



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL  
DE PERNAMBUCO**  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM FITOPATOLOGIA**

**Tese de Doutorado**

**Espécies de *Lasiodiplodia* associadas à morte descendente da  
videira no Nordeste do Brasil e diversidade genética de  
*Lasiodiplodia theobromae***

**Tamiris Joana dos Santos Rêgo**

**Recife – PE  
2018**

**TAMIRIS JOANA DOS SANTOS RÊGO**

**ESPÉCIES DE *LASIODIPLODIA* ASSOCIADAS À MORTE  
DESCENDENTE DA VIDEIRA NO NORDESTE DO BRASIL E  
DIVERSIDADE GENÉTICA DE *LASIODIPLODIA*  
*THEOBROMAE***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de  
Pernambuco, como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Doutora em Fitopatologia.

**COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:**

Orientador: Prof. Dr. Sami Jorge Michereff

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara

Coorientadora: Prof. Dra. Kamila Câmara Correia

**RECIFE – PE  
JULHO – 2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

- R343e Rêgo, Tamiris Joana dos Santos  
Espécies de *Lasiodiplodia* associadas à morte descendente da videira no Nordeste do Brasil e diversidade genética de *Lasiodiplodia theobromae*/ Tamiris Joana dos Santos Rêgo. – 2018. 95 f.: il.
- Orientador: Sami Jorge Michereff.  
Coorientadores: Marcos Paz Saraiva Câmara, Kamila Câmara Correia.
- Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, BR-PE, 2018. Inclui referências.
1. Botryosphaeriaceae 2. Filogenia 3. Diversidade genética 4. Microssatélites 5. Patogenicidade 6. *Vitis* spp. I. Michereff, Sami Jorge, orient. II. Câmara, Marcos Paz Saraiva, coorient. III. Correia, Kamila Câmara, coorient. IV. Título

CDD 632

**ESPÉCIES DE *LASIODIPLODIA* ASSOCIADAS À MORTE  
DESCENDENTE DA VIDEIRA NO NORDESTE DO BRASIL E  
DIVERSIDADE GENÉTICA DE *LASIODIPLODIA*  
*THEOBROMAE***

**TAMIRIS JOANA DOS SANTOS RÊGO**

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 30/07/2018

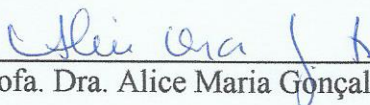
**ORIENTADOR:**



---

Prof. Dr. Sami Jorge Michereff (UFCA)

**EXAMINADORES:**




---

Profa. Dra. Alice Maria Gonçalves Santos (UFPI)



---

Prof. Dr. André Angelo Medeiros Gomes (UFRPE)



---

Profa. Dra. Elineide Barbosa de Souza (UFRPE)



---

Profa. Dra. Rejane Rodrigues da Costa e Carvalho (UFRPE)

**RECIFE – PE  
JULHO – 2018**

*Aos meus pais, João Rodolfo Ferreira Rêgo e Teresa Rodrigues dos Santos Rêgo, pelo exemplo, dedicação, amor e confiança, e ao meu esposo Guilherme Gomes Rolim, pelo apoio incondicional, meu eterno agradecimento*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as graças derramadas sobre a minha vida. A Ti toda honra e toda glória;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pela oportunidade de formação acadêmica e acolhimento;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Ciência sem Fronteiras – CAPES, pela concessão das bolsas de estudo;

Ao meu orientador Prof<sup>o</sup>. Sami Jorge Michereff, pelo aprendizado, orientação, apoio e confiança;

Aos meus coorientadores Prof. Marcos Paz Saraiva Câmara e Prof<sup>a</sup>. Kamila Câmara Correia pelos ensinamentos;

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia pelos ensinamentos transmitidos;

Ao Prof. Josep Armengol, Dra. Mónica Berbegal, Dra. Georgina Elena e Maela León, da Universitat Politècnica de València, pela oportunidade de aprendizado;

À toda equipe do Laboratório de Epidemiologia Ellen Rocha, Fábio Silva, Grazielle Lima, Kledson Mendes, Lucas Correia, Ana Paula Barros por todo apoio, conhecimentos compartilhados e momentos de alegria;

A todos os amigos que fiz durante essa caminhada Carmem Abade, Luana Silva, Emanuel Feitosa, Rezanio Martins, Ananda Rosa, Cinthia Conforto, Josiene Veloso, Gerusa Cavalcante, Elizabeth Rodrigues e Iwanne Coelho pelo apoio e amizade;

À prof<sup>a</sup>. Beatriz Meireles Barguil, pelos ensinamentos, cumplicidade e generosidade;

Aos funcionários Darcy e Romildo pela colaboração nos momentos necessários;

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS .....	v
RESUMO GERAL .....	vii
GENERAL ABSTRACT .....	viii
CAPÍTULO I – Introdução Geral .....	10
Referências Bibliográficas .....	26
CAPÍTULO II – Espécies de <i>Lasiodiplodia</i> associadas à morte descendente em videira no Nordeste do Brasil .....	35
Resumo .....	37
Introdução .....	37
Materiais e Métodos .....	39
Resultados .....	43
Discussão .....	44
Agradecimentos .....	48
Conformidade com padrões éticos .....	48
Referências .....	48
CAPÍTULO III – Genetic diversity and population structure of <i>Lasiodiplodia theobromae</i> from different hosts in northeastern Brazil and Mexico .....	66
Abstract .....	67
Introduction .....	67
Materials and Methods .....	70
Results .....	73
Discussion .....	75
Acknowledgments .....	78
Conflicts of Interest .....	78
Literature Cited .....	78
CONCLUSÕES GERAIS .....	95

## RESUMO GERAL

A morte descendente é uma doença causada por espécies de Botryosphaeriaceae e atualmente considerada uma das principais doenças do tronco da videira, responsável por sérios prejuízos à cultura, no Nordeste do Brasil e no mundo. Tendo em vista a importância crescente dessa doença e o grande número de patógenos envolvidos na infecção, incluindo *Lasiodiplodia theobromae*, um importante patógeno de culturas cultivadas e pós colheita, o presente trabalho teve como objetivos: (i) identificar espécies de *Lasiodiplodia* associadas à morte descendente da videira em áreas de clima tropical com verão seco e clima semiárido do Nordeste do Brasil, e (ii) conhecer a diversidade genética de *Lasiodiplodia theobromae* do Brasil e do México. Um total de 94 isolados de *Lasiodiplodia* foram identificados a partir de dados de sequências de DNA (*tef1-α* e ITS), sendo encontradas seis espécies: *L. crassispora*, *L. euphorbicola*, *L. hormozganensis*, *L. iraniensis*, *L. pseudotheobromae* e *L. theobromae*; e dois híbridos: *L. xbrasiliense* e *xlaeliocatleyae*. *L. theobromae* e *L. pseudotheobromae* foram as espécies mais prevalentes neste estudo. Todas as espécies foram patogênicas a videira, com diferenças significativas na severidade da doença. As espécies *L. hormozganensis*, *L. iraniensis* e *L. euphorbicola* foram as mais agressivas e *L. theobromae*, *L. pseudotheobromae* e *L. xbrasiliense* foram as menos agressivas. O estudo de diversidade de 117 isolados de *L. theobromae* do Nordeste do Brasil (n=100) e México (n=17), usando marcadores de repetição simples (SSR) revelou baixa diversidade genética entre as populações e a existência de dois grupos genéticos. Todos os isolados mexicanos foram agrupados com isolados brasileiros, sugerindo um baixo nível de diferenciação entre essas populações. Além disso, nenhuma diferenciação populacional evidente baseada em hospedeiro ou clima foi observada para *L. theobromae* no Brasil. As populações estudadas eram em sua maioria clonais, mas estudos adicionais são necessários para entender melhor o modo de reprodução do patógeno. Como as populações de *L. theobromae* apresentam baixa diversidade no Nordeste do Brasil, é provável que o desenvolvimento de cultivares resistentes seja uma boa estratégia de manejo.

**Palavras-chave:** Botryosphaeriaceae, diversidade genética, filogenia, microssatélites, patogenicidade, *Vitis* spp..



## GENERAL ABSTRACT

Botryosphaeria dieback is a disease caused by species of Botryosphaeriaceae, and currently considered one of the main diseases of the stem of the grapevine, responsible for serious damage to the culture in the northeastern of Brazil and in the world. In view of the increased importance of this disease, and the large number of pathogens involved in the infection including *Lasiodiplodia theobromae* an important crop and post-harvest pathogen, this study aimed: (i) identify species of *Lasiodiplodia* associated with the downward death of the vine in areas of tropical climate with dry summer and semi-arid climate in northeastern of Brazil, and (ii) know the genetic diversity of *Lasiodiplodia theobromae* of Brazil and Mexico. A total of 94 isolates from *Lasiodiplodia* were identified from DNA sequence data (*tef1- $\alpha$*  e ITS), being found six species: *L. crassispora*, *L. euphorbicola*, *L. hormozganensis*, *L. iraniensis*, *L. pseudotheobromae* e *L. theobromae*, and two hybrids: *L. xbrasiliense* e *xlaeliocatlelyae*. *Lasiodiplodia theobromae* and *L. pseudotheobromae* were the most prevalent species in this study. All species were pathogenic to the grapevine with significant differences in disease severity. The species *L. hormozganensis*, *L. iraniensis*, and *L. euphorbicola* were the most aggressive, and *L. theobromae*, *L. pseudotheobromae*, and *L. xbrasiliense* were the least aggressives. The diversity study of 117 isolates of *L. theobromae* from Brazil (n=100) and Mexico (n=17) using simple repeat markers (SSR) revealed low genetic diversity among populations and the existence of two genetic groups. All Mexican isolates were grouped with Brazilian isolates suggesting a low level of differentiation between these populations. Furthermore, no evident host or climate-based population differentiation was observed for *L. theobromae* in northeastern Brazil. The populations studied were mostly clonal, but additional studies are needed to better understand the mode of reproduction of the pathogen. As populations of *L. theobromae* present low diversity in northeastern Brazil it is likely that the development of resistant cultivars is a good strategy of management.

**Key-words:** Botryosphaeriaceae, genetic diversity, microsatellites, pathogenicity, phylogeny, *Vitis* spp..

# Capítulo I

---

---

## Introdução Geral

# ESPÉCIES DE *LASIODIPLODIA* ASSOCIADAS À MORTE DESCENDENTE DA VIDEIRA NO NORDESTE DO BRASIL E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *LASIODIPLODIA THEOBROMAE*

## INTRODUÇÃO GERAL

### 1. A viticultura no Brasil

A viticultura brasileira teve início com a chegada dos colonizadores portugueses no século XVI, mas tornou-se uma atividade comercial somente no início do século XX, com cultivos de videiras (*Vitis* spp.) atualmente localizados nas regiões de clima subtropical úmido, subtropical e tropical (CAMARGO; TONIETTO; HOFFMANN, 2011), entre as latitudes 30°S e 9°S (AMORIM; SPÓSITO; KUNIYUKI, 2016). Até o final da década de 50 essa atividade era restrita à região Sul, leste de São Paulo e sul de Minas Gerais. Com a expansão da fronteira vitícola, o plantio de videiras seguiu para o Vale do São Francisco, nos estados de Pernambuco e Bahia, depois para às regiões norte do Paraná, noroeste de São Paulo e norte de Minas Gerais (CAMARGO; TONIETTO; HOFFMANN, 2011). Em 2016 foram registrados 16 estados e o Distrito Federal com produção da fruta (IBGE, 2018).

