiro, estudos foram realizados com ênfase nesta família e nas doenças com as quais essas espécies encontram-se relacionadas. Constatou-se a presença dessas espécies como agentes causais principalmente de podridões de raízes e de frutos. Alguns dos hospedeiros relatados foram: mangueira, sendo acometida de podridão dos frutos (MARQUES et al., 2013;) mandioca, com relato de podridão seca e podridão negra de suas raízes (MACHADO et al., 2014) e batata-doce, apresentando podridão de suas raízes (MELLO et al., 2018).

Representantes da família Botryosphaeriaceae já foram relatados causando podridões radiculares e das ramas na cultura da batata-doce em algumas regiões do mundo. Alguns dos principais gêneros envolvidos são: *Lasiodiplodia*, *Neoscytalidium* e *Macrophomina*.

O gênero *Lasiodiplodia* corresponde ao gênero com o maior número de espécies descritas, dentro desta família, em todo o mundo. Frequentemente com o uso de técnicas moleculares, espécies novas estão sendo cada vez mais descobertas e relatadas. Os representantes deste gênero estão associados a podridão radicular de frutos, ramos e caules dos hospedeiros. Suas características taxonômicas principais são: micélio com coloração inicialmente cinza claro e posteriormente apresentando uma coloração mais escura, podendo variar de um tom cinza escuro a preto, presença de conídios inicialmente hialinos, às vezes septados e que quando maduros, passam a ser septados pigmentados com cor amarronzada e com estrias longitudinais (PHILIPS et al., 2013).

O gênero *Neoscytalidium* é um dos gêneros mais conhecidos desta família e a espécie com maior distribuição geográfica é o *Neoscytalidium dimidiatum*. Suas características taxonômicas principais são: cultura inicialmente apresentando coloração branca e

posteriormente encontra-se no tom verde escuro a preto. Presença de artroconídios apresentando de 1 a 2 septos liberados a partir da fragmentação da hifa no sinanamorfo e formam picnídios escuros que produzem conídios inicialmente hialinos, asseptados, elipsoides, tornando-se septados e pigmentados na maturidade (PHILIPS et al., 2013).

O gênero *Macrophomina* é um gênero de grande importância e seus representantes estão associados a podridões radiculares, de frutos e caule em seus hospedeiros. Suas características taxonômicas principais são: micélio com coloração inicialmente cinza claro e posteriormente apresentando uma coloração preta. Presença de conidioma picnidial, conidióforos reduzidos a células conidiogênicas que estão dispostas ao longo do revestimento interno do conidioma. Esclerócio ocorrendo no tecido hospedeiro ou no solo, preto, liso e duro (PHILIPS et al., 2013).

Dentro destes gêneros, algumas espécies já foram relatadas ocasionando podridão radicular e das ramas da batata-doce como é o caso da *Lasiodiplodia theobromae* que já foi relatada na China como o agente causador da podridão de ramas em áreas de cultivo (HUANG et al., 2016). Também foi relatada causando podridão negra da batata e dos brotos na América do Norte (CLARK et al., 2013). A espécie *Macrophomina phaseolina* já foi relatada nos Estados Unidos como o agente causador da podridão das raízes pós-colheita, atuando em complexo com a espécie *Fusarium solani*, causando lesões necróticas nas raízes que se encontram em processo de armazenamento (DA SILVA et al., 2013).

No Brasil esses fungos possuem grande importância e são responsáveis por causar doenças em diversos hospedeiros que são importantes economicamente. Se tratando da cultura da batata-doce, apenas a espécie *Lasiodiplodia theobromae* (MENDES et al., 1998) já foi relatada causando podridão radicular e das ramas em pós-colheita no Brasil.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 COLETA DE AMOSTRAS E ISOLAMENTO DOS FUNGOS**

Inicialmente foram coletadas raízes de batata-doce com sintomas de podridões em diferentes mercados municipais nas cidades de Recife/PE Igarassu e Olinda e no CEASA-PE. Posteriormente, áreas cultivadas com batata-doce nos municípios de Glória de Goitá, Vitória

de Santo Antão, Camocim de São Félix, Aliança e Goiana em Pernambuco foram visitadas e foram coletadas raízes e ramos de batata-doce com sintomas de podridão. Áreas de cultivo de batata-doce no município de Jaíba no Estado de Minas Gerais, também foram visitadas e foram coletadas raízes e ramos com sintomas de podridão.

As amostras de raízes foram encaminhadas ao Laboratório de Micologia Ambiental do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco e incubadas em caixas plásticas contendo papel filtro umedecido para a indução da formação a estruturas fúngicas e posterior isolamento. O método de isolamento direto foi realizado para algumas amostras, com o auxílio de um estereomicroscópio para observação dos esporos, foi realizada uma raspagem com o auxílio de uma seringa nas estruturas fúngicas para a obtenção de culturas monospóricas em meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) (PINHO et al., 2016). Contudo, a maioria das culturas foi obtida através do método de isolamento indireto, que consistiu de cortes de fragmentos nas ramos e nas raízes de batata-doce no limite entre o tecido sadio e o tecido necrosado e passaram por um processo de desinfestação com as seguintes etapas: imersão por um minuto em uma solução de álcool a 70%, três minutos em uma solução de hipoclorito a uma concentração de 1%, um minuto em água destilada, um minuto secando em papel filtro, devidamente esterilizado. Após esse processo os fragmentos foram incubados em placas de Petri contendo o meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) com antibiótico (cloranfenicol, na concentração de um grama a cada 1000 mL de meio de cultura). Após o crescimento das colônias de cada fragmento, estas foram repicadas para placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Água e posteriormente foram purificadas através de repicagem de ponta de hifas com o auxílio de um estereomicroscópio, para assegurar de que se tratava de um único indivíduo obtendo culturas puras. Após o crescimento das colônias, estas foram repicadas para placas com meio BDA e mantidas a uma temperatura de 25°C. O armazenamento das culturas foi realizado por meio do método de Castellani (1967).

### 3.2 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA

A identificação dos fungos foi baseada no estudo da morfologia das estruturas vegetativas e reprodutivas e análises filogenéticas de sequências de DNA. Todos os isolados foram induzidos à esporulação através da metodologia descrita por Machado et al. (2014). Cortes manuais das estruturas relevantes para cada gênero foram realizados, sendo montados em lactoglicerol para visualização em microscópio de luz. Após a montagem de lâminas e

análise em microscópio de luz, realizou-se 30 medições de todos os caracteres morfológicos relevantes para a identificação. Com o auxílio de chaves dicotômicas foi feita a identificação dos fungos em nível de gênero. Após a determinação do gênero, o material obtido foi comparado às descrições de fungos já publicadas, para a determinação da espécie.

### 3.3 EXTRAÇÃO DE DNA, REAÇÃO DE PCR, SEQUENCIAMENTO E PURIFICAÇÃO

Os isolados foram cultivados em meio de cultura batata dextrose ágar à 25 °C por sete dias. O micélio foi removido com auxílio de um escalpelo e inserido em microtubos de 2 mL, devidamente identificados com a numeração de cada amostra, contendo 4 esferas de vidro de 3mm de diâmetro e foi adicionado ao micélio 300µl da solução *Nuclei Lysis Solution* do Kit de extração de DNA genômico da Promega (Wizard Genomic DNA Purification Kit). O protocolo seguiu conforme descrito por Pinho et al. (2012).

Para a identificação preliminar das espécies, primeiramente foi realizada a amplificação e sequenciamento parcial da região do fator de alongação (*TEF1-α*) (HYDE et al., 2014) para os isolados selecionados, utilizando os primers EF1F e EF2R (JACOBS et al. 2004). Para cada 12,5 µL de reação de cadeia da polimerase (PCR) foram utilizados os seguintes ingredientes: 6,25 µL de GoTaq Master Mix (Promega), 0,5 µL de cada *primer* na concentração de 10µmol (*Foward e reverse*), 4,25 µL de água livre de nucleases e 1 µL de cada amostra de DNA. O primeiro ciclo de amplificação consistiu na desnaturação do DNA a uma temperatura de 95°C por cinco minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 50 segundos, anelamento a 56 °C e alongamento a 72 °C por 50 segundos, e extensão final a 72 °C por cinco minutos.

Após a identificação preliminar utilizando (*TEF1-α*) isolados representativos das espécies encontradas foram selecionados e definidos para a amplificação e sequenciamento da região do fator interno de transcrição (ITS), com a utilizações dos *primers* ITS 1 (*Foward*) e ITS 4 (*Reverse*) (WHITE et al., 1990). O primeiro ciclo da amplificação consistiu na desnaturação do DNA a uma temperatura de 94°C por cinco minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30s, anelamento a 52°C e alongamento a 72°C por 40s cada; e extensão final a 72 ° C por cinco min. Após a realização da amplificação, as amostras seguiram para realização da eletroforese em gel de agarose a 1% marcadas com GelRed™ (Biotium) à 80volts e uma amperagem de 500A por 30 minutos. Afim de se observar a formação de bandas com auxílio de um transiluminador.

Os produtos de PCR foram purificados utilizando a enzima Exosap illustra™ ExoProStar™ 1-Step (GE Healthcare Life Sciences) seguindo o seguinte protocolo do fabricante e sequenciados na plataforma de sequenciamento do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Brasil).

As sequências de nucleotídeos foram editadas com o software BioEdit (HALL, 2014). As novas sequências foram depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

### 3.4 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

As sequências obtidas foram inicialmente comparadas ao banco de dados do GenBank (NCBI) utilizando o programa Mega BLAST, foram adicionadas ao conjunto de sequências obtidas no Genbank (Tabela 1) e alinhadas no programa MUSCLE® (EDGAR, 2004) existente no software MEGA v. 7 (KUMAR et al., 2015). Ajustes manuais foram realizados quando necessário.

A análise de Inferência Bayesiana (BI) foi realizada no MrBayes v.3.1.1 (RONQUIST & HUELSENBECK, 2003) no portal CIPRES science gateway on XSEDE. Primeiramente foram obtidas árvores filogenéticas preliminares do fator de alongação (TEF1- $\alpha$ ) para os isolados selecionados da família Botryosphaeriaceae. Os modelos de substituição de nucleotídeos para os alinhamentos de sequências dos gêneros *Lasiodiplodia*, *Neoscytalidium* e *Macrophomina* foram selecionados através do Mr. MODELTEST 2.3 (POSADA E BUCKLEY, 2004), sendo estimados separadamente para cada região gênica de acordo com Akaike Information Criterion (AIC). Por fim, foram geradas as árvores filogenéticas utilizando matrizes x de sequências de ITS e TEF1- $\alpha$  concatenadas para o gênero *Lasiodiplodia* e para os gêneros *Neoscytalidium* e *Macrophomina* separadamente.