Com aproximadamente 78.830 mil hectares cultivados e 984.451 mil toneladas de frutos colhidos em 2016 (IBGE, 2018), a videira é uma das culturas de frutas lenhosas perenes mais cultivadas e economicamente importantes para o país. A região sul destaca-se como principal região produtora de uvas, com 59.476 ha cultivados e 499.178 mil toneladas de uvas produzidas, seguida pelas regiões Nordeste e sudeste, com 10.200 e 8.851 ha cultivados e, 323.925 e 154.584 toneladas de uvas produzidas, respectivamente. As regiões sul e Nordeste são responsáveis por quase 84% da produção total do país (IBGE, 2018), sendo a uva da região sul destinada principalmente à produção de vinho, enquanto na região Nordeste predomina a produção de uvas para consumo *in natura* (SILVA; COELHO, 2010).

No Brasil, o cultivo de videiras em áreas caracterizadas com clima subtropical úmido, apresenta um ciclo anual e uma fase de repouso hibernar, decorrente das baixas temperaturas de inverno no Rio Grande do Sul, Paraná, Santa Catarina, Minas Gerais e São Paulo. Em áreas com clima subtropical, inverno ameno e curto, mas sujeitos à ocorrência de geadas, a videira tem um período natural de dormência (junho/julho), que ao ser manejada da forma tradicional

obtem um ciclo por ano e com o uso de sistemas especiais de manejo é possível realizar dois ciclos reprodutivos, obtendo-se duas colheitas anuais no norte do Paraná e no leste de São Paulo (CAMARGO; TONIETTO; HOFFMANN, 2011). Na viticultura tropical, típica de regiões onde as temperaturas mínimas não são suficientes para induzir a planta à dormência, a videira cresce continuamente e, com o uso de tecnologia apropriada, é possível a obtenção de mais de duas colheitas por ano em Pernambuco, Bahia, Ceará, Rio Grande do Norte, Piauí, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Rondônia, noroeste de São Paulo e o norte de Minas Gerais (CARVALHO; TREICHE; BELING, 2016; CAMARGO; TONIETTO; HOFFMANN, 2011).

As espécies de videira *Vitis vinifera* L. (origem europeia) e *Vitis labrusca* L. (origem americana) são economicamente as mais importantes para a agricultura, tanto para a produção de vinhos, quanto para o consumo *in natura* (GIOVANNINI, 1999). No Brasil, a variabilidade do material genético utilizado é extensa, com mais de 120 cultivares de *V. vinifera* e mais de 40 cultivares de uvas americanas, incluindo castas de *V. labrusca*, *Vitis bourquina* Munson e híbridas interespecíficas (CAMARGO; TONIETTO; HOFFMANN, 2011).

As principais cultivares produzidas no país são a Isabel, Bordô, Niágara Rosada e Niágara Branca pertencentes a espécie *V. labrusca*; a Itália, Benitaka, Red Globe, Festival, Crimson, Thompson da espécie *V. vinifera*; e mais recentemente, as cultivares BRS Isis e a BRS Vitória resultantes do cruzamento 'CNPUV 681-29' ['Arkansas 1976' X 'CNPUV 147-3' ('Niágara Branca' X 'Vênus')] X 'BRS Linda' (CARVALHO; TREICHE; BELING, 2016).

No agronegócio brasileiro, a viticultura é uma atividade de grande importância social, econômica e cultural e se destaca por agregar valor à cadeia produtiva e impulsionar ramos da economia, como turismo e gastronomia (REETZ et al., 2015), pois além da produção de vinho e consumo *in natura*, a uva colhida é utilizada para outros fins como produção de sucos, doces, compotas e uvas passas (LEÃO, 2010).

## **1.2. A viticultura no Nordeste do Brasil**

Na região Nordeste, a viticultura reveste-se de características específicas devido às condições climáticas caracterizadas por temperaturas médias entre 24 °C e 30 °C, precipitações de 500 milímetros/ano e umidade relativa do ar de 50%. O clima quente, durante todo o ano, é responsável pela aceleração dos processos fisiológicos e rápida propagação da videira, permitindo a primeira colheita um ano e meio após a instalação da cultura (ARATA et al.,

2017). Além disso, as uvas irrigadas podem ser produzidas continuamente ao longo do ano, permitindo em média 2,5 ciclos de colheita anualmente (TEIXEIRA et al., 2007).

Os principais produtores são os estados de Pernambuco e Bahia, cobrindo uma área de 10.020 mil ha cultivados e 320.289 mil toneladas de uvas produzidas, respondendo por aproximadamente 99% da produção na região (IBGE, 2018). O Vale do São Francisco, localizado na região semiárida dos estados da Bahia e Pernambuco, é o principal polo produtor de uvas finas de mesa do Nordeste (LAZZAROTTO; FIORAVANÇO, 2013). Atualmente, mais de oito variedades de videiras têm sido produzidas, sendo algumas voltadas para o mercado externo. A cultivar Itália (Bicane x Moscatel de Hamburgo) é a mais comercializada, entre as cultivares com sementes. Outras cultivares produzidas são a Benitaka e Red Globe. As principais variedades sem semente são Crimson, Thompson e Festival (CARVALHO; TREICHE; BELING, 2016; CODEVASF, 2016).

Além dos estados de Pernambuco e Bahia, mais quatro estados do Nordeste do Brasil cultivam videiras em menor escala: Ceará, Paraíba, Piauí e Rio Grande do Norte (IBGE, 2018). Embora o Vale do São Francisco seja o principal polo produtor, existem outros pequenos polos de produção da fruta, que abastecem o mercado interno. No Vale do Siriji, município de São Vicente Férrer, zona da Mata de Pernambuco, são cultivados aproximadamente 500 ha de videiras e produzidas 10.000 toneladas de uvas (IBGE, 2018), exclusivamente da cultivar Isabel, material rústico e adaptado às condições da região (TAVARES; LIMA, 2009). Um outro polo vitícola, o Vale do Jaguaribe, localizado em Russas - Ceará, iniciou o cultivo de videiras, a menos de dez anos, com as variedades Itália e Benitaka, abrangendo área total de 20 ha e produzindo 296 t de uvas (IBGE, 2018).

O crescimento da cadeia produtiva de uva é contínuo, levando ao aumento da importância econômica e social da atividade, principalmente para a agricultura familiar. No entanto, a videira está sujeita ao ataque de diversos patógenos causadores de doenças, que reduzem a produção e a longevidade do parreiral, afetando a qualidade do produto final e em alguns casos causando a morte da planta (CARVALHO; TREICHE; BELING, 2016). A videira é uma das culturas perenes lenhosas que mais hospeda patógenos (MARTELLI, 1997). Somente de origem fúngica foram registradas mais de 29 doenças associadas a cultura e entre estas encontram-se doenças de elevada importância devido aos prejuízos ocasionados (WILCOX; GUBLER; UYEMOTO, 2015).

### 1.3. Doenças da videira no Nordeste do Brasil

O grande avanço da área plantada com videiras no Nordeste brasileiro, bem como as várias fases fenológicas da cultura que ocorrem de forma simultânea nos vinhedos e a introdução de novos materiais genéticos, tem potencializado a ocorrência significativa de doenças como a ferrugem (*Phakopsora euvitis* Ono), o míldio (*Plasmopara viticola* (Berk. & M. A. Curtis) Berl. & De Toni), o oídio (*Uncinula necator* (Schwein.) Burril.), a morte descendente (Botryosphaeriaceae), o cancro bacteriano (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye), o enrolamento das folhas (*Grapevine leafroll-associated virus 1-9* - GLRaV 1-9), a malformação infecciosa (*Grapevine fanleaf virus*) e os nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.) (BARBOSA et al., 2010).

Doenças fúngicas que comprometem o tronco da videira estão entre as mais importantes por limitarem a longevidade dos vinhedos e estarem presente nas principais regiões produtoras de uvas (LAWRENCE et al., 2017). Essas doenças afetam o rendimento da cultura, por causarem a morte das posições de frutificação, danificando o tecido vascular entre os rebentos e as raízes ou devido ao atraso no amadurecimento dos frutos (LORRAIN et al., 2012). Dentre as várias doenças que acometem o tronco da videira, a morte descendente, causada por espécies de Botryosphaeriaceae, é responsável por importantes danos, como redução da vida útil e produtividade dos parreirais, resultando em aumentos consideráveis nos custos de produção (ÚRBEZ-TORRES, 2011; YAN et al., 2013).

Correia et al., (2016) relataram a presença de várias espécies de Botryosphaeriaceae causando a morte descendente em vinhedos no Vale do São Francisco, importante região produtora de uvas de mesa no Nordeste do Brasil. Fungos membros da família Botryosphaeriaceae são importantes patógenos de plantas cultivadas, sendo considerados uma potencial ameaça aos sistemas agrícolas (MELH et al., 2017).

### 1.4. Morte descendente da videira

A morte descendente é uma doença que atinge o tronco da videira e pode ser causada por espécies da família Botryosphaeriaceae e Diatrypaceae (GRAMAJE; ÚRBEZ-TORRES; SOSNOWSKY, 2018). No Brasil, os fungos associados a doença são principalmente da família Botryosphaeriaceae, sendo a doença conhecida internacionalmente como *Botryosphaeria dieback* (GARRIDO; GAVA; CAROLLO, 2017). Descrita pela primeira vez em 1974 na Hungria (LEHOCZKY, 1974), essa doença tem sido relatada em quase todos os principais

países produtores de uva, incluindo África do Sul, Alemanha, Austrália, Brasil, Chile, China, Egito, Espanha, Estados Unidos, França, Grécia, Hungria, Iran, Iraque, Itália, Líbano, México, Nova Zelândia, Portugal e Uruguai (ÚRBEZ-TORRES, 2011; YAN et al., 2013; CORREIA et al., 2016).

A característica marcante da morte descendente é a necrose do lenho do tronco e dos braços das videiras infectadas. Sintomas típicos da doença incluem cancos, mortalidade das brotações, deformação das folhas, podridão e necrose setorial da madeira, descoloração castanho-escuro da parte afetada e falha na unificação do enxerto (ÚRBEZ-TORRES; GUBLER, 2011; GARRIDO; GAVA; CAROLLO, 2017). A presença de faixas pretas no xilema da madeira infectada é característica da doença, causando podridão seca geralmente em forma de cunha no tronco e nos braços. Os cancos são mais facilmente vistos quando a videira é cortada na seção transversal (LEHOCZKY, 1988). Os sintomas são observados nas plantas dois a quatro anos após a infecção. O desenvolvimento da doença ocorre lentamente nas videiras e nenhum sintoma é notado na primeira ou na segunda estação de crescimento após a infecção. Na terceira ou quarta estação, um cancro é frequentemente visto e acompanhado pela manifestação dos sintomas nas folhas. Os principais danos verificados incluem a redução da produtividade das plantas atacadas e a formação de cachos menores, apresentando bagas com menor teor de açúcar e maior acidez (GARRIDO et al., 2011).

No Brasil, o primeiro relato de ocorrência da morte descendente em videiras foi em 1991 nos municípios de Jales/SP e Petrolina/PE (AMORIM; SPÓSITO; KUNIYUKI, 2016). Atualmente, essa doença tem sido frequentemente relatada em vinhedos da região Sul do Brasil, sendo considerada uma das principais causas de mortalidade de plantas na Serra Gaúcha, com perdas de 5% a 60%, dependendo da extensão do vinhedo atacado. O plantio de mudas contaminadas pode levar a perdas de até 100%, devido o bloqueio do fluxo da seiva na área da enxertia infectada pelo fitopatógeno (GARRIDO; GAVA; CAROLLO, 2017).

A importância da morte descendente aumenta devido à natureza dos patógenos envolvidos na infecção, pois estes podem permanecer latentes e ocasionar a doença de forma silenciosa, durante um longo período do seu processo de evolução, só desenvolvendo os sintomas quando os danos já são irreversíveis (SÔNEGO; GARRIDO; GRIGOLETTI JÚNIOR, 2005). Na região Nordeste, oito patógenos distintos já foram identificados associados a morte descendente em videiras no principal polo de produção de uva da região, incluindo *L. crassispora* T.I. Burgess & Barber, *L. egyptiacea* A.M. Ismail, L. Lombard & Crous (sinonimizada como híbrido *L. xlaeliocattlelyae*), *L. euphorbicola* A.R. Machado & O.L. Pereira, *L. hormozganensis* Abdollahz., Zare & A.J.L. Phillips, *L. iraniensis* Abdollahz., Zare

& A.J.L. Phillips, *L. pseudotheobromae* A.J.L. Phillips, *L. theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl, *L. brasiliense* M.S.B. Netto, M.W. Marques & A.J.L. Phillips (híbrido *L. xbrasiliense*) (CORREIA et al., 2016).

Os fatores epidemiológicos determinantes para a ocorrência de doenças que afetam o tronco da videira são bem conhecidos atualmente (GRAMAJE; ÚRBEZ-TORRES; SOSNOWSKY, 2018). As principais fontes de inóculo são o material de propagação infectado, corpos de frutificação do fungo dispersos nos órgãos da planta, ferramentas de poda contaminadas e restos culturais infectados. Além disso, culturas que sejam hospedeiras do patógeno e cultivadas próximo aos vinhedos, também são importantes fontes de inóculo (BILLONES-BAAIJENS et al., 2015). Os picnídios são liberados, frequentemente, após o período de molhamento da parte aérea da planta, por meio de água da chuva ou pela água de irrigação (GARRIDO; GAVA; CAROLLO, 2017) e a infecção pode ser favorecida por condições que reduzam o vigor das plantas, como altas temperaturas, geadas, baixa nutrição e podas mal conduzidas (LARIGNON; DUBOS, 2001)

A disseminação dos conídios a curta distância, ocorre pelo vento e por respingos de chuva, através do impacto das gotas de água nas estruturas de frutificação (ÚRBEZ-TORRES, 2011; MEHL et al., 2013) e os patógenos podem sobreviver como picnídios e/ou peritécios em partes doentes da planta, como troncos e ramos com cancrios ou na madeira abandonada após a poda (ÚRBEZ-TORRES et al., 2006; VAN NIEKERK et al., 2004).

O manejo de doenças que afetam o tronco da videira é complicado, sendo influenciado pela doença e/ou patógenos envolvidos. As informações sobre medidas de controle são bem limitadas e variam entre regiões geográficas (GRAMAJE; ÚRBEZ-TORRES; SOSNOWSKY, 2018). Um programa de manejo integrado que inclua estratégias físicas, químicas, biológicas e/ou culturais tem sido sugerido como o procedimento mais eficaz para reduzir infecções por patógenos fúngicos em viveiros e em plantas adultas no campo (HALLEEN; FOURIE 2016).

Cuidados durante a obtenção de materiais de propagação são extremamente importantes, pois, os viveiros podem ser uma fonte de material vegetal infectado, o que resulta em infecção cruzada de lotes inteiros de estacas e de videiras crescidas a partir delas (HALLEEN; FOURIE 2016). Uma vez presente no campo, a erradicação completa da doença é difícil, sendo essencial o manejo visando a prevenção e mitigação da doença (ÚRBEZ-TORRES, 2011).

Com a saída do arsenito de sódio, dos fungicidas benzimidazóis e do brometo de metila do mercado, no início dos anos 2000, devido a preocupações ambientais e de saúde pública (DECOIN, 2001; EPA, 1997), eliminou-se os produtos químicos mais eficazes contra fungos do tronco da videira, em vários países (GRAMAJE; ÚRBEZ-TORRES; SOSNOWSKY, 2018).



Assim, tradicionalmente o manejo de doenças do tronco da videira, causadas por espécies de Botryosphaeriaceae, tem sido realizado através da cirurgia corretiva (GARRIDO; GAVA; CAROLLO, 2017), um método de manejo largamente utilizado para prolongar a longevidade das videiras contaminadas (GARRIDO; GAVA; CAROLLO, 2017; SOSNOWSKI; WICKS; SCOTT, 2011).

Algumas medidas preventivas podem ser executadas, como realizar análises para avaliar a presença de fungos em plantas-matrizes dentro dos viveiros comerciais, uso de porta enxertos resistentes, práticas culturais e saneamento de vinhedos, incluindo a destruição das videiras completamente doentes. Até o momento, esta última, é a melhor prática para reduzir o número de novas infecções para todos os patógenos que atingem o tronco da videira (GRAMAJE; ÚRBEZ-TORRES; SOSNOWSKY, 2018). A eliminação dos restos de poda curativa constitui outra prática cultural importante, devendo ser realizada logo após a poda, evitando assim a presença de fontes de inóculo na parcela (MUGNAI; GRANITI; SURICO, 1999).

Medidas como a aplicação de tinta látex nos ferimentos da poda possibilita um certo grau de proteção, mas não é reconhecido como método de controle (GARRIDO; GAVA; CAROLLO, 2017). Em contrapartida, o uso de fungicidas protetores nos ferimentos de poda tem sido indicado (SOSNOWSKI et al, 2005). Produtos biológicos estão em fase de estudo objetivando o manejo de doenças que afetam o tronco da videira. Os bioprodutos à base de *Trichoderma atroviride* Bissett e *Trichoderma harzianum* Rifai são os mais estudados em viveiros (GRAMAJE; ÚRBEZ-TORRES; SOSNOWSKY, 2018). Em videiras adultas, espécies de *Trichoderma* têm sido testadas visando a proteção de feridas de poda contra os patógenos causadores de esca, eutipiose e morte descendente (COMPANT et al., 2013).

O estresse hídrico também foi associado a plantas com sintomas de morte descendente. Foi observado que videiras expostas ao estresse hídrico apresentaram maior comprimento de lesão causadas por *L. theobromae*, *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *Neofusicoccum australe* (Slippers, Crous & M.J. Wingf.) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips e *Diplodia seriata* De Not. quando comparadas a videiras não estressadas (VAN NIEKERK et al., 2011). O controle total de Botryosphaeriaceae e outros fitopatógenos associados a doenças do tronco da videira é impraticável. Isso se deve a diversidade de patógenos, taxonomicamente distintos, capazes de causar danos ao tronco da videira em diferentes ambientes (GRAMAJE; ÚRBEZ-TORRES; SOSNOWSKY, 2018). Neste sentido, estudos de identificação dos diferentes fungos que infectam videiras, bem como a investigação sobre a sua biologia e epidemiologia (ÚRBEZ-TORRES; GUBLER, 2011), têm

sido fundamentais para alcançar um manejo eficaz de doenças que afetam o tronco da videira, sendo essencial para prolongar a vida útil das vinhas (ROLSHAUSEN et al., 2010).

### **1.5. Espécies de Botryosphaeriaceae associadas à morte descendente**

A família Botryosphaeriaceae pertence ao filo Ascomycota, classe Dothideomycetes e ordem Botryosphaeriales (MYCOBANK, 2018). Membros desta família ocorrem em várias partes do mundo, sendo reconhecidos como endofíticos, patógenos latentes e oportunistas de plantas lenhosas, capazes de infectar plantas através de feridas ou aberturas naturais, como brotos, lenticelas e estômatos (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007). A maioria das espécies de Botryosphaeriaceae possuem uma ampla gama de plantas hospedeiras, incluindo culturas frutíferas (COUTINHO et al., 2017; NETTO et al., 2017; MARQUES et al., 2013; CORREIA et al., 2016), árvores florestais (BURGESS et al., 2017; MANAWASINGHE et al., 2018) e plantas em ecossistemas nativos (BEGOUDE et al., 2012; PAVLIC et al., 2007). Espécies de Botryosphaeriaceae são fitopatógenos importantes que causam manchas foliares, podridões pedunculares, podridões de frutos, gomose, cancro perene e eventual morte de plantas (FARR; ROSSMAN, 2018).

A capacidade dos membros de Botryosphaeriaceae de infectar múltiplos hospedeiros aumenta a ameaça que eles representam como potenciais agentes patogênicos econômicos e ecológicos de árvores nativas e cultivadas mundialmente (MELH et al., 2017). A taxonomia da família é complexa e tem sofrido profundas alterações nos últimos anos 12 anos (CROUS et al., 2006, ALVES et al., 2008, PHILLIPS et al., 2013; SLIPPERS et al., 2017). Os rearranjos taxonômicos e a descrição de inúmeros taxa novos tem dificultado a identificação das espécies em trabalhos de diagnóstico da doença (VAN NIEKERK et al., 2006; CROUS; HAWKSWORTH; WINGFIELD, 2015; SLIPPERS et al., 2017).

A análise filogenética de genes ribossomais nucleares, como a região espaçadora transcrita interna (ITS), proporcionou uma significativa contribuição para estudos filogenéticos de Botryosphaeriaceae, especialmente dentro do gênero *Botryosphaeria*. No entanto, o uso de um único gene pode subestimar a real diversidade entre espécies estreitamente relacionadas ou crípticas (TAYLOR et al., 2000; CRUYWAGEN et al., 2017). Dessa forma, análises multilocus usando os genes ITS, fator de alongação (*tef1- $\alpha$* ), beta-tubulina ( $\beta$ -tubulina) e RNA polimerase II (RPB2) têm sido empregadas com sucesso para discriminar espécies crípticas e elucidar as relações filogenéticas em Botryosphaeriaceae (SLIPPERS et al., 2017).

Atualmente, são reconhecidos a existência de 23 gêneros pertencentes à família Botryosphaeriaceae: *Allanphillipsia* Crous & M.J. Wingf, *Bahusutrabeeja* Subram. & Bhat, *Barriopsis* A.J.L. Phillips, A. Alves & Crous, *Botryobambusa* R. Phookamsak, J.K. Liu & K.D. Hyde, *Botryosphaeria* Ces. & De Not., *Cophinforma* Doilom, J.K. Liu & K.D. Hyde, *Diplodia* Fr., *Dothiorella* Sacc., *Eutiarosporella* Crous, *Lasiodiplodia* Ellis & Everh., *Macrophomina* Petr., *Marasasiomyces* Crous, *Mucoharknessia* Crous, *Neodeightonia* Booth, *Neofusicoccum* Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *Neoscytalidium* Crous & Slippers, *Oblongocollomyces* Tao Yang & Crous, *Othia* Nitschke ex Fuckel, *Phaeobotryon* Theiss. & Syd., *Sakireeta* Subram. & K. Ramakr., *Sardiniela* Linaldeddu et al., *Sphaeropsis* Sacc., *Tiarosporella* Höhn (SLIPPERS et al., 2017), causando doenças em diversas espécies hospedeiras (FARR; ROSSMAN, 2018).