**Tabela 1-** Números de acesso do GenBank de sequências de DNA usadas nas análises filogenéticas

Espécies	Isolados	Hospedeiro/substrato	n° de acesso do Genbank	
			ITS	TEF1- $\alpha$
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	CMW8000	<i>Prunus</i> sp.	AY236949	AY236898
<i>L. avicenniae</i>	CMW 41467	<i>Avicennia marina</i>	KP860835	<u>KP860680</u>
<i>L. avicenniae</i>	LAS 199	<i>Avicennia marina</i>	KU587957	<u>KU587947</u>

<i>L. brasiliense</i>	CMM4015	<i>Mangifera indica</i>	JX464063	<u>JX464049</u>
<i>L. brasiliense</i>	CMM2321	<i>Carica papaya</i>	KC484797	<u>KC481528</u>
<i>L. brasiliense</i>	CMW 35884	<i>Adansonia madagascariensis</i>	KU887094	KU886972
<i>L. bruguierae</i>	CMW 41470	<i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	KP860833	<u>KP860678</u>
<i>L. bruguierae</i>	CMW 42480	<i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	KP860832	<u>KP860677</u>
<i>L. caatinguensis</i>	CMM 1325	<i>Citrus sinensis</i>	KT154760	<u>KT008006</u>
<i>L. caatinguensis</i>	IBL 381	<i>Spondias purpurea</i>	KT154757	<u>KT154751</u>
<i>L. chinensis</i>	CGMCC 3.18061	Unknown	KX499889	<u>KX499927</u>
<i>L. chinensis</i>	CGMCC 3.18044	<i>Vaccinium uliginosum</i>	KX499875	<u>KX499913</u>
<i>L. chinensis</i>	CGMCC 3.18066	<i>Hevea brasiliensis</i>	KX499899	KX499937
<i>L. chinensis</i>	CGMCC 3.18067	<i>Sterculia lychnophora</i>	KX499901	KX499939
<i>L. citricola</i>	IRAN1522C	<i>Citrus</i> sp.	GU945354	<u>GU945340</u>
<i>L. citricola</i>	IRAN1521C	<i>Citrus</i> sp.	GU945353	<u>GU945339</u>
<i>L. crassispora</i>	WAC 12533	<i>Santalum album</i>	DQ103550	<u>DQ103557</u>
<i>L. crassispora</i>	CMW 13488	<i>Eucalyptus urophylla</i>	DQ103552	<u>DQ103559</u>
<i>L. euphorbicola</i>	CMM3609	<i>Jatropha curcas</i>	KF234543	<u>KF226689</u>
<i>L. euphorbiicola</i>	CMW 33350	<i>Adansonia digitata</i>	KU887149	<u>KU887026</u>
<i>L. euphorbiicola</i>	CMW 36231	<i>Adansonia digitata</i>	KU887187	KU887063
<i>L. exigua</i>	CBS 137785	<i>Retama raetam</i>	KJ638317	<u>KJ638336</u>
<i>L. exigua</i>	BL 184	<i>Retama raetam</i>	KJ638318	<u>KJ638337</u>
<i>L. gilanensis</i>	IRAN1523C	Unknown	GU945351	<u>GU945342</u>
<i>L. gilanensis</i>	IRAN1501C	Unknown	GU945352	<u>GU945341</u>
<i>L. gonubiensis</i>	CMW 14077	<i>Syzygium cordatum</i>	AY639595	<u>DQ103566</u>
<i>L. gonubiensis</i>	CMW 14078	<i>Syzygium cordatum</i>	AY639594	<u>DQ103567</u>
<i>L. gravistriata</i>	CMM 4564	<i>Anacardium humile</i>	KT250949	<u>KT250950</u>
<i>L. gravistriata</i>	CMM 4565	<i>Anacardium humile</i>	KT250947	<u>KT266812</u>
<i>L. hormozganensis</i>	IRAN1500C	<i>Olea</i> sp.	GU945355	<u>GU945343</u>
<i>L. hormozganensis</i>	IRAN1498C	<i>Mangifera indica</i>	GU945356	<u>GU945344</u>
<b><i>L. hormozganensis</i></b>	<b>ARM 47</b>	<i>Iphomoea batatas</i>	MK488032	<u>MK511875</u>
<b><i>L. hormozganensis</i></b>	<b>URM 8038</b>	<i>Iphomoea batatas</i>	MK488038	<u>MK511886</u>
<i>L. hyalina</i>	CGMCC 3.17975	<i>Acacia confusa</i>	KX499879	<u>KX499917</u>
<i>L. hyalina</i>	CGMCC 3.18383	Árvore desconhecida	KY767661	<u>KY751302</u>
<i>L. iranensis</i>	IRAN 1520C	<i>Salvadora persica</i>	GU945348	<u>GU945336</u>
<i>L. iranensis</i>	IRAN 1502C	<i>Juglans</i> sp.	GU945347	<u>GU945335</u>
<i>L. laeliocattleyae</i>	CBS130992	<i>Mangifera indica</i>	JN814397	<u>JN814424</u>
<i>L. laeliocattleyae</i>	BOT-29	<i>Mangifera indica</i>	JN814401	<u>JN814428</u>
<i>L. lignicola</i>	CBS 134112	Dead wood	JX646797	<u>KU887003</u>
<i>L. macrospora</i>	CMM3833	<i>Jatropha curcas</i>	KF234557	<u>KF226718</u>
<i>L. mahajangana</i>	CMW27801	<i>Terminalia catappa</i>	FJ900595	<u>FJ900641</u>
<i>L. mahajangana</i>	CMW27818	<i>Terminalia catappa</i>	FJ900596	<u>FJ900642</u>
<i>L. margaritacea</i>	CBS 122519	<i>Adansonia gibbosa</i>	EU144050	<u>EU144065</u>
<i>L. margaritacea</i>	CBS 122065	<i>Adansonia gibbosa</i>	EU144051	<u>EU144066</u>
<i>L. mediterranea</i>	CBS 137783	<i>Quercus ilex</i>	KJ638312	<u>KJ638331</u>

<i>L. mediterranea</i>	CBS 137784	<i>Vitis vinifera</i>	KJ638311	<u>KJ638330</u>
<i>L. missouriana</i>	UCD2193MO	<i>Vitis vinifera</i>	HQ288225	<u>HQ288267</u>
<i>L. missouriana</i>	UCD2199MO	<i>Vitis vinifera</i>	HQ288226	<u>HQ288268</u>
<i>L. parva</i>	CBS456.78	Cassava-field soil	EF622083	<u>EF622063</u>
<i>L. parva</i>	CBS494.78	Cassava-field soil	EF622084	<u>EF622064</u>
<i>L. plurivora</i>	STE-U 5803	<i>P. salicina</i>	EF445362	<u>EF445395</u>
<i>L. plurivora</i>	STE-U 4583	<i>Vitis vinifera</i>	AY343482	<u>EF445396</u>
<i>L. pontae</i>	CMM 1277	<i>Spondias purpurea</i>	KT151794	<u>KT151791</u>
<i>L. pseudotheobromae</i>	CBS116459	<i>Gmelina arborea</i>	EF622077	<u>EF622057</u>
<i>L. pseudotheobromae</i>	CGMCC3.18043	<i>Morus alba</i> Linn	KX499872	<u>KX499910</u>
<i>L. pyriformis</i>	CBS 121770	<i>Acacia mellifera</i>	EU101307	<u>EU101352</u>
<i>L. pyriformis</i>	CBS 121771	<i>Acacia mellifera</i>	EU101308	<u>EU101353</u>
<i>L. rubropurpurea</i>	WAC 12535	<i>Eucalyptus grandis</i>	DQ103553	<u>DQ103571</u>
<i>L. rubropurpurea</i>	WAC12536	<i>Eucalyptus grandis</i>	DQ103554	<u>DQ103572</u>
<i>L. sterculiae</i>	CBS 342.78	<i>Sterculia oblonga</i>	KX464140	<u>KX464634</u>
<i>L. subglobosa</i>	CMM3872	<i>Jatropha curcas</i>	KF234558	<u>KF226721</u>
<i>L. subglobosa</i>	CMM4046	<i>Jatropha curcas</i>	KF234560	<u>KF226723</u>
<i>L. thailandica</i>	CPC22795	<i>Mangifera indica</i>	KJ193637	<u>KJ193681</u>
<i>L. thailandica</i>	CPC 22755	<i>Phyllanthus acidus</i>	KM006433	<u>KM006464</u>
<i>L. theobromae</i>	CBS164.96	Unknown	AY640255	<u>AY640258</u>
<i>L. theobromae</i>	CBS111530	Unknown	EF622074	<u>EF622054</u>
<b><i>L. theobromae</i></b>	<b>ARM 300</b>	<i>Iphomoea batatas</i>		<u>MK511879</u>
<b><i>L. theobromae</i></b>	<b>ARM 349</b>	<i>Iphomoea batatas</i>		<u>MK511880</u>
<b><i>L. theobromae</i></b>	<b>URM 8037</b>	<i>Iphomoea batatas</i>	MK488035	<u>MK511881</u>
<b><i>L. theobromae</i></b>	<b>ARM 480</b>	<i>Iphomoea batatas</i>		<u>MK511892</u>
<b><i>L.theobromae</i></b>	<b>ARM 481</b>	<i>Iphomoea batatas</i>	MK488043	<u>MK511893</u>
<b><i>L. theobromae</i></b>	<b>ARM 482</b>	<i>Iphomoea batatas</i>	MK488044	<u>MK511894</u>
<i>L. venezuelensis</i>	WAC12539	<i>Acacia mangium</i>	DQ103547	<u>DQ103568</u>
<i>L. venezuelensis</i>	WAC 12540	<i>Acacia mangium</i>	DQ103548	<u>DQ103569</u>
<i>L. viticola</i>	UCD2553AR	<i>Vitis vinifera</i>	HQ288227	<u>HQ288269</u>
<i>L. viticola</i>	UCD2604MO	<i>Vitis vinifera</i>	HQ288228	<u>HQ288270</u>
<i>L. vitis</i>	CBS 124060	<i>Vitis vinifera</i>	KX464148	<u>KX464642</u>
<i>Macrophomina phaseolina</i>	CBS162.25	<i>Eucalyptus</i> sp.	KF531826	KF531803
<i>Macrophomina phaseolina</i>	CBS205.47	<i>Phaseolus vulgaris</i>	KF951622	KF951997
<i>Macrophomina phaseolina</i>	CBS227.33	<i>Zea mays</i>	KF531825	KF531804
<b><i>M. phaseolina</i></b>	<b>URM 8039</b>	<i>Iphomoea batatas</i>	MK488039	MK511887
<b><i>M. phaseolina</i></b>	<b>ARM 475</b>	<i>Iphomoea batatas</i>	MK488040	MK511888
<b><i>M. phaseolina</i></b>	<b>ARM 486</b>	<i>Iphomoea batatas</i>	MK488045	MK511895
<b><i>M. phaseolina</i></b>	<b>ARM 502</b>	<i>Iphomoea batatas</i>		MK511900
<b><i>M. phaseolina</i></b>	<b>ARM 515</b>	<i>Iphomoea batatas</i>	MK488052	MK511905
<i>M. pseudophaseolina</i>	CPC21420	<i>Vigna unguiculata</i>	KF951717	KF952088