Entre todas as commodities agrícolas afetadas por espécies de Botryosphaeriaceae, a videira está entre as mais importantes (ÚRBEZ-TORRES, 2011). Até o momento, 26 espécies de Botryosphaeriaceae estão associadas a morte descendente da videira, incluindo espécies dos gêneros *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium*, *Phaeobotryosphaeria* e *Spencermartinsia* (PITT; ÚRBEZ-TORRES; TROUILLAS, 2013, PITT et al., 2013, PITT; ÚRBEZ-TORRES; TROUILLAS, 2015; ROLSHAUSEN et al., 2013; ÚRBEZ-TORRES, 2011; CORREIA et al., 2016; YANG et al., 2017). Estudos de patogenicidade demonstraram que espécies dentro dos gêneros *Lasiodiplodia* e *Neofusicoccum* estão entre os fungos mais rápidos colonizadores da madeira e, portanto, os fungos do tronco da videira mais agressivos (ÚRBEZ-TORRES et al., 2008; ÚRBEZ-TORRES; GUBLER, 2009; VAN NIEKERK et al., 2004).

## 1.6. O gênero *Lasiodiplodia*

Espécies de *Lasiodiplodia* estão presentes em todo o mundo (FARR; ROSSMAN, 2018). No Brasil, espécies do gênero foram relatadas em diversas culturas frutíferas, incluindo abacateiro (*Persea americana* Mill.), aceroleira (*Malpighia emarginata* L.), bananeira (*Musa* spp.), cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), citros (*Citrus* spp.), coqueiro (*Cocos nucifera* L.), gravioleira (*Annona muricata* L.), goiabeira (*Psidium guajava* L.), mangueira (*Mangifera indica* L.), maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims), melanciaeira (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai), meloeiro (*Cucumis melo* L.), mamoeiro (*Carica papaya* L.), pinha (*Annona squamosa* L.) e videira (*Vitis vinifera* L.) (LIMA et al., 2012; LIMA et al., 2013; CORREIA et al., 2016; MARQUES et al., 2013; NETTO et al., 2014, NETTO et al., 2017; COUTINHO et al. 2017; ROSADO et al., 2016).

Entre os gêneros da família Botryosphaeriaceae, *Lasiodiplodia* é um dos com maior frequência de relatos causando doenças em plantas (PHILLIPS et al., 2013). Atualmente, o gênero *Lasiodiplodia* possui 38 espécies descritas, com base em dados de sequências de DNA e características morfológicas (SLIPPERS et al., 2017). Porém, a maioria destas espécies são consideradas espécies crípticas dentro do complexo *L. theobromae* com apenas 14 espécies possuindo caracteres morfológicos distintos: *L. citricola* Abdollahz., Javadi & A.J.L. Phillips, *L. euphorbicola* A.R. Machado & O.L. Pereira, *L. exigua* Linaldeddu, Deidda & A.J.L. Phillips, *L. gilanensis* Abdollahz., Javadi & A.J.L. Phillips, *L. rubropurpurea* T.I. Burgess, Barber & Pegg e *L. venezuelensis* T.I. Burgess, Barber & Mohali, *L. gonubiensis* Pavlic, Slippers & M.J. Wingf, *L. hormozganensis*, *L. iraniensis*, *L. mahajangana* Begoude, Jol. Roux & Slippers, *L. margaritacea* Pavlic, T.I. Burgess & M.J. Wingf., *L. mediterranea* Linaldeddu, Deidda & Berraf-Tebbal, *L. parva* A.J.L. Phillips, A. Alves & Crous e *L. pseudotheobromae* A.J.L. Phillips, A. Alves & Crous (CRUYWAGEN et al., 2017).

*Lasiodiplodia brasiliense* e *L. laeliocattleyae*, *L. missouriana* K. Striegler & G.M. Leavitt e *L. viticola* J.A.C.M. Santos foram anteriormente identificados como espécies crípticas dentro com complexo *L. theobromae* (ISMAIL et al., 2012; ÚRBEZ-TORRES et al., 2012; NETTO et al., 2014). Porém, Cruywagen et al. (2017) ao analisar árvores individuais de cinco loci (*tef1-α*, ITS, *Tub2*, *rpb2* e *cmdA*), observaram incongruências entre o locus *tef1-α* e os demais loci estudados, considerando estas espécies como espécies híbridas de *Lasiodiplodia*, sugerindo que a interpretação dos dados *tef1-α* deve ser feita cuidadosamente e não apenas em combinação com ITS, uma vez que os híbridos podem não serem reconhecidos quando apenas um ou dois loci são usados na identificação de novas espécies crípticas.

O conceito biológico de espécie postula que organismos de distintas espécies devem ser reprodutivamente incompatíveis (TAYLOR et al., 2000). No entanto, nos últimos anos, tem sido apresentado na literatura, muitos exemplos de diferentes espécies de fungos, capazes de se cruzarem e reproduzirem híbridos viáveis (DEPOTTER et al., 2016; INDERBITZIN et al., 2011; BRASIER; KIRK, 2010). Inderbitzin et al. (2011) demonstraram que o híbrido *Verticillium longisporum* (C. Stark) Karapapa, Bainbr. & Heale teve sua origem a partir de três eventos de hibridização, envolvendo três espécies parentais distintas. Os isolados de *V. longisporum*, utilizados no estudo acima, foram obtidos de diferentes culturas agrícolas doentes, incluindo a colza oleaginosa (*Brassica napus* L.), e se mostraram mais agressivos do que qualquer um de seus genitores (INDERBITZIN et al., 2011).

Os híbridos podem ser resultantes, principalmente, da reprodução parassexual e da reprodução sexual. A reprodução parassexual consiste em um processo não sexual envolvendo

a fusão de hifas, seguida de fusão nuclear, recombinação mitótica e perda cromossômica para restaurar o estado de ploidia parental, que se pensa ocorrer amplamente nos fungos para a transferência de material genético (KARAPAPA; BAINBRIDGE; HEALE, 1997). Na reprodução sexual, gametas de diferentes espécies se fundem em um zigoto viável (GLADIEUX et al., 2011). Eventos de hibridação bem-sucedidos podem gerar agentes patogênicos híbridos que se encaixam particularmente em um determinado nicho ecológico, podendo ter efeitos de longo alcance sobre culturas agrícolas ou ecossistemas naturais (DEPOTTER et al., 2016).

### 1.7. *Lasiodiplodia theobromae*

A espécie *L. theobromae* é a espécie tipo do gênero *Lasiodiplodia*, sendo por muito tempo a única espécie do gênero. É um fitopatógeno cosmopolita, com distribuição mundial nos trópicos e subtropicais, que causa doenças em mais de 370 espécies de plantas hospedeiras (FARR; ROSSMAN, 2018), o que sugere uma alta variabilidade genética. A fase sexual de *L. theobromae* é reportada como *Botryosphaeria rhodina* (Berk.; Curtis) Arx., um ascomiceto que pertence a ordem Botryosphaerales (MYCOBANK, 2018). O primeiro relato da forma sexual de *L. theobromae* foi realizado por Stevens em 1925. Entretanto, Crous et al., (2006) restringiram a nomenclatura *Botryosphaeria* a *Botryosphaeria dothidea* (Moug. ex Fr.) Ces. & De Not. e *Botryosphaeria corticis* (Demaree & Wilcox) Arx & E. Müll., sendo este gênero não mais aplicado ao estado sexual das espécies de *Lasiodiplodia*. Esta decisão foi baseada na falta de relatos concisos sobre a conexão entre *B. rhodina* e *L. theobromae*. Além disso, nos últimos anos, espécies crípticas foram descritas a partir de isolados previamente identificados como *L. theobromae* (BURGESS et al., 2006; ALVES et al., 2008; CRUYWAGEN et al., 2017), levando à incerteza sobre a precisão das informações sobre o status sexual de *L. theobromae* (BEGOUDE et al., 2012).

*Lasiodiplodia theobromae* produz picnídios, simples ou agregados, imersos no hospedeiro e tornando-se erupentes quando maduros, marrom escuros, uniloculares, de parede fina ou espessa. As paráfises são hialinas, cilíndricas, septadas, ocasionalmente ramificadas, com extremidades arredondadas. Os conidióforos são hialinos, simples, às vezes septados, raramente ramificados, cilíndricos, proveniente das camadas internas de células que revestem os lóculos. As células conidiogênicas são hialinas, com parede fina, lisa, cilíndrica e holoblástica. Os conídios são geralmente subovoides, com ápices amplamente arredondados, bases afinadas a truncadas, de paredes espessas, conteúdo granular, inicialmente hialino e

asseptado, tornando-se castanho escuro e com um septo somente após um longo período de tempo depois da descarga do conidiomata, com depósitos de melanina na superfície interna da parede disposta longitudinalmente dando uma aparência estriada aos conídios (PHILLIPS et al., 2013).

As doenças causadas por este patógeno incluem morte descendente, cancro perene, gomose, manchas foliares, podridões de frutos, morte em culturas perenes lenhosas e plantas ornamentais, bem como em espécies florestais nativas e introduzidas (FARR; ROSSMAN, 2018). *L. theobromae* é um fungo saprófito, mas também pode ser encontrado como patógeno latente ou endófito em tecidos de plantas saudáveis, tornando-se patogênico quando o hospedeiro está enfraquecido ou estressado (MOHALI; BURGESS; WINGFIELD, 2005). Pesquisas recentes têm revelado informações sobre a identificação, distribuição e patogenicidade de *L. theobromae* no Brasil (MARQUES et al., 2013; NETTO et al., 2014; MACHADO et al., 2014; CORREIA et al., 2016; ROSADO et al., 2016; COUTINHO et al., 2017; NETTO et al., 2017). Nesses trabalhos, apesar de não ser a espécie mais agressiva aos hospedeiros, *L. theobromae* é a espécie detectada com maior frequência em diversos hospedeiros e condições ambientais, sugerindo uma elevada variabilidade entre os indivíduos dessa espécie presentes no País. Porém, nenhum estudo sobre a diversidade genética da população de *L. theobromae* encontrada no Brasil e a relação dessa população com isolados obtidos em outros países foi realizado até o momento.

## 2. Genética populacional

Na natureza, existem populações numerosas de microrganismos distintos, sejam eles patogênicos ou não. Essa diversidade é muito importante para assegurar a perpetuação das espécies no ambiente. No entanto, essa mesma diversidade muitas vezes pode se tornar uma ameaça, quando indivíduos variantes comprometem o desenvolvimento de outros organismos. Interações entre plantas (cultivadas ou não) e os mais diversos organismos (microrganismos benéficos, polinizadores, comensais, animais herbívoros, insetos pragas e agentes patogênicos vegetais) acontecem na natureza. Neste sentido, fitopatógenos que apresentam diferentes níveis de variabilidade podem representar uma ameaça em interações com as plantas, pois em sistemas agrícolas é comum observar a suplantação de resistência de plantas imunes ou pouco afetadas por esses patógenos (MIZUBUTI; CERESINI, 2018).