<i>M. pseudophaseolina</i>	CPC21417	<i>Arachis hypogaea</i>	KF951791	KF952153
<i>M. pseudophaseolina</i>	CPC21502	<i>Hibiscus sabdarifa</i>	KF951797	KF952159
<b><i>M. pseudophaseolina</i></b>	<b>ARM 278</b>	<i>Iphomoea batatas</i>	MK488033	MK511876
<b><i>M. pseudophaseolina</i></b>	<b>ARM 280</b>	<i>Iphomoea batatas</i>	MK488034	MK511878
<b><i>M. pseudophaseolina</i></b>	<b>ARM 477</b>	<i>Iphomoea batatas</i>	MK488041	MK511889
<b><i>M. pseudophaseolina</i></b>	<b>URM 8040</b>	<i>Iphomoea batatas</i>	MK488042	MK511890
<b><i>M. pseudophaseolina</i></b>	<b>ARM 479</b>	<i>Iphomoea batatas</i>		MK511891
<b><i>M. pseudophaseolina</i></b>	<b>ARM 495</b>	<i>Iphomoea batatas</i>		MK511897
<i>M. euphorbiicola</i>	CMM4045 / CCMF-CNPA 278	<i>Jatropha gossypifolia</i>	KU058928	KU058898
<i>M. euphorbiicola</i>	CMM4134 / CCMF-CNPA 288*	<i>Ricinus communis</i>	KU058936	KU058906
<i>M. euphorbiicola</i>	CMM4145 / CCMF-CNPA 289	<i>Ricinus communis</i>	KU058937	KU058907
<i>M. euphorbiicola</i>	<b>ARM 497</b>	<i>Iphomoea batatas</i>	MK488047	MK511898
<i>M. euphorbiicola</i>	<b>ARM 498</b>	<i>Iphomoea batatas</i>	MK488048	MK511899
<i>M. euphorbiicola</i>	<b>URM 8041</b>	<i>Iphomoea batatas</i>	MK488049	MK511901
<i>M. euphorbiicola</i>	<b>ARM 504</b>	<i>Iphomoea batatas</i>		MK511902
<i>M. euphorbiicola</i>	<b>ARM 505</b>	<i>Iphomoea batatas</i>	MK488050	MK511903
<i>Neoscytalidium hyalinum</i>	CBS449.66	<i>Mangifera indica</i>	AY819727	EU144063
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	CBS499.66	<i>Mangifera indica</i>	AY819727	EU144063
<i>N. hyalinum</i>	PD104	<i>Ficus carica</i>	GU251107	GU251239
<i>N. hyalinum</i>	CMM4022	<i>Manihot esculenta</i>	KF369269	KF553902
<i>N. hyalinum</i>	CMM3895	<i>M.esculenta</i>	KF369265	KF553898
<b><i>N. dimidiatum</i></b>	<b>ARM 279</b>	<i>Iphomoea batatas</i>		MK511877
<b><i>N. dimidiatum</i></b>	<b>ARM 382</b>	<i>Iphomoea batatas</i>		MK511882
<b><i>N. dimidiatum</i></b>	<b>ARM 390</b>	<i>Iphomoea batatas</i>		MK511883
<b><i>N. dimidiatum</i></b>	<b>URM 8036</b>	<i>Iphomoea batatas</i>	MK488036	MK511884
<b><i>N. dimidiatum</i></b>	<b>ARM 400</b>	<i>Iphomoea batatas</i>	MK488037	MK511885
<b><i>N. dimidiatum</i></b>	<b>ARM 493</b>	<i>Iphomoea batatas</i>	MK488046	MK511896
<i>N.novahollandiae</i>	CBS122072	<i>Adansonia gibbosa</i>	EF585535	EF585581
<i>N.novahollandiae</i>	CBS122610	<i>Acacia synchronicia</i>	EF585536	EF585578

### 3.5 TESTES DE PATOGENICIDADE

Após a identificação das espécies fúngicas, foram selecionados um isolado representativo de cada espécie para as inoculações em raízes e ramas de batata-doce. Os isolados selecionados foram repicados para placas contendo meio de cultura BDA e incubadas por sete dias a uma temperatura de 25°C. Após os sete dias de crescimento fúngico os mesmos foram inoculados em frascos de Erlenmeyer contendo 50 gramas de arroz e 10ml de

água destilada esterilizada. O processo de inoculação em raízes de batata-doce sadias consistiu na realização de ferimentos superficiais na região central de raízes sadias com auxílio de uma agulha esterilizada, foi depositado um grão de arroz colonizado com o micélio fúngico na região central de cada raiz. Foram utilizadas cinco raízes sadias que serviram de repetições para cada tratamento e cinco repetições para servir de controle para o teste. Nas raízes que serviram de controle foi depositado apenas o grão de arroz esterilizado sem a presença de micélio fúngico. As raízes inoculadas foram incubadas em caixas plásticas em câmara úmida e mantidas em temperatura ambiente por sete dias.

Após o período de incubação o experimento foi avaliado pela observação da manifestação dos sintomas. As raízes foram cortadas longitudinalmente ao meio para a visualização e medição dos sintomas na parte interna. Fragmentos de tecidos sintomáticos com uma tamanho médio de  $1\text{cm}^2$  foram retirados e utilizados para isolamento indireto ou direto e os isolados recuperados foram comparados aos originalmente inoculados, para comprovação da patogenicidade.

Para o teste de patogenicidade em ramas de batata-doce, ramas sadias provenientes de uma plantação de batata-doce do município de Vitória de Santo Antão no Estado de Pernambuco foram plantados em potes de 500mL contendo solo autoclavado três vezes em autoclave a  $120^\circ\text{C}$  por 30 minutos, e mantidas em casa de vegetação por um período de 30 dias para o crescimento das mudas sadias. Os isolados de cada espécie previamente selecionados foram repicados para placas contendo meio de cultura BDA e incubadas por sete dias a uma temperatura de  $25^\circ\text{C}$ . Após os sete dias de crescimento fúngico, os mesmos foram inoculados em frascos de Erlenmeyer contendo 50 gramas de arroz e 10ml de água destilada esterilizada. A inoculação em ramas de batata-doce consistiu na realização de ferimentos superficiais na região basal das mudas com auxílio de um bisturi devidamente esterilizado, onde foi depositado um grão de arroz colonizado com o micélio fúngico de cada espécie selecionada. Foram utilizadas cinco mudas sadias que serviram de repetições para cada espécie fúngica e cinco repetições para servir de controle para o teste. Nas ramas que serviram de controle foi depositado apenas o grão de arroz esterilizado sobre os ferimentos. Após a inoculação, sacos plásticos foram colocados sobre as ramas e mantidos por 48 horas a fim de se estabelecer um ambiente de câmara úmida.

Após as inoculações, ocorreu o acompanhamento do surgimento dos sintomas por 15 dias e após esse período houve a avaliação do experimento. As plantas também foram

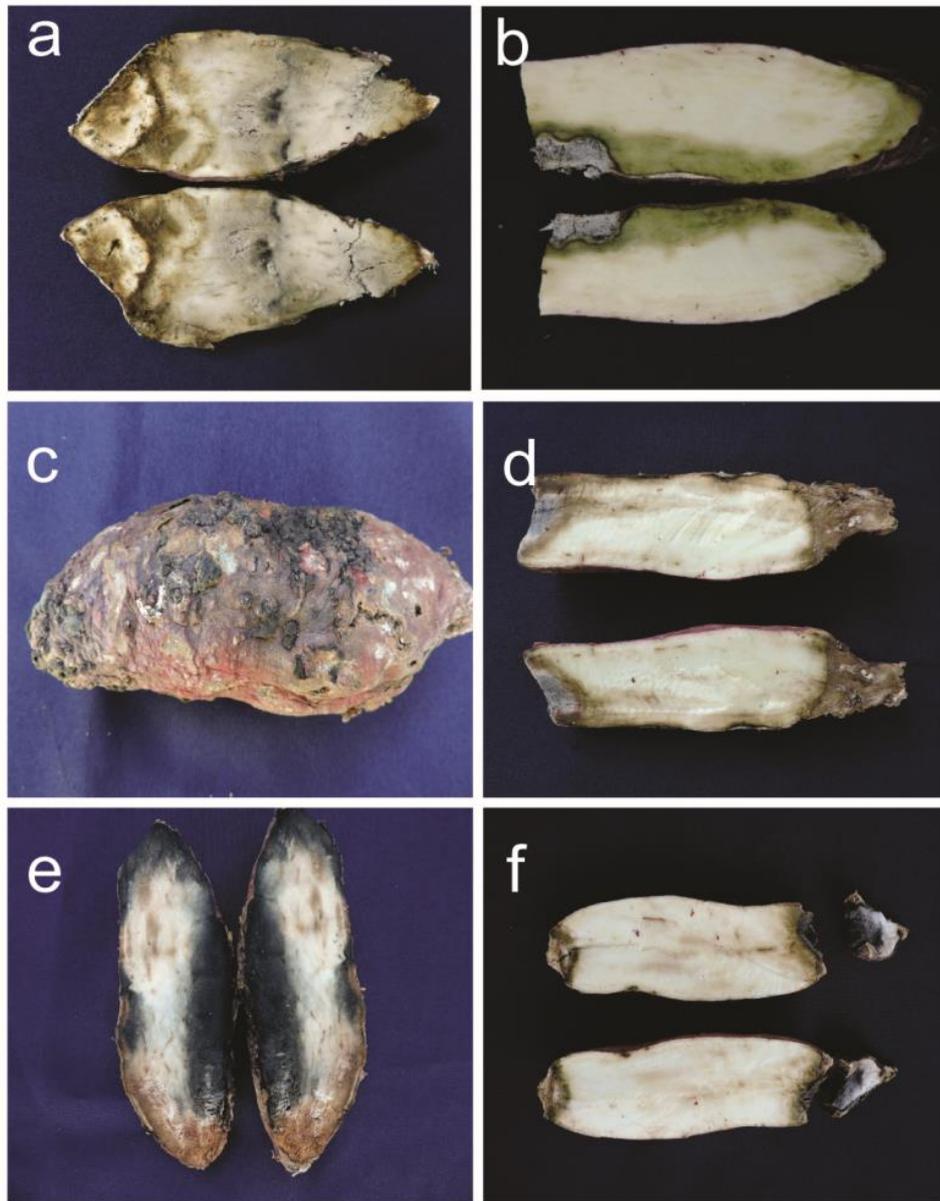
cortadas ao meio longitudinalmente para observação e mensuração das lesões internas. Fragmentos dos tecidos sintomáticos foram cortados com tamanho médio de 1cm<sup>2</sup> e utilizados para isolamento indireto e os isolados recuperados foram comparados aos originalmente inoculados, para comprovação da patogenicidade seguindo o Postulado estabelecido por Koch.

Os dados de agressividade foram primeiramente analisados pelo one-way ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste LSD Fisher ao nível de significância de 5%, utilizando o software MINITAB 18.

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 SINTOMATOLOGIA EM RAÍZES E RAMAS DE BATATA-DOCE**

As raízes tuberosas coletadas em feiras, supermercados e áreas no estado de Pernambuco e em áreas de cultivo no Estado de Minas Gerais com sintomas de podridão pós-colheita, apresentaram em geral sintomas característicos como presença de manchas com aspecto amarronzado na superfície externa das raízes e na parte interna foi possível observar a presença de lesões necróticas com coloração marrom a negras. Em alguns casos, apresentavam um crescimento micelial cinza esverdeado e frequentemente com a produção de estruturas reprodutivas dos fungos na casca (Picnídios). Para as lesões causadas pelo gênero *Macrophomina*, em algumas raízes pôde ser observado lesões escuras e levemente deprimidas na casca e na parte interna verificou-se lesões esbranquiçadas com grande quantidade de microescleródios. Esse mesmo fungo também foi isolado a partir de lesões necróticas marrom escuras na parte interna das raízes (Figura 1).



**Figura 1-** Sintomas de podridão de raízes de batata-doce observados em alguns locais de coleta (Recife-PE, Olinda-PE e Igarassu-PE). (a) e (b) Raízes de batata-doce com sintomas de podridão fúngica na parte interna, (c) Picnídios na parte externa da raiz de batata-doce, (d), (e) e (f) Raízes de batata-doce apresentando lesão necrótica interna.

As ramas coletadas em áreas de cultivo em regiões dos estados de Pernambuco e Minas Gerais com sintomas de podridão, apresentaram de modo geral lesões de coloração amarronzado e aspecto seco na parte externa e em seu interior foi possível observar a presença de lesões contínuas de coloração amarronzada no sistema vascular. As plantas apresentavam murcha e amarelecimento das folhas (Figura 2).



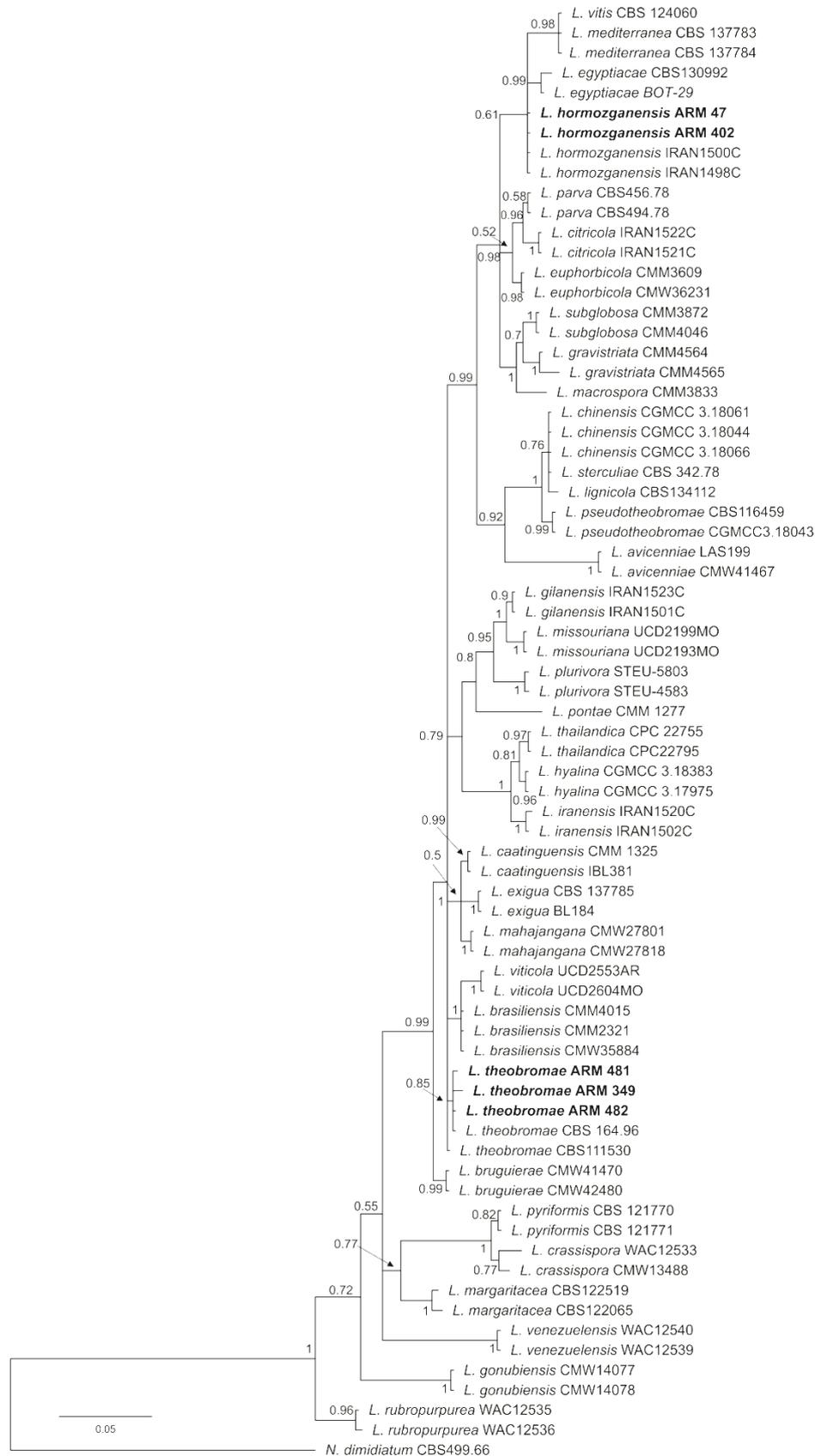
**Figura 2-** Sintomas de podridão de ramos de batata-doce observados em algumas áreas de cultivo (Janaúba-MG). (a) Área de cultivo de batata-doce, (b) plantas amarelecidas e pouco desenvolvidas, (c) (d), (e) e (f) Sintomas necróticos nas ramos e raízes de batata-doce em áreas de cultivadas.

#### 4.2 ANÁLISES FILOGENÉTICAS E SEQUENCIAMENTO DO DNA

Foram obtidos 33 isolados pertencentes à família Botryosphaeriaceae, identificados com base na morfologia, Blast das sequências de DNA e análises filogenéticas. As sequências geradas para a região parcial do fator de alongação (TEF1- $\alpha$ ) estão disponíveis no banco de dados (GenBank número de acesso MK511875 a MK511905). As sequências de TEF1- $\alpha$  e ITS obtidas foram de aproximadamente 300 e 580pb respectivamente. As sequências dos

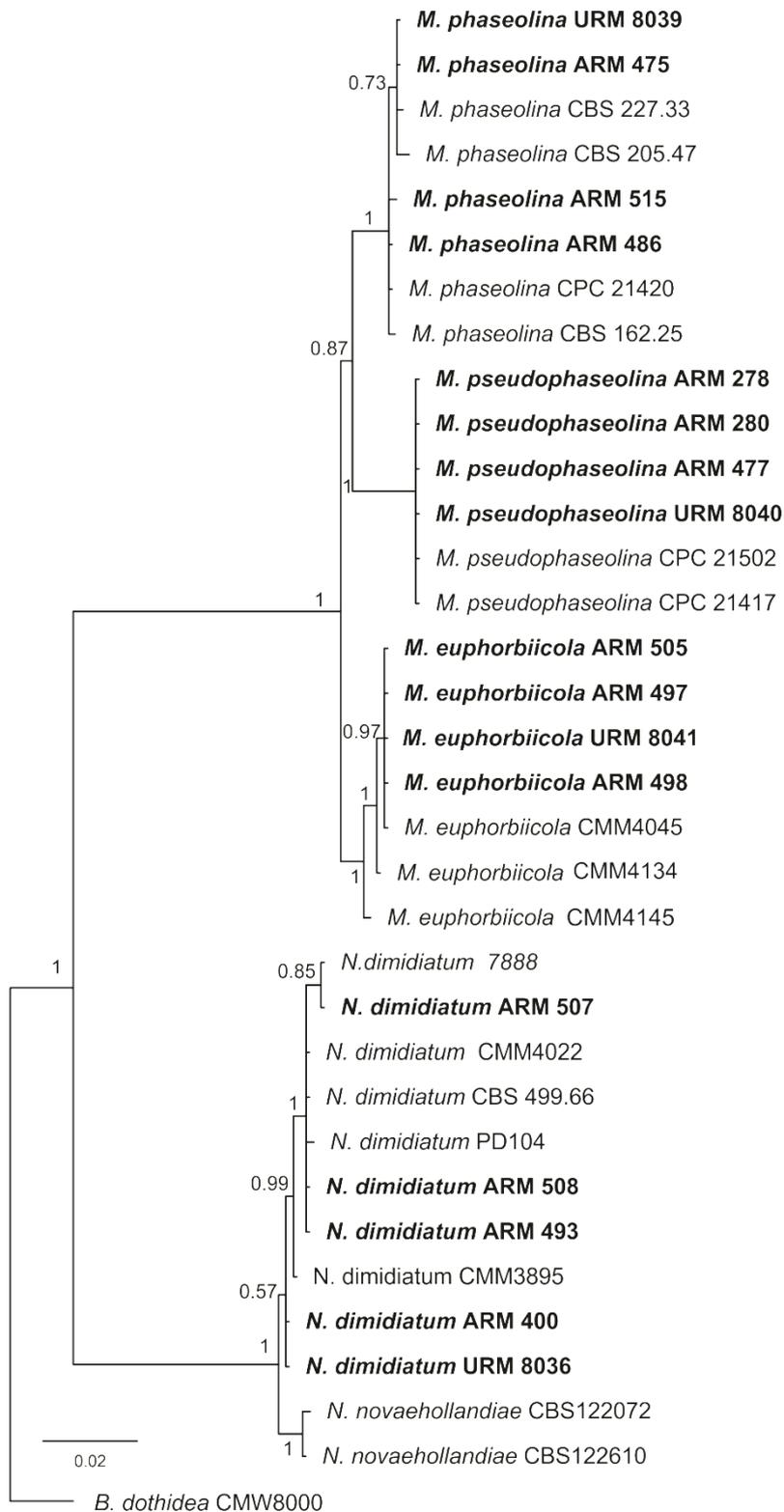
isolados coletados foram adicionadas ao conjunto de sequências de isolados dos tipos de *Lasiodiplodia*, *Macrophomina* e *Neoscytalidium* depositadas no GenBank para as análises filogenéticas. Se tratando da região gênica TEF1- $\alpha$ , os modelos de substituição estabelecidos foram HKY+G para *Lasiodiplodia*, HKY para *Neoscytalidium* e *Macrophomina*. Para a região gênica ITS, os modelos de substituição definidos foram GTR+I+G para *Lasiodiplodia* e HKY para *Neoscytalidium* e *Macrophomina*. Foram geradas duas árvores filogenéticas contendo a combinação das regiões gênicas TEF1- $\alpha$  e ITS, uma árvore com as sequências das espécies de *Lasiodiplodia* (Figura 3) e uma árvore utilizando as sequências das espécies de *Macrophomina* e *Neoscytalidium* (Figura 4).

A partir das árvores geradas foi possível observar a formação de dois clados de *Lasiodiplodia*, um clado de *Neoscytalidium* e três clados de *Macrophomina*. As sequências das espécies de *Lasiodiplodia* obtidas no presente estudo agruparam com duas espécies já conhecidas, a espécie *Lasiodiplodia theobromae* e a espécie *L. hormozganensis*. As sequências das espécies de *Macrophomina* e *Neoscytalidium* agruparam com quatro espécies já descritas, *Macrophomina phaseolina*, *M. pseudophaseolina*, *M. euphorbiicola* e *Neoscytalidium dimidiatum*. Do total de isolados coletados, 8 foram identificados como pertencentes ao gênero *Lasiodiplodia*, 16 ao gênero *Macrophomina* e nove ao gênero *Neoscytalidium*. Se tratando de espécimes obtidos no estudo, seis espécies pertencem à espécie *Lasiodiplodia theobromae*, duas à espécie *L. hormozganensis*, nove à espécie *Neoscytalidium dimidiatum*, seis à espécie *Macrophomina pseudophaseolina*, cinco à *M. phaseolina* e cinco à *M. euphorbiicola*. Após a realização das análises filogenéticas um isolado representativo de cada espécie foi depositado na Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco.



**Figura 3-** Árvore filogenética inferida a partir de análise bayesiana baseada em as sequências amplificadas de ITS e do TEF-1 $\alpha$  combinadas do gênero *Lasiodiplodia*. Probabilidades posteriores são indicadas acima dos nós.

A árvore foi enraizada com *Neoscytalidium dimidiatum* CBS499.66. As espécies obtidas neste estudo estão destacadas em negrito.



**Figura 4-** Árvore filogenética inferida a partir de análise bayesiana baseada em as seqüências da região ITS e TEF-1 $\alpha$  combinadas dos gêneros *Macrophomina* e *Neoscytalidium*. Probabilidades posteriores são indicadas

acima dos nós. A árvore foi enraizada com *Botryosphaeria dothidea* CMW8000 . As espécies obtidas neste estudo estão destacadas em negrito.