O sucesso evolutivo dos fitopatógenos pode ser atribuído a vários fatores, entre eles a alta capacidade em gerar variabilidade, permitindo uma vantagem seletiva imediata dentro da

população de patógenos (HAMMMOND-KOSACK; JONES, 2000). A estrutura genética pode ser usada para inferir o impacto relativo de diferentes forças que influenciam a evolução da população do patógeno (MCDONALD; ZHAN; BURDON, 1999). O conhecimento da quantidade e distribuição da variação genética dentro e entre populações é um componente importante na compreensão da biologia populacional de fungos patogênicos. Uma grande quantidade de diversidade genética distribuída sobre uma pequena escala espacial sugere a possibilidade de rápida adaptação por um patógeno a mudanças ambientais (novos genes de resistência na planta hospedeira ou fungicidas) e um alto grau de similaridade genética entre populações coletadas de regiões geográficas amplamente separadas sugere a ocorrência de dispersão a longa distância e fluxo gênico (MCDONALD; ZHAN; BURDON, 1999).

A estrutura genética de patógenos vegetais é resultante da interação entre as cinco forças que afetam a evolução das populações: mutação, recombinação, seleção, fluxo gênico e deriva genética (MCDONALD; LINDE, 2002) podendo ser influenciada por fatores biológicos do hospedeiro e do patógeno, práticas agrícolas, atividades humanas e ambiente (ZHAN, 2016). A mutação, recombinação e fluxo gênico aumentam a variação genética das populações de patógenos gerando novas sequências de DNA, através do rearranjando de sequências de DNA existentes ou adquirindo novas sequências de DNA de populações vizinhas, enquanto a deriva genética diminui o nível de variações genéticas. A seleção pode aumentar ou diminuir a variação genética das populações de patógenos, dependendo do tipo de seleção que atua sobre elas (ZHAN, 2016). Conseqüentemente, a estrutura genética é determinada pela história evolutiva dessa população, fornecendo uma visão dos processos evolutivos que a moldaram no passado e proporcionando o conhecimento do potencial evolutivo futuro das populações de patógenos (MCDONALD; LINDE, 2002).

As ferramentas utilizadas em estudos de genética de população fornecem informações sobre o potencial adaptativo e evolutivo de um patógeno, e permitem determinar o tipo de reprodução em microrganismos (BEGOUDE et al., 2012). Durante a década de 60, as aloenzimas (variantes alélicas de uma enzima codificada por um gene de cópia única) foram reconhecidas como excelentes marcadores para uso em trabalhos de variabilidade genética envolvendo populações de fitopatógenos. Em meados dos anos 80 surgiram os marcadores moleculares, que no final dos anos 80 e início dos anos 90, mudaram o rumo das pesquisas com o desenvolvimento de marcadores baseados em procedimentos utilizando PCR (reação em cadeia da polimerase). Atualmente, marcadores de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) e marcadores de sequências simples repetidas ou microsatélites (SSR) são os mais

empregados e reconhecidos como excelentes marcadores para estudos de genética de populações (MILGROOM, 2015; MIZUBUTI; CERESINI, 2018).

Os SSR são repetições, em *tandem*, de 1 a 6 nucleotídeos que formam regiões repetitivas genômicas (JONES et al., 2009). São marcadores extremamente úteis por apresentarem codominância e possuírem taxa de mutações elevadas, o que os tornam altamente polimórficos (VARSHINEY; GRANER; SORRELLS, 2005). Nesse sentido, os SSR são muito valiosos para as análises genéticas de população devido à sua taxa de evolução mais rápida, que os tornam mais sensíveis aos recentes eventos filogeográficos e demográficos, revelando frequentemente a divergência clonal em populações recentemente estabelecidas (SELKOE; TOONEN, 2006).

Marcadores SSR têm sido utilizados para examinar genes e genótipos, tipos de reprodução e especiação de vários fungos dentro da família Botryosphaeriaceae (BASKARATHEVAN et al., 2012; BEGOUGE et al., 2012; MANAWASINGHE et al., 2018; MOHALI; BURGESS; WINGFIELD, 2005; PAVLIC-ZUPANC et al., 2015). No entanto, estudos envolvendo a genética populacional de *L. theobromae* são escassos. Uma investigação, usando marcadores SSR, com isolados da Venezuela, México e África do Sul, sugere que existem barreiras geográficas para a troca de genes entre *L. theobromae*. Além disso, foi observado um baixo número de genótipos nas populações da África do Sul e da Venezuela, os quais apresentaram baixa diversidade genotípica e nenhuma evidência de especificidade aos hospedeiros (MOHALI; BURGESS; WINGFIELD, 2005). Shah et al., (2011) analisaram 30 isolados de *L. theobromae* de cultivos de pera, na Índia, e encontraram uma alta diversidade genética entre os isolados de diferentes zonas geográficas e pouca diversidade genética entre os isolados da mesma zona geográfica. Apesar da elevada importância desta espécie como patógeno de culturas de importância econômica para o país (COUTINHO et al., 2017; NETTO et al., 2017; MARQUES et al., 2013; CORREIA et al., 2016), a diversidade genética dos isolados de *L. theobromae* encontrados no Brasil ainda não foi estudada.

A diversidade genética é influenciada pela contribuição relativa da reprodução assexuada e sexual de uma espécie, onde indivíduos que se reproduzem sexualmente normalmente tem uma população geneticamente mais diversificada do que aqueles que se reproduzem assexuadamente (CORTESI; MILGROOM, 2001). A reprodução de espécies da família Botryosphaeriaceae é predominantemente assexuada no campo (PHILLIPS, 2002), com raros relatos de reprodução sexual (VAN NIEKERK et al., 2006). Por exemplo, Mohali et al. (2005) observaram em seu estudo que populações de *L. theobromae* apresentavam reprodução clonal e fluxo de genes frequente. No entanto, Begoude et al. (2012) ao estudar *L. theobromae* de plantas nativas e não nativas evidenciaram possível recombinação entre as populações.



A recombinação em fungos para os quais não existe um estado sexual conhecido tem sido observada e reconhecida. *Cercospora beticola* Sacc. (GROENEWALD et al., 2008), *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., *Fusarium oxysporum* Schlecht. Emend. Snyder & Hansen (ARIE et al., 2000), *Aspergillus nidulans* (Eidam) G. Winter (GEISER; ARNOLD; TIMBERLAKE, 1994) e *D. seriata* (BIHON et al., 2011) são fungos assexuados em que a recombinação enigmática foi relatada. Acredita-se que estes eventos possam surgir de um estado sexual ainda não descoberto ou de um ciclo parassexual (TAYLOR; JACOBSON; FISHER, 1999). Estudos de genética populacional podem fornecer evidências de ocorrência de sexo críptico em fungos filamentosos em que a reprodução sexuada não foi relatada anteriormente (KUCK; POGGELER, 2009).

O conhecimento da dinâmica das populações de patógenos de plantas, incluindo a diversidade genética e modos de reprodução, permitem uma compreensão sobre o potencial para a mudança evolutiva (MCDONALD, 1997). Além disso, o estudo da diversidade genética pode ajudar a compreender as origens e estrutura populacional de microrganismos, resolvendo questões relativas a variação, tais como patogenicidade e agressividade de patógenos, e prever possíveis movimentos do patógeno, visando desenvolver estratégias de manejo mais efetivas (QIU et al., 2015).

Em 2003, Burgess; Wingfield e Wingfield desenvolveram oito marcadores SSR para *L. theobromae*, usando métodos de clonagem e sequenciamento, com base em um isolado de *L. theobromae*. Até à data, nenhum desses marcadores SSR potencialmente úteis foram aplicados para analisar a estrutura populacional de *L. theobromae* no Brasil. Informações sobre a genética de *L. theobromae* nas diversas regiões produtoras de frutas tropicais são de extrema importância, visando a prevenção e manejo das doenças, uma vez que estas medidas são específicas para cada patógeno. Além disso, devido a sua importância como patógeno global e polífago, torna-se indispensável para o manejo das doenças causadas por *L. theobromae* o conhecimento da sua diversidade genética, bem como a distribuição da sua população.

Diante disso, os objetivos desta tese foram (i) identificar espécies de *Lasiodiplodia* associadas à morte descendente da videira em áreas de clima tropical com verão seco e clima semiárido do Nordeste do Brasil, (ii) determinar a prevalência da distribuição de cada espécie, (iii) caracterizar isolados em termos de patogenicidade e agressividade usando mudas de videira (cv. Isabel), (iv) determinar a diversidade e estrutura das populações de *L. theobromae* obtidas do Brasil e do México (v) inferir sobre o modo de reprodução de *L. theobromae*. Estas informações fornecerão importantes esclarecimentos sobre o panorama atual de patógenos causando a morte descendente em videiras no Nordeste brasileiro, bem como o conhecimento

das características genéticas de populações de *L. theobromae* no Nordeste do Brasil. Com essas informações esperasse auxiliar no combate a estes agentes, visando a redução da ocorrência de doenças no campo, a partir da aplicação de estratégias efetivas de manejo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, A.; CROUS, P. W.; CORREIA, A.; PHILLIPS, A. J. L. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. **Fungal Diversity**, Kunning, v. 28, n. 1, p. 1-13, 2008.
- AMORIN, L.; SPÓSITO, M. B.; KUNIYUKI, H. Doenças da videira. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. v. 2, p. 745-758.
- ARATA, L.; HAUSCHILD, S.; SCKOKAI, P. Economic and social impact of grape growing in Northeastern Brazil. **Bio-based and Applied Economics**, Firenze, v. 6, n. 3, p. 279-293, 2017.
- ARIE, T.; KANEKO, I.; YOSHIDA, T.; NOGUCHI, M.; NOMURA, Y.; YAMAGUCHI, I. Mating-type genes from asexual phytopathogenic ascomycetes *Fusarium oxysprum* and *Alternaria alternata*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, London, v. 13, n. 12, p. 1330–1339, 2000.
- BARBOSA, M. A. G.; CASTRO, J. M. C.; TERAPO, D.; LIMA, M. F.; BATISTA, D. C.; TAVARES, S. C. C. H. DOENÇAS. In: LEÃO, P. C. S.; SOARES, J. M. (Eds.). **Cultivo da videira**. 2. ed. [online] Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/CultivodaVideira\\_2ed/doencas.html](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/CultivodaVideira_2ed/doencas.html)> Acesso em: 05 jul. 2018.
- BASKARATHEVAN, J.; JASPERS, M. V.; JONES, E. E.; CRUICKSHANK, R. H.; RIDGWAY, H. J. Genetic and pathogenic diversity of *Neofusicoccum parvum* in New Zealand vineyards. **Fungal Biology**, Manchester, v. 116, n. 2, p. 276-288, 2012.
- BEGOUDE, A. D. B.; SLIPPERS, B.; PEREZ, G.; WINGFIELD, M. J.; ROUX, J. High gene flow and outcrossing within populations of two cryptic fungal pathogens on a native and non-native host in Cameroon. **Fungal Biology**, Manchester, v. 116, n. 3, p. 343-353, 2012.
- BIHON, W.; SLIPPERS, B.; BURGESS, T.; WINGFIELD, M. J.; WINGFIELD, B. D. Diverse sources of infection and cryptic recombination revealed in South African *Diplodia pinea* populations. **Fungal Biology**, Manchester, v. 41, n. 1, p. 41-46, 2011.
- BILLONES-BAAIJENS, R.; JASPERS, M.; ALLARD, A.; HONG, Y.; RIDGWAY, H.; JONES, E. Management of Botryosphaeriaceae species infection in grapevine propagation materials. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 54, n. 2, p. 355-367, 2015.
- BRASIER, C. M.; KIRK, S. A. Rapid emergence of hybrids between the two subspecies of *Ophiostoma novo-ulmi* with a high level of pathogenic fitness. **Plant Pathology**, London, v. 59, n. 1, p. 186-199, 2010.
- BURGESS, T. I.; BARBER, P. A.; MOHALI, S.; PEGG, G.; DE BEER, W.; WINGFIELD, M. J. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. **Mycologia**, Bronx, v. 98, n. 3, p.423-435, 2006.