### 4.3 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA

Foram selecionados para a realização da caracterização morfológica isolados representativos de cada espécie identificada nas análises filogenéticas. Do total dos 33 isolados, nenhum deles apresentou formação de estruturas reprodutivas do seu estágio sexual. Em relação à fase assexual do seu ciclo, as espécies pertencentes ao gênero *Lasiodiplodia* e *Neoscytalidium* apresentaram formação de conídios em picnídios estomáticos quando foram submetidos ao processo de indução de esporulação com a utilização de meio de cultura A.A (Ágar Água) e pecíolos de *Clitoria fairchildiana*, autoclavados três vezes e incubados por cerca de quatro semanas, de acordo com a metodologia descrita por Machado et al., (2014). Os isolados pertencentes ao gênero *Macrophomina* não apresentaram formação de conídios nem em meio de cultura amplamente utilizado como o BDA, nem quando induzidos à esporulação com meio de cultura A.A com ramos de sobreiro. Sua identificação morfológica foi possível pela observação de microescleródios nas lâminas montadas, característica marcante deste gênero, e por meio das análises filogenéticas. As espécies de *Lasiodiplodia* encontradas apresentaram conídios hialinos, quando ainda imaturos, e quando maduros se tornam amarronzados, com paredes espessas, com um único septo central e estrias longitudinais. A espécie de *Neoscytalidium* encontrada forma cadeias de artroconídios no micélio, característica marcante para este gênero, e picnídios que produzem conídios hialinos quando imaturos, com formato que variavam de elipsoide a ovoide, inicialmente sem a presença de septos, e quando maduros apresentaram uma tonalidade que varia entre castanho-claro e amarronzado a castanho-escuro, apresentando dois septos, com a célula central com aspecto mais escura do que as células que se encontram nas extremidades.

#### 4.3.1 Descrição das espécies

##### - *Lasiodiplodia theobrame* (Pat) Griff. & Maubl

**Morfologia sexuada:** Não observado.

**Morfologia assexuada:** Picnídio estomático simples imerso no hospedeiro, tornando-se ereto quando sua parede está madura. Paráfises hialinas. Presença de conídios inicialmente hialinos. Quando maduros, passam a ser septados, com estrias longitudinais e pigmentados com cor amarronzada, medindo  $13-28,6 \times 10,4-15,6 \mu\text{m}$ , quando induzidos a esporulação no

meio de cultura A.A na presença de ramos de sombreiro. O fungo não apresentou esporulação em meio de cultura BDA.

**Características da cultura:** Micélio denso e aéreo com crescimento considerado rápido com coloração inicialmente cinza claro e posteriormente apresentando uma coloração mais escura, podendo variar de um tom cinza escuro a preto.

**Habitat:** Raízes de batata-doce com sintomas de podridão pós-colheita.

**Descrição do material coletado:** O material foi coletado em raiz de batata-doce com sintomas de podridão pós-colheita em uma feira livre na cidade de Garanhuns, PE, no dia 13 de dezembro de 2017. A mesma espécie também foi isolada de raiz de batata-doce com sintomas de podridão pós-colheita na cidade de Recife, no CEASA, PE e em uma feira livre na cidade de Olinda, PE.

**Nota:** De acordo com Philips et al., (2013), os conídios do tipo da espécie possuem tamanho  $21,5-31,5 \times 13-17 \mu\text{m}$ . No entanto, foram observados, no presente estudo, conídios menores ( $13-28,6 \times 10,4-15,6 \mu\text{m}$ ) do que relatado para o material tipo, mas ainda dentro do intervalo de medidas. A variação na morfologia pode ser explicada em decorrência da influência de fatores externos no ambiente onde o organismo se desenvolveu.

**- *Lasiodiplodia hormozganensis* Abdollahz., Zare & A.J.L. Phillips**

**Morfologia sexuada:** Não observado.

**Morfologia assexuada:** Picnídio estomático com coloração escura. Presença de paráfises hialinas, cilíndricas de paredes finas. Células conidiogênicas do tipo holoblásticas, hialinas. Conídios inicialmente hialinos, com formato que varia entre elipsoide a cilíndrico, arredondado no ápice. Quando maduros passam a ser septados, com estrias longitudinais e pigmentadas com cor castanho-escuro, medindo  $13-20,8 \times 7,8-10,4 \mu\text{m}$ . O fungo não apresentou esporulação em meio de cultura BDA.

**Características da cultura:** Micélio denso com crescimento considerado rápido com coloração inicialmente cinza claro e posteriormente apresentando uma coloração mais escura, podendo variar de cinza escuro a preto.

**Habitat:** Raízes de batata-doce com sintomas de podridão pós-colheita.

**Descrição do material coletado:** Coletado em raiz de batata-doce com sintomas de podridão pós-colheita na cidade de Recife, no CEASA, PE. A mesma espécie também foi isolada de raiz de batata-doce com sintomas de podridão pós-colheita em uma feira livre na cidade de Olinda, PE no dia 06 de julho de 2017.

**Nota:** De acordo com o estudo realizado por Phillips et al., (2013), os conídios possuem tamanho  $21,2-21,7 \times 12,4-12,6 \mu\text{m}$ . Todavia, neste trabalho, os conídios se apresentaram menores medindo  $(13-20,8 \times 7,8-10,4 \mu\text{m})$ . A variação morfológica encontrada pode ser explicada em decorrência da influência de fatores externos no ambiente de desenvolvimento do fungo.

**- *Neoscytalidium dimidiatum* (Penz) Crous & Slippers**

**Morfologia sexuada:** Não observado.

**Morfologia Assexuada:** O sinanamorfo apresenta artroconídios com 1 a 2 septos, liberados a partir da fragmentação da hifa, medindo  $4,24-9,54 \times 3,18-5,3 \mu\text{m}$ . Forma conídios hialinos de formato elipsoide, medindo  $4,24-13,78 \times 3,18-5,3 \mu\text{m}$ , em picnídios escuros formados em meio de cultura ágar-água sobrepostos com folhas de manga ou ramos de sombreiro esterilizados.

**Características da cultura:** O micélio inicialmente apresenta coloração branca e posteriormente encontra-se no tom verde escuro a preto.

**Habitat:** Raízes de batata-doce com sintomas de podridão pós-colheita.

**Descrição do material coletado:** Coletado em raiz de batata-doce com sintomas de podridão em um área de cultivo no estado de Minas Gerais, MG. O mesmo espécime fúngico também foi isolado de ramas de batata-doce com sintomas de podridão em um área de cultivo no estado de Minas Gerais, MG e em áreas de cultivo nas cidades de Alianças e Camocim de São Félix ambas situadas no estado de Pernambuco.

**Nota:** De acordo com Phillips et al., (2013), os conídios são do tipo holoblásticos, elipsoides, sem septos hialinos, quando maduros tornam-se septados de cor marrom escuro. A variação morfológica encontrada pode ser explicada em decorrência da influência de fatores externos no ambiente de desenvolvimento do fungo.

**- *Macrophomina phaseolina* Goid., Annali Sper**

**Morfologia sexuada:** Desconhecido.

**Morfologia Assexuada:** Ausência de esporulação em meio de cultura.

**Características da cultura:** Micélio denso com crescimento considerado rápido com coloração inicialmente cinza escuro e posteriormente apresentando uma coloração preta. Visualização de microesclerócios na cultura fúngica a partir do quarto dia de crescimento.

**Habitat:** Raízes de batata-doce com sintomas de podridão pós-colheita.

**Descrição do material coletado:** Coletado em raiz de batata-doce com sintomas de podridão pós-colheita na cidade de Recife, no CEASA, PE. O mesmo espécime fúngico também foi isolado de ramos de batata-doce com sintomas de podridão em um área de cultivo no estado de Minas Gerais, MG e em uma área de cultivo no município de Glória de Goitá situado no estado de Pernambuco.

**Nota:** Segundo Phillips et al., (2013), os conídios normalmente possuem forma elipsoide a ovoide, medindo em torno de  $20\text{--}24 \times 7\text{--}9 \mu\text{m}$ ; quando imaturos os conídios são hialinos, quando maduros tornam-se de cor amarronzada a escuro, com uma camada externa. No entanto, neste trabalho esta espécie não esporulou nas condições testadas.

**- *Macrophomina pseudophaseolina* Crous, Sarr & Ndiaye**

**Morfologia sexuada:** Desconhecido.

**Morfologia Assexuada:** Ausência de esporulação em meio de cultura.

**Características da cultura:** Micélio denso com crescimento considerado rápido com coloração inicialmente cinza claro e posteriormente apresentando uma coloração cinza escuro.

**Habitat:** Raízes de batata-doce com sintomas de podridão pós-colheita.

**Descrição do material coletado:** Coletado em raiz de batata-doce com sintomas de podridão pós-colheita na cidade do Recife, no CEASA, PE. O mesmo espécime fúngico também foi isolado de ramos de batata-doce com sintomas de podridão em um área de cultivo no estado de Minas Gerais, MG.

**Nota:** Segundo M.P. Sarr et al., (2014), os conidióforos foram reduzidos a células conidiogênicas, hialina, ramificada na base ou não, medindo  $(15\text{--}20 \times 5\text{--}8 \mu\text{m})$ . Porém, neste estudo esta espécie não apresentou conídios quando induzida a esporulação.

**- *Macrophomina euphorbiicola* A.R. Machado, D.J. Soares & O.L. Pereira**

**Morfologia sexuada:** Desconhecido.

**Morfologia Assexuada:** Ausência de esporulação em meio de cultura.

**Características da cultura:** Micélio denso com crescimento considerado rápido com coloração inicialmente cinza claro e posteriormente apresentando uma coloração cinza escuro.

**Habitat:** Raízes e ramos de batata-doce com sintomas de podridão pós-colheita.

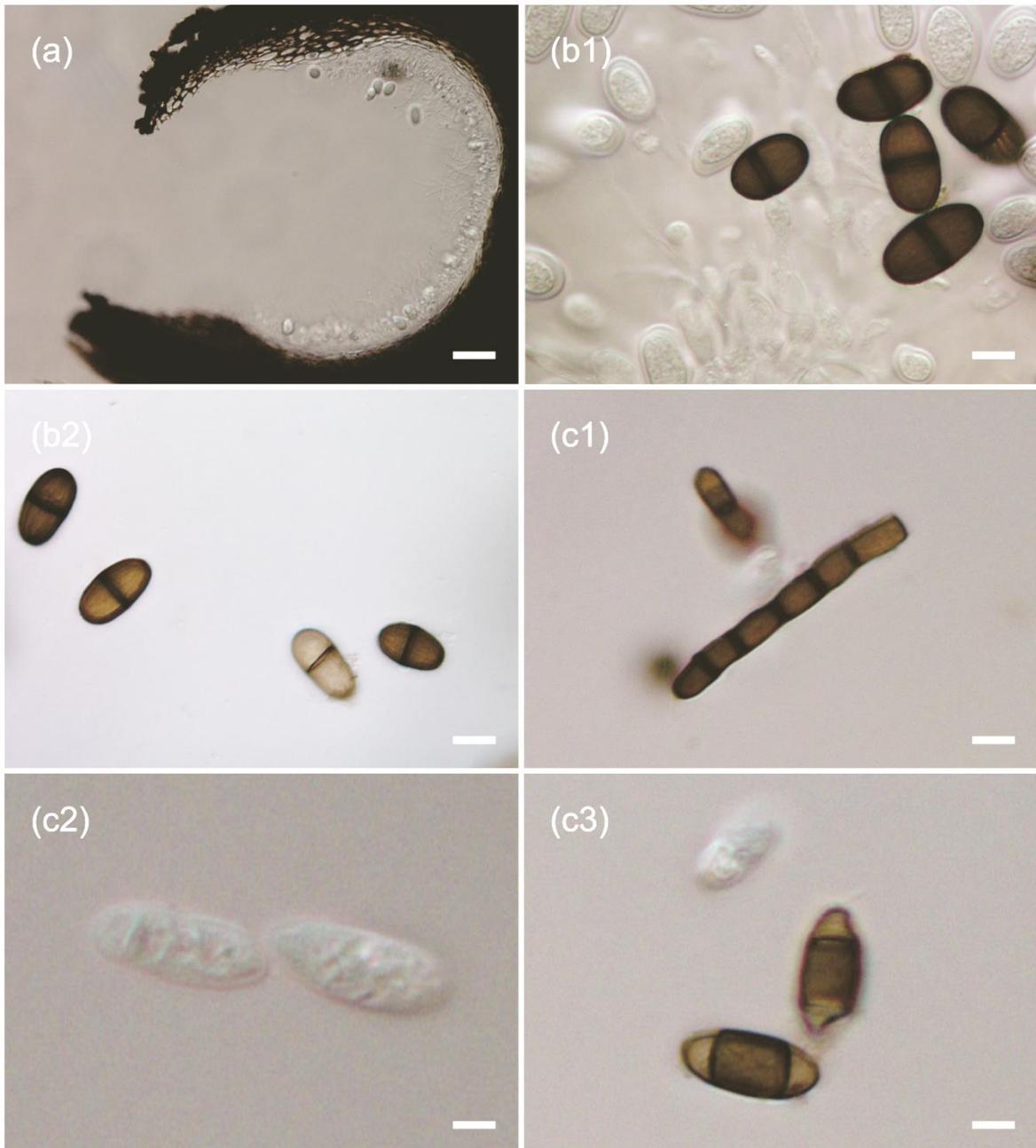
**Descrição do material coletado:** Coletado em raiz de batata-doce com sintomas de podridão pós-colheita na cidade do Recife, no CEASA, PE. O mesmo espécime fúngico também foi isolado de ramas de batata-doce com sintomas de podridão em um área de cultivo no estado de Minas Gerais, MG.