BURGESS, T. I.; CROUS, C. J.; SLIPPERS, B.; HANTULA, J.; WINGFIELD, M. J. Tree invasions and biosecurity: Eco-evolutionary dynamics of hitchhiking fungi. **AoB Plants**, Oxford, v. 8, p. lw076, 2017. DOI: 10.1093/aobpla/plw076.

BURGESS, T. I.; WINGFIELD, M. J.; WINGFIELD, B. D. Development and characterization of microsatellite loci for the tropical tree pathogen *Botryosphaeria rhodina*. **Molecular Ecology**, London, v. 3, p. 91-94, 2003.

CAMARGO, U. A.; TONIETTO, J.; HOFFMANN, A. Progressos na viticultura brasileira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, volume especial, p. 144-149, 2011.

CARVALHO, C.; TREICHEL, M.; BELING, R. R. **Anuário brasileiro da uva 2016**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2016. 64 p.

CODEVASF (Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba). **Exportação de uva deve crescer 25% em projeto da Codevasf no semiárido baiano**. Disponível em: <<http://www.codevasf.gov.br/noticias/2014/exportacao-de-uva-deve-crescer-30-em-projeto-da-codevasf-no-semiarido-baiano/>>. Acesso em: 05 jul. 2018.

COMPANT, S.; BRADER, G.; MUZAMMIL, S.; SESSITSCH, A.; LEBRIHI, A.; MATHIEU, F. Use of beneficial bacteria and their secondary metabolites to control grapevine pathogen diseases. **BioControl**, Dordrecht, v. 58, n. 4, p. 435-455, 2013.

COPEES, W. E.; HENDRIX JR., F.F. Effect of temperature on sporulation of *Botryosphaeria dothidea*, *B. obtusa* and *B. rhodina*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 88, n. 3, p. 292-296, 2004.

CORREIA, K. C.; SILVA, M. A.; MORAIS JÚNIOR, M. A.; ARMENGOL, J.; PHILLIPS, A. J. L.; CÂMARA, M. P. S.; MICHEREFF, S. J. Phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of table grape in the main Brazilian exporting region. **Plant Pathology**, London, v. 65, n. 1, p. 92-103, 2016.

CORTESI, P.; MILGROOM, M. G. Outcrossing and diversity of vegetative compatibility types in populations of *Eutypa lata* from grapevines. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 83, n. 1, p. 79-86, 2001.

COUTINHO, I. B. L.; FREIRE, F. C. O.; LIMA, C. S.; LIMA, J. S.; GONÇALVES, F. J. T.; MACHADO, A. R.; SILVA, A. M. S.; CARDOSO, J. E. Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. **Plant Pathology**, London, v. 66, n. 1, p. 90-104, 2017.

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

CROUS, P. W.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; RHEEDER, J.; MARASAS, W. F. O.; PHILLIPS, A. J. L.; ALVES, A.; BURGESS, T.; BARBER, P.; GROENEWALD, J. Z. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 55, p. 239-257, 2006.

CRUYWAGEN, E. M.; SLIPPERS, B.; ROUX, J.; WINGFIELD, M. J. Phylogenetic species recognition and hybridisation in *Lasiodiplodia*: a case study on species from baobabs. **Fungal Biology**, Manchester, v. 121, n. 4, p. 420-436, 2017.

DECOIN, M. Grapevine products: news on withdrawals and restrictions. **Phytoma**, Paris, v. 543, p. 28-33, 2001.

DEPOTTER, J. R. L.; SEIDL, M. F.; WOOD, T. A.; THOMMA, B. P. H. J. Interspecific hybridization impacts host range and pathogenicity of filamentous microbes. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v. 32, p. 7-13, 2016.

EPA (United States Environmental Protection Agency). **The Montreal Amendment (1997) to the Montreal Protocol Agreement (1987)**. Disponível em: <<https://www.epa.gov/ozone-layer-protection/international-treaties-and-cooperation>>. Acesso em 05 jul. 2018.

FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. **Fungal databases**. Beltsville: U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA, 2018. Disponível em:<<https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>>. Acesso em 05 jul. 2018.

FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P. (Eds.). **Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. 687 p.

FREIRE, F. C. O.; VIANA, F. M. P.; CARDOSO, J. E.; SANTOS, A. A. **Novos hospedeiros do fungo *Lasiodiplodia theobromae* no estado do Ceará**. Fortaleza, Embrapa Agroindústria Tropical, 2004. 6 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 91).

GARRIDO, L. R.; GAVA, R.; CAROLLO, L. A. **Podridão-descendente da videira na região Sul do Brasil**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2017. 12 p. (Embrapa Uva e Vinho. Circular Técnica, 135).

GARRIDO, L. R.; GAVA, R.; URBEN, A. F.; RITSCHER, P. S. Podridão-descendente da videira no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 44. 2011. Bento Gonçalves. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 36, Suplemento, p. 33-34, 2011.

GEISER, D. M.; ARNOLD, M. L.; TIMBERLAKE, W. E. Sexual origins of British *Aspergillus nidulans* isolates. **Proceedings of the National Academic Science of USA**, Washington, v. 91, n. 6, p. 2349–2352, 1994.

GIOVANNINI, E. **Produção de uvas para vinho, suco e mesa**. Porto Alegre: Renascença, 1999. 364 p.

GLADIEUX, P.; VERCKEN, E; FONTAINE, M. C.; HOOD, M. E.; JONOT, O.; COULOUX, A.; GIRAUD, T. Maintenance of fungal pathogen species that are specialized to different hosts: allopatric divergence and introgression through secondary contact. **Molecular Biology and Evolution**, Amsterdam, v. 28, n.1, p. 459-471, 2011.

GRAMAJE, D.; ÚRBEZ-TORRES, J. R.; SOSNOWSKI, M.R. Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: current strategies and future prospects. **Plant Disease**, St. Paul, v. 102, p. 12-39, 2018.

GROENEWALD. M.; LINDE, C. C.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Indirect evidence for sexual reproduction in *Cercospora beticola* populations from sugar beet. **Plant Pathology**, London, v. 57, p. 25–32, 2008.

HALLEEN, F.; FOURIE, P. H. An integrated strategy for the proactive management of grapevine trunk disease pathogen infections in grapevine nurseries. **South African Journal of Enology and Viticulture**, Stellenbosch, v. 37, p. 104-114, 2016.

HAMMOND-KOSACK, K.; JONES, J. D. G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1102-1156.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Sistema IBGE de recuperação automática** [online]. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2018. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457#resultado>>. Acesso em: 05 jul. 2018.

INDERBITZIN, P.; DAVIS, R. M.; BOSTOCK, R. M.; SUBBARAO, K. V. The ascomycete *Verticillium longisporum* is a hybrid and a plant pathogen with an expanded host range. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, p. e18260, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0018260.

ISMAIL, A. M.; CIRVILLERI, G.; POLIZZI, G.; CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z.; LOMBARD, L. *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica*) in Egypt. **Australasian Plant Pathology**, Canberra, v. 41, n. 6, p. 649-660, 2012.

JONES, N.; OUGHAM, H.; HOWARD, T.; PAŠAKINSKIENĖ, I. Markers and mapping revisited: finding your gene. **New Phytologist**, Oxford, v. 183, n. 4, p. 935-966, 2009.

KARAPAPA, V. K.; BAINBRIDGE, B. W.; HEALE, J. B. Morphological and molecular characterization of *Verticillium longisporum* comb. nov., pathogenic to oilseed rape. **Mycological Research**, London, v. 101, p. 1281-1294, 1997.

KUCK, U.; POGGELER, S. Cryptic sex in fungi. **Fungal Biology Reviews**, Manchester, v. 23, n. 3, p. 86-90, 2009.

LARIGNON, P.; DUBOS, B. The villainy of Black Dead Arm. **Wines & Vines**, Ste. A San Rafael, v. 82, n. 3, p. 86-89, 2001.

LAWRENCE, D. P.; TRAVADON, R.; MIZUHO, N.; BAUMGARTNER, K. TrunkDiseaseID.org: A molecular database for fast and accurate identification of fungi commonly isolated from grapevine wood. **Crop Protection**, Oxford, v.102, p. 110-117, 2017.

LAZZAROTTO, J. J.; FIORAVANÇO, J. C. Tendências e sazonalidades nas exportações e importações brasileiras de uva de mesa. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 43-58, 2013.

LEÃO, P. C. S. Cultivares. In: LEÃO, P. C. S.; SOARES, J. M. (Eds.). **Cultivo da videira**. 2. ed. [online] Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/CultivodaVideira\\_2ed/cultivares.html](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/CultivodaVideira_2ed/cultivares.html)> Acesso em: 05 jul. 2018.

LEHOCZKY, J. Black Dead-arm disease of grapevine caused by *Botryosphaeria stevensii* infection. **Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae**, Budapest, v. 9, n. 3/4, p. 319-327, 1974.

LEHOCZKY, J. Black dead arm. In: PEARSON, R. C. GOHEEN, A. C. (Eds.). **Compendium of grapes diseases**. St. Paul: APS Press, 1988. p. 35.

- LIMA, J. S.; CARDOSO, J. E.; MOREIRA, R. C.; ALVES, E. S.; MELO, J. G. M. Caracterização cultural de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* e patogenicidade em plantas de aceroleira. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 6, n. 1, p. 10-16, 2012.
- LIMA, J. S.; MOREIRA, R. C.; CARDOSO, J. E.; MARTIN, M. V. V.; VIANA, F. M. P. Caracterização cultural, morfológica e patogênica de *Lasiodiplodia theobromae* associado a frutíferas tropicais. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 39, n. 2, p. 81-88, 2013.
- LORRAIN, B.; KY, I.; PASQUIER, G.; JOURDES, M.; GUERIN-DUBRANA, L.; GENY, L.; REY, P.; DONECHE, B.; TEISSEDE, P. L. Effect of Esca disease on the phenolic and sensory attributes of Cabernet Sauvignon grapes, musts and wines. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Canberra, v. 18, p. 64-72, 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**, Kunming, v. 67, n. 1, p. 231-47, 2014.
- MANAWASINGHE, I. S.; ZHANG, W.; LI, X.; ZHAO, W.; CHETHANA, W. K. T.; XU, J.; CHEN, Z.; DISSANAYAKA, A. J.; MUGNAI, L.; ÚRBEZ-TORRES, J. R.; SAVOCCHIA, S.; HYDE, K. D.; YAN, J. Novel microsatellite markers reveal multiple origins of *Botryosphaeria dothidea* causing the Chinese grapevine trunk disease. **Fungal Ecology**, London, v. 33, p. 134-142, 2018.
- MARQUES, M. W.; LIMA, N. B.; MORAIS JUNIOR, M. A.; BARBOSA, M. A. G.; SOUZA, B. O.; MICHEREFF, S. J.; PHILLIPS, A. J. L.; CÂMARA, M. P. S. Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 61, n. 1, p. 181-193, 2013.
- MARTELLI, G. P. Infectious diseases and certification of grapevine. **Options Méditerranéennes**, Montpellier, v. 29, n. 29, p. 47-64, 1997.
- MCDONALD, B. A. The population genetics of fungi: tools and techniques. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n. 4, p. 448-453 1997.
- MCDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 349-379, 2002.
- MCDONALD, B. A.; ZHAN, J.; BURDON, J. J. Genetic structure of *Rhynchosporium secalis* in Australia. **Phytopathology**, St. Paul, v. 89, n. 8, p. 639-645, 1999.
- MEHL, J. W. M.; SLIPPERS, B.; ROUX, J.; WINGFIELD, M. J. Cankers and other diseases caused by the Botryosphaeriaceae. In: GONTHIER, P.; NICOLOTTI, G. (Eds.). **Infectious forest diseases**. Wallingford: CAB International, 2013. p. 298-317.
- MEHL, J. W.; SLIPPERS, B.; ROUX, J.; WINGFIELD, M. J. Overlap of latent pathogens in the Botryosphaeriaceae on a native and agricultural host. **Fungal Biology**, Manchester, v. 121, n. 4, p. 405-419, 2017.
- MILGROOM, M. G. **Population biology of plant pathogens: genetics, ecology and evolution**. St. Paul, APS Press, 2015. 399 p.

- MIZUBUTI, E. S. G.; CERESINI, P. C. Biologia de populações de fitopatógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018. v. 1, p. 481-496.
- MOHALI, S.; BURGESS, T. I.; WINGFIELD, M. J. Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. **Forest Pathology**, Hamburg, v. 35, n. 6, p. 385–396, 2005.
- MUGNAI, L.; GRANITI, A.; SURICO, G. Esca (black measles) and brown wood-streaking: two old and elusive diseases of grapevines. **Plant Disease**, St. Paul, v. 83, n. 5, p. 404-418, 1999.
- MYCOBANK. **Fungal databases: nomenclature and species bank** [online]. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center, 2018. Disponível em: <<http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&Page=200&ViewMode=Basic>> Acesso em: 05 jul. 2018.
- NETTO, M. S. B.; ASSUNÇÃO, I. P.; LIMA, G. S. A.; MARQUES, M. W.; LIMA, W. G.; MONTEIRO, J. H. A.; MICHEREFF, S. J.; PHILLIPS, A. J. L.; CÂMARA, M. P. S. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. **Fungal Diversity**, Kunning, v. 67, n. 1, p. 127-141, 2014.
- NETTO, M. S. B.; LIMA, W. G.; CORREIA, K. C.; SILVA, C. F. B. D.; THON, M.; MARTINS, R. B.; MILLER, R. N. G.; MICHEREFF, S. J.; CÂMARA, M. P. S. Analysis of phylogeny, distribution, and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with gummosis of *Anacardium* in Brazil, with a new species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Biology**, Manchester, v. 121, p. 437–451, 2017.
- PAVLIC, D.; SLIPPERS, B.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, M. J. Botryosphaeriaceae occurring on native *Syzygium cordatum* in South Africa and their potential threat to *Eucalyptus*. **Plant Pathology**, London, n.4, v. 56, p. 624-636, 2007.
- PAVLIC-ZUPANC, D.; WINGFIELD, M. J.; BOISSIN, E.; SLIPPERS, B. The distribution of genetic diversity in the *Neofusicoccum parvum/N. ribis* complex suggests structure correlated with level of disturbance. **Fungal Ecology**, London, v. 13, p. 93-102, 2015.
- PHILLIPS, A. J. L. *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 41, n. 1, p. 3-18, 2002.
- PHILLIPS, A. J. L.; ALVES, A.; ABDOLLAHZADEH, J.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 76, p. 51-167, 2013.
- PITT, W. M.; HUANG, R.; STEEL, C. C.; SAVOCCHIA, S. Pathogenicity and epidemiology of Botryosphaeriaceae species isolated from grapevines in Australia. **Australasian Plant Pathology**, Canberra, v. 42, p. 573-582, 2013.
- PITT, W. M.; ÚRBEZ-TORRES, J. R.; TROUILLAS, F. P. *Dothiorella* and *Spencermartinsia*, new species and records from grapevines in Australia. **Australasian Plant Pathology**, Canberra, v. 44, p. 43-56, 2015.



- PITT, W. M.; ÚRBEZ-TORRES, J. R.; TROUILLAS, F. P. *Dothiorella vidmadera*, a novel species from grapevines in Australia and notes on *Spencermartinsia*. **Fungal Diversity**, Kunning, v. 61, n. 1, p. 209-219, 2013.
- QIU, Y.; STEEL, C. C.; ASH, G. J.; SAVOCCHIA, S. Hierarchical genetic variation of Botryosphaeriaceae species associated with decline and dieback of grapevine in south-eastern Australia. **Australian journal of grape and wine research**, Canberra, v. 21, n. 3, p. 458-467, 2015.
- REETZ, E. R.; KIST, B. B.; SANTOS, C. E.; CARVALHO, C.; DRUM, M. (Eds.). **Anuário brasileiro da fruticultura 2015**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2015. 108 p.
- ROLSHAUSEN, P. E., ÚRBEZ-TORRES, J. R.; ROONEY-LATHAM, S.; ESKALEN, A.; SMITH, R. J.; GUBLER, W. D. Evaluation of pruning wound susceptibility and protection against fungi associated with grapevine trunk diseases. **American Journal of Enology and Viticulture**, Sand Diego, v. 61: n. 1, p. 113-119, 2010.
- ROLSHAUSEN, P. E.; AKGÜL, D. S.; PEREZ, R.; ESKALEN, A.; GISPERT, C. First report of wood canker caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on grapevine in California. **Plant Disease**, St. Paul, n. 1, v. 97, p. 1511, 2013.
- ROSADO, A. W. C.; MACHADO, A. R.; FREIRE, F. O.; PEREIRA, O. L. Phylogeny, identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia* associated with postharvest stem-end rot of coconut in Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 100, n. 3, p. 561-568, 2016.
- SELKOE, K. A.; TOONEN, R. J. Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, London, v. 9, n. 5, p. 615-629, 2006.
- SHAH, M.; VERMA, K. S.; KULDEEP, S.; RATINDERBIR, K. Genetic diversity and gene flow estimates among three populations of *Botryodiplodia theobromae* causing die-back and bark canker of pear in Punjab. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, Berlin, v. 44, n. 10, p. 951-960, 2011.
- SILVA, P. C. G.; COELHO, R. C. Caracterização social e econômica da cultura da videira. In: LEÃO, P. C. S.; SOARES, J. M. (Eds.). **Cultivo da videira**. 2. ed. [online] Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/CultivodaVideira\\_2ed/Cara cterizaca\\_social\\_da\\_%20videira.html](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/CultivodaVideira_2ed/Cara cterizaca_social_da_%20videira.html)> Acesso em: 05 jul. 2018.
- SLIPPERS, B.; CROUS, P. W.; JAMI, F.; GROENEWALD, J. Z.; WINGFIELD, M. J. Diversity in the Botryosphaeriales: Looking back, looking forward. **Fungal Biology**, Manchester, v. 121, p. 307–321, 2017.
- SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. **Fungal Biology Reviews**, Cambridge, v. 21, n. 2, p. 90-106, 2007.
- SÔNEGO, O. R.; GARRIDO, R. L.; GRIGOLETT JÚNIOR. **Principais doenças fúngicas da videira no Sul do Brasil**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2005. 32 p. (Embrapa Uva e Vinho. Circular Técnica, 56).
- SOSNOWSKI, M. R.; WICKS, T. W.; SCOTT, E. S. Control of *Eutypa* dieback in grapevines using remedial surgery. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 50, p. 277-284, 2011.

SOSNOWSKI, M.; EDWARDS, J.; WICKS, T.; SCOTT, E.; LARDNER, R. What's happening in the world of grapevine trunk diseases? **The Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker**, v. 35. p. 18-21. 2005.

STEVENS, N. E. The life history and relationships of *Diplodia gossypina*. **Mycologia**, Bronx, v. 17, n. 5, p. 191-201, 1925.

TAVARES, S. C. C. H.; LIMA, V. C. **A indicação geográfica da uva de São Vicente Ferrer e Macaparana – PE a partir das pesquisas da Embrapa**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos UEP Nordeste, 2009. 10 p. (Embrapa Solos UEP Nordeste. Circular Técnica, 43).

TAYLOR, J. W.; JACOBSON, D. J.; FISHER, M. C. The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 197–246, 1999.

TAYLOR, J. W.; JACOBSON, D. J.; KROKEN, S.; KASUGA, T.; GEISER, D. M.; HIBBETT, D. S.; FISHER, M. C. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v. 31, n. 1, p. 21-32. 2000.

TEIXEIRA, A. D. C.; BASTIAANSEN, W. G. M.; BASSOI, L. H. Crop water parameters of irrigated wine and table grapes to support water productivity analysis in the Sao Francisco river basin, Brazil. **Agricultural Water Management**, Dordrecht, v. 94, n. 1, p. 31-42, 2007.

ÚRBEZ-TORRES, J. R. The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 50, Supplement, p. S5-S45, 2011.

ÚRBEZ-TORRES, J. R.; GUBLER, W. D. Pathogenicity of Botryosphaeriaceae spp. isolated from grapevine cankers in California. **Plant Disease**, St. Paul, v. 93, p. 584-592, 2009.

ÚRBEZ-TORRES, J. R.; GUBLER, W. D. Susceptibility of grapevine pruning wounds to infection by *Lasiodiplodia theobromae* and *Neofusicoccum parvum*. **Plant Pathology**, London, v. 6, n. 2, p. 261-270, 2011.

ÚRBEZ-TORRES, J. R.; LEAVITT, G. M.; VOEGEL, T.; GUBLER, W. D. Identification and distribution of *Botryosphaeria* species associated with grapevine cankers in California. **Plant Disease**, St. Paul, v. 90, n. 12, p. 1490-1503, 2006.

ÚRBEZ-TORRES, J. R.; LEAVITT, G.M.; GUERRERO, J. C.; GUEVARA, J.; GUBLER, W. D. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of Bot canker disease of grapevines in Mexico. **Plant Disease**, St. Paul, v. 92, n. 4, p. 519-529, 2008.

ÚRBEZ-TORRES, J. R.; PEDUTO, F.; STRIEGLE, R. K.; URREA-ROMER, J. E. O.; RUPE, J. C.; CARTWRIGHT, R. D.; GUBLER, W. D. Characterization of fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Arkansas and Missouri. **Fungal Diversity**, Kunning, v. 52, n. 1, p. 169-189, 2012.

VAN NIEKERK, J. M.; CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z.; FOURIE, P. H.; HALLEEN, F. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. **Mycologia**, Bronx, v. 96, n. 4, p. 781-798, 2004.

VAN NIEKERK, J. M.; FOURIE, P. H.; HALLEN, F.; CROUS, P. *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 45, n. 1, p.

43-54, 2006.

VAN NIEKERK, J.; STREVER, A.; DU TOIT, G.; HALLEEN, F.; FOURIE, P. Influence of water stress on Botryosphaeriaceae disease expression in grapevines. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 50, p. S151-S165, 2011.

VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, M. E. Genomics assisted breeding for crop improvement. **Trends in Plant Science**, Cambridge, v. 10, n. 12, p. 621-630, 2005.