**Nota:** De acordo com Machado et al. (2018b), esta espécie difere filogeneticamente de outras espécies já conhecidas *Macrophomina phaseolina* e *Macrophomina pseudophaseolina*. No entanto, mesmo com todos os esforços realizados a fim de induzir a esporulação para a descrição dos caracteres morfológicos, as metodologias utilizadas não obtiveram êxito e a espécie foi proposta apenas com base em dados moleculares.

Com a finalidade de auxiliar na identificação morfológica das espécies encontradas foi realizada a comparação das características morfológicas das espécies de *Lasiodiplodia* e *Neoscytalidium* encontradas neste estudo e em estudos anteriores (Tabela 2). Os caracteres mais relevantes de cada espécie também foram representados (Figura 5).

**Tabela 2** - Comparação das características morfológicas das espécies de *Lasiodiplodia* e *Neoscytalidium* examinadas neste estudo com estudos anteriores.

Espécies	Conídio (µm)	Paráfases	Referência
<i>L. theobromae</i>	21 - 31 x 13 - 15,5µm	55 x 4µm	Alves <i>et al.</i> , 2008
	13-28,6 x 10,4-15,6µm	58 x 4µm	Este estudo
<i>L. hormozganensis</i>	18 - 24 x 11 - 14µm	83 x 4µm	Abdollahzadeh <i>et al.</i> 2010
	13-20,8 x 7,8-10,4µm	79,4 x 4µm	Este estudo
Espécies	Artroconídio (µm)	Conídios hialinos	Referência
<i>N. dimidiatum</i>	4-16,5 x 8,5µm	10-16(-21) x 3.5-6.5µm	Phillips <i>et al.</i> , 2013
	4,24-9,54 x 3,18-5,3µm	4,24-13,78 x 3,18-5,3µm	Este estudo
<i>N. novaehollandiae</i>	5,5-7,5 x 3,5-4,5µm		Pavlic <i>et al.</i> , 2008



**Figura 5-** (a) Conidioma, paráfases e células conidiogênicas da espécie *Lasiodiplodia theobromae* ARM 350. (b) *Lasiodiplodia hormozganensis* ARM 402. (c) *Neoscytalidium dimidiatum* ARM 399. (b1) Células conidiogênicas, conídios imaturos e conídios maduros. (b2) Conídios maduros. (c1) Artroconídios dispostos em cadeia. (c2) Conídios imaturos. (c3) Conídio do tipo sianamorfo. Barras de escala a= 20 μm, b1-b2,c1-c3=10 μm.

#### 4.5 TESTE DE PATOGENICIDADE E AGRESSIVIDADE DOS ISOLADOS

Os seis isolados representativos utilizados no experimento em raízes foram patogênicos e reproduziram os mesmos sintomas observados inicialmente. Foi observada a presença de lesões necróticas de aspecto escuro originadas no local onde o arroz contendo o micélio fúngico foi depositado e migrando para as laterais do ponto de inoculação. As cinco repetições do controle permaneceram sadias e não apresentaram lesões. Dentre as espécies inoculadas, a *Macrophomina pseudophaseolina* apresentou grandes lesões necróticas nas cinco repetições utilizadas. A espécie *Lasiodiplodia hormozganensis* apresentou pequenas lesões, embora tenha causado lesões em todas as cinco repetições. O isolado de *Neoscytalidium dimidiatum* apresentou lesões consideráveis nas cinco repetições. A espécie *Lasiodiplodia theobromae* foi patogênica, sendo capaz de causar pequenas lesões nas cinco repetições. A espécie *Macrophomina euphorbiicola* apresentou pequenas lesões embora tenha sido capaz de causar lesões nas cinco repetições, sendo, portanto, considerada patogênica. A espécie *Macrophomina phaseolina* foi capaz de causar grandes lesões necróticas nas cinco repetições (Figura 6).

No teste de patogenicidade em mudas, todas as espécies inoculadas causaram sintomas de doença. Não observou-se sintomas no tratamento controle. Apesar de não ter sido possível mensurar as lesões, devido à uma ausência de padrão das mesmas, e avaliar a agressividade dos isolados nesse experimento, os isolados das espécies *Macrophomina euphorbiicola* e *M. phaseolina* aparentemente provocaram as lesões mais extensas que seguiam na direção do ápice ou para a base do caule das plantas, causando a morte das mudas em todas as repetições. Foram observadas lesões necróticas em todas as repetições, bem como a presença de microescleródios na região necrosada.

O isolado da espécie *Macrophomina pseudophaseolina* causou morte nas três repetições. Nestas foram observadas a presença de necroses no sistema vascular e a presença de microescleródios na parte externa do caule das plantas. O isolado da espécie *Lasiodiplodia hormozganensis* causou morte de duas repetições, embora não tenha sido capaz de matar todas as repetições, todas elas possuíam necroses com aspecto escuro que tinham origem próximas ao local de inoculação e se propagava para o ápice do caule das plantas e apresentaram murcha e amarelecimento das folhas.

O isolado de *Neoscytalidium dimidiatum* causou morte de quatro das cinco repetições. Nestas foram observadas a presença de necroses de aspecto escuro e seco, destruindo todo o sistema vascular da planta a partir do ponto de inoculação seguindo em direção ao ápice. A espécie *Lasiodiplodia theobromae* foi patogênica, embora não tenha sido capaz de matar nenhuma repetição, no entanto, foi capaz de causar lesões necróticas no sistema vascular nas cinco repetições, além de murcha e amarelecimento das folhas (Figura 7).

Em relação a agressividade dos patógenos, não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ), com tamanhos de lesões variando de 0,22 cm (*L. hormozgranesis*) a 0,84 cm (*N. dimidiatum*). Dessa forma, não foi aplicado o teste de médias.



**Figura 6-** Resultado do teste de patogenicidade em raízes, (a) e (b) Controle (c) e (d)) *Macrophomina phaseolina*, (e) e (f) *Lasiodiplodia theobromae*, (g) e (h) *Macrophomina pseudophaseolina*, (i) e (j) *Macrophomina euphorbiicola*, (k) e (l) *Lasiodiplodia hormozganensis*, (m) e (n) *Neoscytalidium dimidiatum*.



**Figura 7-** Resultado do teste de patogenicidade em mudas de batata-doce. (a) Muda inteira, (b) e (c) Controle, (d) e (e) *Macrophomina phaseolina*, (f) e (g) *Lasiodiplodia theobromae*, (h) e (i) *Lasiodiplodia hormozganensis*, (j) e (k) *Macrophomina pseudophaseolina*, (l) e (m) *Neoscytalidium dimidiatum*, (n) e (o) *Macrophomina euphorbiicola*.

## 5 DISCUSSÃO

As raízes e ramos com sintomas de podridão constituem um aspecto fundamental para as perdas de produtividade desta cultura tão importante no âmbito econômico quando se é possível observar a presença dos sintomas característicos de podridão nas áreas de produção. Contudo, muitas vezes ocorre das raízes apresentarem os sintomas iniciais da doença como presença de lesões necróticas apenas na região interna da raiz e serem colhidas como sadias por não apresentarem sintomas aparentes na região externa da casca. Neste caso os sintomas se tornarão evidentes na etapa pós-colheita, quando serão consumidas.

A podridão de ramos pode ser um aspecto determinante para a disseminação das doenças radiculares, uma vez que as ramos representam o principal mecanismo propagativo utilizado para a cultura da batata-doce. No presente estudo, praticamente as mesmas espécies foram isoladas a partir de ramos e de raízes de batata-doce com sintomas de podridão, e assim, pode-se afirmar que ramos contendo o patógeno podem originar plantas doentes e produzir raízes já contendo o patógeno. Foi observado que praticamente as mesmas espécies encontradas no estado de Pernambuco foram também encontradas no estado de Minas Gerais, dado este que favorece que a distribuição e a ocorrência destas espécies ocorrem em diferentes regiões.

Os fungos pertencentes à família Botryosphaeriaceae são conhecidos por serem patógenos necrotróficos responsáveis por causar lesões necróticas em seus hospedeiros. Em batata-doce as espécies foram capazes de produzir lesões necróticas de aspecto enegrecido em ramos e raízes. No entanto, os sintomas apresentados podem ser causados por outros patógenos (MACHADO et al., 2018a). A podridão de ramos e raízes de batata-doce também é ocasionada por um complexo de patógenos como: *Diaporthe destruens*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Ceratocystis fimbriata* e *Fusarium solani* que podem ou não estar atuando em sinergia. Dessa forma torna-se necessário a realização de análises mais acuradas para a determinação correta destes patógenos nas áreas de produção.

Analisando os dados obtidos por meio da utilização de ferramentas filogenéticas, a fim de realizar a identificação das espécies encontradas, constatou-se a presença de seis espécies pertencentes à família Botryosphaeriaceae causando sintomas de podridão em batata-doce foram elas: *Lasiodiplodia theobromae*, *L. hormozganensis*, *Neoscytalidium dimidiatum*, *Macrophomina phaseolina*, *M. pseudophaseolina* e *M. euphorbiicola*.

*Lasiodiplodia theobromae*, é uma espécie bastante comum e disseminada no mundo, sendo associada a diversas doenças em uma elevada gama de hospedeiros. Estudos prévios comprovaram com o auxílio de sequências de DNA, que esta espécie em questão na verdade trata-se de um complexo de espécies crípticas, onde diversas outras espécies já foram descritas (ALVES et al. 2008; PHILLIPS et al. 2013). Dessa forma, muitas das associações com hospedeiros devem ser revisadas. Neste estudo, esta espécie foi a que possuiu a maior quantidade de espécimes coletados, sendo encontrada em três áreas distintas do estado de Pernambuco, o que comprova a sua capacidade de disseminação, uma vez que estava presente em regiões distintas do estado, podendo ainda estar relacionada com diversos outros hospedeiros. Já tendo sido relatada causando podridão de frutos e podridão de raízes de mandioca no Brasil.

*Lasiodiplodia hormozganensis*, foi descrita pela primeira vez no Irã causando podridão de frutos da *Mangifera indica* (ABDOLLAHZADEH et al. 2010). No Brasil já foi relatada causando podridão dos frutos de mamão e Videira (MARQUES et al., 2013; CORREIA et al., 2016). No trabalho de Marques et al. (2013), os isolados de *Lasiodiplodia hormozganensis* foram os que apresentaram capacidade de causar maiores lesões em ramos e frutos de manga. Ao contrário dos resultados obtidos no estudo de Marques et al. (2013) no que diz respeito a agressividade dos isolados de *Lasiodiplodia hormozganensis*, no presente estudo não houve diferença no tamanho das lesões entre as espécies encontradas.

*Neoscytalidium dimidiatum* (Penz) Crous & Slippers já foi relatada causando podridão radicular em uma elevada gama de hospedeiros, em diversas localidades do mundo. Sendo o agente causal da podridão da Pitaya (*Hylocereus undatus* e *H. polyrhizus*) em Taiwan (CHUANG et al., 2012) e da ferrugem e gomose em citros na Itália (POLIZZI et al., 2009). Esta espécie também foi isolada como endófito em tecidos de plantas na Austrália (Pavlic et al., 2008) o que pode indicar que os fungos desta família podem estar presentes nos tecidos vegetais em estado latente e que podem ser patogênicos quando ocorre um desequilíbrio que resulte em uma situação de estresse (SLLIPERS E WINGFIELD 2007). No Brasil esta espécie foi relatada pela primeira vez, causando podridão radicular de *Jatropha curcas* (pinhão-manso) em Minas Gerais (MACHADO et al., 2012). No nordeste do Brasil esta espécie foi associada a desintegração e podridão da *Mangifera indica* (manga), sendo isolada de galhos de manga com podridão e cancro, sendo capaz de causar podridão também nos frutos de manga, no estudo em questão a espécie *Neoscytalidium dimidiatum* foi a mais

agressiva quando testada em frutos de manga (MARQUES et al., 2013). Recentemente esta espécie foi relatada pela primeira vez causando podridão radicular em batata-doce no Brasil (MELLO et al., 2018).

Se tratando das espécies do gênero *Macrophomina*, estudos recentes indicam a existência de espécies crípticas dentro dos isolados de *Macrophomina* que no passado eram descritas como pertencentes à espécie *Macrophomina phaseolina* (MACHADO et al., 2018b). Embora as espécies pertencentes ao gênero *Macrophomina* sejam bastante semelhantes morfológicamente, já foi comprovado pelo estudo de Sarr et al. (2014) e Machado et al. (2018b) que a utilização de ferramentas moleculares tem sido fundamental para a determinação das espécies pertencentes a este gênero. As três espécies de *Macrophomina* que existem até o momento (*Macrophomina phaseolina*, *M. pseudophaseolina* e *M. euphorbiicola*) foram encontradas no presente estudo associado a podridões de ramas e raízes de batata doce.

*Macrophomina pseudophaseolina* foi a espécie mais frequente no presente estudo, seguido das espécies *Macrophomina euphorbiicola* e *Macrophomina phaseolina*. Este dado pode estar relacionado com a disposição destas espécies nas regiões do Brasil e são de fundamental importância para o conhecimento da distribuição geográfica da espécie *Macrophomina euphorbiicola* que foi recentemente descrita pela primeira vez em um trabalho de Machado et al. (2018b) causando podridão de carvão em espécies oleaginosas no Brasil.

*Macrophomina phaseolina* possui uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrada em diversas regiões do Brasil e no mundo. Além do seu relato causando podridão do carvão no Brasil, a *Macrophomina phaseolina* também já foi associada a outros hospedeiros como o feijão-caupi, onde foi responsável por causar podridão nas sementes do feijão (ATHAYDE et al., 1998), sendo o agente causal da podridão do carvão em feijão-fava (SOUSA et al., 2017). Em soja interferiu diretamente em sua produção causando podridão em grandes áreas de cultivo (ALMEIDA et al., 2014). Na região Centro-Oeste nos Estados de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul foi encontrada causando podridão seca do milho (FERNANDES et al., 1990), sendo responsável por um alto índice de perdas em áreas de plantio desta cultura tão importante economicamente para esta região. Em relação a patogenicidade, a espécie em questão foi considerada patogênica, por ser capaz de causar lesões consideradas extensas em

todas as repetições utilizadas no teste de ramas e raízes de batata-doce, foi observada a presença de lesões necróticas e presença de microescleródios, principalmente nas ramas.

*Macrophomina pseudophaseolina* foi relatada pela primeira vez no Brasil causando podridão do carvão em culturas oleaginosas como o amendoim (*A. hypogaea*), algodão (*G. hirsutum*), mamona (*R. communis*) e *Jatropha curcas* (MACHADO et al., 2018b). Até pouco tempo atrás este fungo só havia sido relatado causando podridão em algumas culturas no Senegal como o feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) (SARR et al. 2014). No presente trabalho esta espécie foi encontrada relacionada à podridão de ramas e raízes de batata-doce pós-colheita.

A espécie *Macrophomina euphorbiicola* foi descrita recentemente pela primeira vez como o agente causal da podridão do carvão em culturas oleaginosas no Brasil (MACHADO et al., 2018b). Pelo fato de ter sido descrita a pouco tempo, ainda não se tem relatos da espécie causando doenças em outros hospedeiros. Desse modo, a sua distribuição geográfica ainda não se encontra muito bem estabelecida, sendo necessária a obtenção de um número maior de isolados de diversos hospedeiros e de regiões diferentes para a obtenção desses dados.

Se tratando dos substratos onde os espécimes foram encontrados, foi observado que as espécies *Lasiodiplodia theobromae* e *L. hormozganensis* foram isoladas apenas nas raízes de batata-doce, contudo, ambas foram patogênicas em ramas quando testadas, o que serve de indício que essas espécies também podem ser encontradas causando podridão em ramas de batata-doce. Das espécies do gênero *Macrophomina* encontradas no estudo, *Macrophomina phaseolina*, *M. pseudophaseolina* e *M. euphorbiicola*, foram isoladas em ramas e raízes de batata-doce o que comprova a sua disseminação e presença como um dos agentes causais da podridão das ramas e raízes de batata-doce, bem como a espécie *Neoscytalidium dimidiatum* que também foi isolado de ramas e raízes.

Em relação à agressividade apresentada por cada espécime obtida no presente estudo, apesar de todas as espécies terem sido patogênicas e capazes de reproduzir os sintomas observados em campo e na realização das coletas, foi observado que os valores de agressividade variaram bastante entre os tratamentos e desse modo contribuiriam para o aumento do erro estatístico. Assim não obteve-se diferença estatística entre os tratamentos, mesmo alguns causando morte das plantas. Para a resolução desta problemática, futuramente mais isolados de cada espécie serão inseridos em um novo experimento a fim de se obter um

número maior de repetições e dessa forma possibilitar uma melhor diferenciação dos tratamentos e confirmar o grau de agressividade de cada espécie em ramas e raízes de batata-doce.

Assim, as espécies *Lasiodiplodia hormozganensis*, *Neoscytalidium dimidiatum*, *Macrophomina phaseolina*, *M. pseudophaseolina* e *M. euphorbiicola* são relatadas pela primeira vez como um dos agentes causais de podridão em ramas e raízes de batata-doce no Brasil. Diante do que foi exposto no presente trabalho ficou evidenciado o papel das espécies em questão e sua associação com os sintomas de podridão de raízes e ramas de batata-doce. Visto que a maioria das espécies encontradas representam novos relatos para o Brasil. Essa informação servirá para ressaltar a atuação destes patógenos frente as culturas de grande importância como a batata-doce e a capacidade que os mesmos possuem de causar grandes perdas no âmbito econômico.

No entanto, torna-se necessário que outros estudos sejam realizados com a finalidade de se obter dados de outras localidades do Brasil e do mundo acerca da associação destas espécies com este e demais hospedeiros, para o maior conhecimento acerca da diversidade e distribuição geográfica destes patógenos no Brasil e no mundo, bem como a criação de medidas de controle eficientes que visem a erradicação destas doenças.

## 6 CONCLUSÃO

- As espécies pertencentes a família Botryosphaeriaceae: *Lasiodiplodia theobromae*, *L. hormozganensis*, *Macrophomina phaseolina*, *M. pseudophaseolina*, *M. euphorbiicola* e *Neoscytalidium dimidiatum* estão relacionadas com a podridão radicular e das ramas da cultura da batata-doce no Brasil;
- Este é o primeiro relato das espécies: *Lasiodiplodia hormozganensis*, *Macrophomina pseudophaseolina*, *M. euphorbiicola* e *Neoscytalidium dimidiatum* como causadores de podridões radiculares e das ramas de batata-doce no mundo.
- Este é o primeiro relato das espécies: *Lasiodiplodia hormozganensis*, *Macrophomina phaseolina*, *M. pseudophaseolina*, *M. euphorbiicola* e *Neoscytalidium dimidiatum* como causadores de podridões radiculares e das ramas de batata-doce no Brasil;

- Todas as espécies obtidas são patogênicas em ramas e raízes de batata-doce.

## REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHZADEH, J. et al. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 25, p. 1-10, dez. 2010.
- A CULTURA DA BATATA-DOCE EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA. Centro Nacional Pesquisa de Hortaliças. Brasília **EMBRAPA-SPI ..94 p. ; 16 em. (Coleção Plantar; 30)**, v. 1, p. 9-89. 1995.
- ADISA, V. A. Storage roots of banana fruits in some Nigerian markets. **Fitopatologia brasileira**, v. 8, p. 29-36.1983.
- ADISA, V. A. et al. Fruit rot diseases of guava (*Psidium guajava*) in Nigeria. **Indian Phytopathology**, v. 38, n. 3, p. 427-430, 1985.
- AGRANUAL.2004. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultório e Comércio.
- AHUMADA, Rodrigo. **Pathogens in commercial Eucalyptus plantations in Chile, with special reference to *Mycosphaerella* and *Botryosphaeria* species**. 2003.Tese de Doutorado. University of Pretoria, Pretoria.
- ALVES, Artur et al. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. **Fungal diversity**, v. 28, p. 1-13, jan.2008.
- ALMEIDA, A. M. R. et al. *Macrophomina phaseolina* em soja. **Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E)**, v.1, p. 6-30, mai. 2014.
- ATHAYDE SOBRINHO, C. et al. Microrganismos associados as sementes de feijão caupi com ênfase á presença de *Macrophomina phaseolina*. **Embrapa Meio-Norte-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, p. 1-8, mar.1998.
- AUSTIN, Daniel F. The taxonomy, evolution and genetic diversity of sweet potatoes and related wild species. **Exploration, maintenance, and utilization of sweet potato genetic resources**, p. 27-60, 1988.
- BARRADAS, Carla et al. Diversity and potential impact of Botryosphaeriaceae species associated with Eucalyptus globulus plantations in Portugal. **European Journal of Plant Pathology**, v. 146, n. 2, p. 245-257, 2016.
- BOEREMA, G. H.; LOERAKKER, W. M.; HAMERS, Maria EC. Contributions towards a monograph of Phoma (Coelomycetes)—III. 2. Misapplications of the type species name and the generic synonyms of section *Plenodomus* (Excluded species). **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 16, n. 2, p. 141-189, 1996.

- BOSCO, J. et al.. Cultura da Batata-Doce. **Embrapa Hortalias, Sistemas de Producao**, 6. URL <http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/batatadoce/index.htm>. 2004.
- CARDOSO, Adriana D. et al. Avaliação de clones de batata-doce em Vitória da Conquista. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 4, p. 911-914, out-dez.2005.
- CARDOSO, J. E. et al. First report of black branch dieback of cashew caused by *Lasiodiplodia theobromae* in Brazil. **Plant Disease**, v. 86, n. 5, p. 558-558, mai.2002.
- CARDOSO, José Emilson; VIANA, Francisco Marto Pinto; MARTINS, Marlon Vagner Valentim. Doenças causadas por fungos da família Botryosphaeriaceae em cajueiro. **Embrapa Agroindústria Tropical-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2018.
- CASTELLANI, A. A maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v. 70, n. 8, p. 181. 1967.
- CHITARRA, M.I.F. Pós-Colheita de Frutas e Hortaliças - **Fisiologia e Manuseio**. Lavras: ed. UFLA, v.2, p. 783. 2005.
- 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, jun.2012.
- CIPRES (Cyberinfrastructure for Phylogenetic Research), 2018. The CIPRES Science Gateway V.3.3. [<http://www.phylo.org/index.php/>] Acessado em 10 de abril de 2018.
- CLARK, Christopher A. et al. **Compendium of sweet potato diseases**. American Phytopathological Society, 1988.
- CLARK, Christopher A. et al. A incidência de podridão final e necrose interna na batata-doce é afetada pela desfolha do cultivar, da cura e do ethephon. **HortTechnology** , v. 23, n. 6, p. 886-897, 2013.
- COELHO, R.S.B et al. Doenças da Batata-Doce. In: Kimati, H, Amorim, L, Rezende, JAM, Bergamin Filho, A, Camargo, LEA (eds). **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**. São Paulo: Ed. Ceres. v. 2, p. 144-149, 2005.
- COELHO, R.S.B. et al. Doenças da batata-doce. In: kimati, h., amorim, l., rezende, j. A. M., bergamin filho, a., camargo, l. E. A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. Ouro Fino: Agronômica Ceres, v. 5, p. 149-158, 2016.
- CORREIA, Kamila C. et al. Phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of table grape in the main Brazilian exporting region. **Plant pathology**, v. 65, n. 1, p. 92-103, fev.2016.
- CROUS, Pedro W. et al. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Studies in mycology**, v. 55, p. 235-253, 2006.

- DA SILVA, Washington L.; CLARK, Christopher A. Infection of sweet potato by *Fusarium solani* and *Macrophomina phaseolina* prior to harvest. **Plant disease**, v. 97, n. 12, p. 1636-1644, jul.2013.
- DE QUEIROGA, Roberto Cleiton Fernandes et al. Fisiologia e produção de cultivares de batata-doce em função da época de colheita. **Hortic. Bras.**, v. 25, n. 3, p 371-374, jul-set.2007.
- DENMAN, Sandra et al. Circumscription of *Botryosphaeria* species associated with Proteaceae based on morphology and DNA sequence data. **Mycologia**, v. 95, n. 2, p. 294-307, ago.2003.
- EDGAR, Robert C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, mar.2004.
- FAOSTAT. 2001. <http://faostat.fao.org/> .Acessado em 20 de fevereiro de 2001.
- FAOSTAT 2002, <http://faostat.fao.org/>
- FAOSTAT 2006. FAO Statistical Databases. URL <http://apps.fao.org/>
- FAOSTAT, 2008. FAO Statistical Database. URL <http://faostat.fao.org/>
- FERNANDES, F. T.; BALMER, E. Situação das doenças de milho no Brasil. **Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, v. 2, n. 17, p. 14, jun.1990.
- LOEBENSTEIN, Gad; THOTTAPPILLY, George (Ed.). **The sweet potato**. Springer Science & Business Media, 2009.
- GURE, Abdella; SLIPPERS, Bernard; STENLID, Jan. Seed-borne *Botryosphaeria* spp. from native Prunus and Podocarpus trees in Ethiopia, with a description of the anamorph *Diplodia rosulata* sp. nov. **Mycological research**, v. 109, n. 9, p. 1005-1014, set.2005.
- HALL, MELVIN R.; PHATAK, SHARAD C. Sweet potato: *Ipomoea batatas* (L) Lam. In: **Genetic improvement of vegetable crops**. Pergamon, p. 693-708, 1993.
- HALL, T. 2014. BioEdit v7.0.9: Biological sequence alignment editor for Win95/98/2K/XP/7. Disponível em: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit.html>. Acesso em: Julho de 2014.
- HALFELD-VIEIRA, Bernardo A.; NECHET, K. L. Queda de frutos em coqueiro causada por *Lasiodiplodia theobromae* em Roraima. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 203-203, mar-abr.2005.
- HILL, Walter A.; BONSI, Conrad K.; LORETAN, Philip A. Sweet potato technology for the 21st century. 1992.
- HUANG, J. C.; SUN, M1. Genetic diversity and relationships of sweet potato and its wild relatives in *Ipomoea* series *Batatas* (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, n. 7, p. 1050-1060, 2000.

HUANG, L. F. et al. First report of *Lasiodiplodia theobromae* causing a stem canker on sweet potato in China. **Plant Disease**, v. 100, n. 9, p. 1948-1948, jun.2016.

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, jul.2014.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística .2012. Produção Agrícola Municipal 2010: informações sobre culturas temporárias. Rio de Janeiro: IBGE. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/.bda/pesquisas/pam/default.asp>>. Acessado em: 02 de fevereiro de 2012.

IBGE ,2015. Censo agropecuário.Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=pe&tema=lavouratemporaria2015>. Acessado em 28 de março de 2017.

JACOBS, Karin et al. *Leptographium wingfieldii* introduced into North America and found associated with exotic *Tomicus piniperda* and native bark beetles. **Mycological research**, v. 108, n. 4, p. 411-418, abr.2004.

KRANZ, J., SCHUMUTTERUR, H., Koch, W. Diseases pest and weeds in tropical crops. Berlin: Verlag Paul Parey, p. 666. 1977.

KUMAR, Sudhir; STECHER, Glen; TAMURA, Koichiro. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, mar.2016.

MACHADO, A. R. et al. First report of collar and root rot of physic nut (*Jatropha curcas*) caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in Brazil. **Plant disease**, v. 96, n. 11, p. 1697-1697, nov.2012.

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

MACHADO, A.R., DE QUEIROZ BRITO, A.C., DE MELO, J.F. **Podridões fúngicas de raízes tuberosas no Nordeste brasileiro: etiologia e manejo. Desafios do Manejo de Doenças Radiculares Causadas por Fungos**, (Eds) Ueder Pedro Lopes, Sami Jorge Michereff. – 1. ed. - Recife: EDUFRPE, v.1, p 95-107, 2018.

MACHADO, A.R et al. Bayesian analyses of five gene regions reveal a new phylogenetic species of *Macrophomina* associated with charcoal rot on oilseed crops in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 153, n. 1, p. 89-100, 2019.

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

MASSAROTO, J.A et al. Desempenho de clones de batata-doce Behavior of roots of sweet potato clones. **Ambiência**, v. 10, n. 1, p. 73-81, 2014.

- MBENOUN, M. et al. Dieback due to *Lasiodiplodia theobromae*, a new constraint to cocoa production in Cameroon. **Plant Pathology**, v. 57, n. 2, p. 381-381, mar.2008.
- MELLO, J. F. et al. First Report of *Neoscytalidium dimidiatum* Causing Root Rot in Sweet Potato in Brazil. **Plant Disease**, v. 103, n. 2, p. 373-374, dez.2018.
- MENDES, M. A. S.; DA SILVA, V. L.; DIANESE, J. C. Fungos em Plants no Brasil. Embrapa-SPI and et al. In: **Embrapa-Cenargen**. p. 555,1998.
- MICHEREFF, Sami J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, Maria. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Universidade Federal e Rural de Pernambuco, 2005.
- MICHEREFF, Sami J. et al. Importância dos patógenos e das doenças radiculares em solos tropicais. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**, v. 1, p. 1-18, 2005.
- NETTO, Mariote SB 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**, v. 121, n. 4, p. 437-451, fev.2017.
- PAVLIC, D. et al. Botryosphaeriaceae occurring on native *Syzygium cordatum* in South Africa and their potential threat to Eucalyptus. **Plant Pathology**, v. 56, n. 4, p. 624-636, 2008.
- PEREIRA, R. B.; FERNANDES, F. R.; PINHEIRO, J. B. Recomendações para manejo da podridão-do-pé em batata-doce. **Embrapa Hortaliças-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2011.
- PINHO, Danilo B. et al. An efficient protocol for DNA extraction from *Meliolales* and the description of *Meliola centellae* sp. nov. **Mycotaxon**, v. 122, n. 1, p. 333-345, 2013.
- PINHO, D. B.; MACHADO, A. R.; FIRMINO, A. L. Princípios e métodos para identificação molecular de fungos. **Métodos em Fitopatologia. 2ª ed. Viçosa: Editora UFV**, v.2, p. 389-422, 2016.
- PHILLIPS, A. J. L. et al. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. **Studies in mycology**, n.30, v. 76, p. 51-167, set.2013.
- PHILLIPS, Alan JL et al. Families in Botryosphaeriales: a phylogenetic, morphological and evolutionary perspective. **Fungal diversity**, v. 94, n. 1, p. 1-22, 2019.
- POLIZZI, G. et al. First report of shoot blight, canker, and gummosis caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on citrus in Italy. **Plant Disease**, v. 93, n. 11, p. 1215-1215, nov.2009.
- POSADA, David; BUCKLEY, Thomas R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. **Systematic biology**, v. 53, n. 5, p. 793-808, out.2004.
- RAMBAUT, A. 2009. FigTree 1.2.2. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>. Acesso em abril de 2014.

RANNALA, Bruce; YANG, Ziheng. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. **Journal of molecular evolution**, v. 43, n. 3, p. 304-311, set.1996.

RODRIGUES, REGIANE. **Caracterização morfológica e patológica de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., agente causal das podridões de tronco e raízes da videira**. 2003. Tese de Doutorado. Dissertation (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical)–Instituto Agronômico de Campinas.

RONQUIST, Fredrik; HUELSENBECK, John P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, dez.2003.

SARR, Mame P. et al. Genetic diversity in *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 53, n. 2, p. 250, 2014.

SCOTT, Gregory J.; ROSEGRANT, Mark W.; RINGLER, Claudia. Global projections for root and tuber crops to the year 2020. **Food policy**, v. 25, n. 5, p. 561-597, 2000.

SILVA, J.B.C. DA LOPES, C.A., MAGALHÃES J.S. Cultura da batata doce. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2004. (**Embrapa Hortaliças. Sistemas de produção,6**). Disponível em <http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/batatadoce/index.htm>. 2014.

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

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

SMITH, Hendrik. **Biology of Botryosphaeria dothidea and Sphaeropsis sapinea as endophytes of Eucalypts and Pines in South Africa**. 2001. Tese de Doutorado. University of the Free State.

SOUSA, E. S. et al. First report of *Fusarium falciforme* (FSSC 3+ 4) causing root rot in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 11, p. 1954-1954, 2017.

SOUZA, V. C.; LORENZI, Harri. Botânica sistemática: guia ilustrativo para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. **Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum**, 2008.

STANOSZ, G. R. et al. Water stress and *Sphaeropsissapinea* as a latent pathogen of red pine seedlings. **New Phytologist**, v. 149, n. 3, p. 531-538, mar.2001.

SWART, Wijnand J.; WINGFIELD, Michael J. Biology and control of *Sphaeropsis sapinea* on pinus species in South America. **detail**, v. 30, p. 40, 1991.

TAYLOR, John W. et al. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal genetics and biology**, v. 31, n. 1, p. 21-32, set.2000.

ÚRBEZ-TORRES, J. R. et al. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. **Plant Disease**, v. 92, n. 4, p. 519-529, abr.2008.

WHEELER, T.; RUSH, C. M. Soilborne diseases. **Encyclopedia of Plant Pathology**. New York. **JohnWiley & Sons**, p. 935-947, 2001.

WHITE, T. J. et al. San Diego. **PCR protocols: a guide to methods and applications** **Academic Press Inc**, p. 315-322, 1990.

ZHOU, X. D. Diseases of eucalypt plantations in China: challenges and opportunities. **Fungal Divers**, v. 32, p. 1-7, set.2008