WILCOX, W. F.; GUBLER, W. D.; UYEMOTO, J. K. (Eds.). **Compendium of grape diseases, disorders, and pests**. 2. ed. St. Paul: APS Press, 2015. 232 p.

YAN, J.-Y., XIE, Y., ZHANG, W., WANG, Y., LIU, J.-K., HYDE, K. D., SEEM, R. C., ZHANG, G. Z., WANG, Z.-Y., YAO, S.-W., BAI, X.-J., DISSANAYAKE, A. J., PENG, Y.-L., AND LI, X.-H. Species of Botryosphaeriaceae involved in grapevine dieback in China. **Fungal Diversity**, Kunning, v. 61, n. 1, p. 221-236, 2013.

YANG, T.; GROENEWALD, J. Z.; CHEEWANGKON, R.; JAMI, F.; ABDOLLAHZADEH, J.; LOMBARD, L.; CROUS, P. W. Families, genera, and species of Botryosphaeriales. **Fungal Biology**, Manchester, v. 121, n. 4, p. 322-346, 2017.

ZHAN, J. Population genetics of plant pathogens. In: **Encyclopedia of life sciences**. Chichester: John Wiley & Sons, 2016. p. 1-7. DOI: 10.1002/9780470015902.a0021269.pub2

## Capítulo II

---

---

### **Espécies de *Lasiodiplodia* associadas à morte descendente em videira no Nordeste do Brasil**

1 **Espécies de *Lasiodiplodia* associadas à morte descendente em videira no**  
2 **Nordeste do Brasil**

3  
4 **Tamiris J. S. Rêgo • Fábio J. A. Silva • Kledson M. Santos • Kamila C. Correia • Marcos P.**  
5 **S. Câmara • Sami J. Michereff**

6  
7 T. J. S. Rêgo • F. J. A. Silva • K. M. Santos • M. P. S. Câmara  
8 Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife, PE,  
9 Brazil

10  
11 K. C. Correia • S. J. Michereff (✉)  
12 Centro de Ciências Agrárias e da Biodiversidade, Universidade Federal do Cariri, 63133-610,  
13 Crato, CE, Brazil  
14 sami.michereff@ufca.edu.br

15  
16 ORCID  
17 Sami J. Michereff - <http://orcid.org/0000-0002-2156-3502>

18 **Resumo** Noventa e quatro isolados de *Lasiodiplodia* obtidos de ramos e troncos de videiras com  
19 cancos em forma de cunha no tecido vascular, coletados entre 2011 e 2014 em três polos de  
20 produção (Vale do São Francisco, Vale do Siriji e Vale do Jaguaribe) e cinco municípios de três  
21 estados do Nordeste do Brasil (Bahia, Ceará e Pernambuco), foram analisados quanto a filogenia  
22 molecular e patogenicidade. Os isolados de *Lasiodiplodia* foram identificados a partir de dados de  
23 sequências para os genes do fator de elongação (*tef1- $\alpha$* ) e da região espaçadora transcrita interna  
24 do rDNA (ITS), sendo identificados seis espécies (*L. crassispora*, *L. euphorbicola*, *L.*  
25 *hormozganensis*, *L. iraniensis*, *L. pseudotheobromae* e *L. theobromae*) e dois híbridos (*L.*  
26 *xbrasiliense* e *L. xlaeliocatlelyae*). *Lasiodiplodia theobromae* e *L. pseudotheobromae* foram as  
27 espécies mais prevalentes. Todas as espécies foram patogênicas a videiras, com *L. hormozganensis*,  
28 *L. iraniensis* e *L. euphorbicola* sendo as mais agressivas e *L. theobromae*, *L. pseudotheobromae* e  
29 *L. xbrasiliense* as menos agressivas. O conhecimento dos patógenos associados a morte  
30 descendente da videira no Nordeste do Brasil é extremamente importante para o desenvolvimento  
31 de estratégias eficazes de manejo, pois até o momento não existe uma medida efetiva de controle  
32 desenvolvida, devido ao grande número de patógenos associados a doenças no tronco da videira.

33

34 **Palavras-chave** Agressividade • Botryosphaeriaceae • filogenia • patogenicidade • *Vitis*

35

## 36 **Introdução**

37

38 A região Nordeste do Brasil se destaca como importante produtora e exportadora de uvas finas de  
39 mesa. Em 2017 foram produzidas 444.958 t da fruta em 11.462 ha, respondendo por 99% das  
40 exportações brasileiras de uvas finas de mesa (IBGE 2018). O cultivo da videira exige alto

41 investimento financeiro inicial, desde o seu estabelecimento até as diversas operações anuais  
42 essenciais para a produção da uva, sendo parte deste investimento atribuído aos programas de  
43 manejo de doenças e pragas (Wunderlich et al. 2015). Pelo menos 29 doenças de origem fúngica  
44 afetam a videira (Wilcox et al. 2015), incluindo as que atingem o tronco (Bertsch et al. 2013).

45 Doenças do tronco da videira afetam a produção de uvas globalmente e são consideradas  
46 muito destrutivas (Bertsch et al. 2013). Dentre estas, a morte descendente é uma importante doença  
47 que acomete o tronco da videira em diversas partes do mundo (Correia et al. 2016; Martin & Cobos  
48 2007; Pitt et al. 2013; Rolshausen et al. 2013; Úrbez-Torres 2011; Úrbez-Torres et al. 2008, Van  
49 Niekerk et al. 2004; Yan et al. 2013). Caracterizada por cancrios em forma de cunha no tecido  
50 vascular das videiras infectadas, os sintomas são geralmente observados em vinhedos maduros,  
51 com mais de oito anos de idade (Gramaje et al. 2018). No entanto, já foram observados sintomas  
52 da doença em videiras com três a cinco anos de idade (Úrbez-Torres et al. 2008).

53 Até o momento, 26 espécies da família Botryosphaeriaceae foram identificadas como agentes  
54 causais da morte descendente na videira, pertencentes aos gêneros *Botryosphaeria*, *Diplodia*,  
55 *Dothiorella*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium*, *Phaeobotryosphaeria* e  
56 *Spencermartinsia* (Pitt et al. 2013; Úrbez-Torres 2011; Yang et al. 2017).

57 Apesar da importância da região Nordeste como produtora e exportadora brasileira de uvas  
58 finas de mesa, os estudos envolvendo a caracterização dos agentes causais da morte descendente  
59 são escassos. Em 2013, apesar do reduzido número de amostras (16), foi constatado que seis  
60 espécies de Botryosphaeriaceae estavam associadas à doença no Nordeste brasileiro  
61 (*Botryosphaeria mamane*, *L. crassipora*, *L. parva*, *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae* e  
62 *Neofusicoccum parvum*), levando ao primeiro relato desses fitopatógenos infectando vinhedos no  
63 Brasil, com exceção de *L. theobromae* (Correia et al. 2013). Posteriormente, em uma amostragem

64 mais ampla no Vale do São Francisco, principal polo de produção de uvas finas de mesa no  
65 Nordeste brasileiro, foram obtidos 112 isolados de *Lasiodiplodia*, sendo constatado que oito  
66 espécies (*L. brasiliense*, *L. crassispora*, *L. egyptiaca*, *L. euphorbicola*, *L. hormozganensis*, *L.*  
67 *jatrophicola*, *L. pseudotheobromae* e *L. theobromae*) causavam a morte descendente (Correia et al.  
68 2016).

69 O gênero *Lasiodiplodia* é reconhecido como um membro importante da família  
70 Botryosphaeriaceae, tendo sido descritas 38 espécies até o momento (Philips et al. 2013; Slippers  
71 et al. 2017). Além disso, Cruywagen et al. (2017) descreveram quatro híbridos entre as espécies de  
72 *Lasiodiplodia*, anteriormente descritos como espécies crípticas dentro do complexo *Lasiodiplodia*  
73 *theobromae*. A identificação de híbridos pode ser extremamente difícil, não sendo possível detectá-  
74 los quando usado um ou mesmo dois genes nas análises filogenéticas (Cruywagen et al. 2017).

75 A descoberta de que espécies deste gênero podem gerar híbridos, aumenta a importância  
76 desses patógenos como ameaça aos vinhedos do Nordeste do Brasil. Isso por que os híbridos podem  
77 desenvolver maior capacidade de adaptação às condições adversas e apresentarem maior  
78 agressividade, quando comparados a seus genitores (Depotter et al. 2016).

79 O presente estudo foi realizado para (i) identificar espécies de *Lasiodiplodia* associadas à  
80 morte descendente da videira no Nordeste do Brasil, (ii) determinar a prevalência da distribuição  
81 de cada espécie, e (iii) caracterizar os isolados em termos de patogenicidade e agressividade usando  
82 mudas de videira (cv. Isabel).

83

## 84 **Materiais e métodos**

85

### 86 **Isolados fúngicos**



87  
88 Foram utilizados 94 isolados de *Lasiodiplodia* obtidos de ramos e troncos de videiras com cancos  
89 em forma de cunha no tecido vascular, coletados entre 2011 e 2014 em três polos de produção  
90 (Vale do São Francisco, Vale do Siriji e Vale do Jaguaribe) e cinco municípios de três estados do  
91 Nordeste do Brasil (Bahia, Ceará e Pernambuco) (Fig. 1). Esses estados representam os maiores  
92 produtores de uvas finas de mesa no país e os pomares em cada estado foram selecionados  
93 arbitrariamente. Culturas puras de *Lasiodiplodia* foram obtidas a partir de pontas de hifas e  
94 preservadas em água destilada esterilizada.

95

#### 96 **Extração do DNA, amplificação por PCR, sequenciamento e análises filogenéticas**

97

98 O DNA genômico de cada isolado foi obtido usando o protocolo de extração descrito por Moller  
99 et al. (1992) e parte do gene do fator de alongação (*tef1- $\alpha$* ) foi amplificado e sequenciado para  
100 todos os isolados usando os primers EF-688F e EF-1251R (Alves et al. 2008), como descrito por  
101 Phillips et al. (2005). A identificação de haplótipos distintos foi realizada utilizando o programa  
102 DnaSP 4.0 (Rozas et al. 2003). Posteriormente, a região do espaçador transcrito interno do rDNA  
103 (ITS) foi amplificada e sequenciada para os isolados representativos dos diferentes haplótipos  
104 usando os primers ITS1 e ITS4 (White et al. 1990), de acordo com Slippers et al. (2004). Os  
105 reagentes e condições de amplificação através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para  
106 *tef1- $\alpha$*  e ITS estão descritos em Netto et al. (2017). Os produtos PCR foram purificados e  
107 sequenciados em ambas as direções com os mesmos primers usados para amplificação.

108 As seqüências consenso foram obtidas usando o Staden Package versão 1.6-r (Bonfield &  
109 Staden 1996) e comparadas com os dados do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia

110 (NCBI) (Tabela Suplementar 1), utilizando o algoritmo *BLASTn* (Johnson et al. 2008). As  
111 sequências foram alinhadas usando a interface online do MAFFT v. 7 (Kato et al. 2002; Kato &  
112 Toh 2013), método de refinamento iterativo E-INS-i, e corrigidas manualmente no MEGA7  
113 (Kumar et al. 2016).

114 As relações evolutivas foram inferidas utilizando Inferência Bayesiana (BI) e Máxima  
115 Verossimilhança (ML) para cada locus individual e a matriz concatenada. Análises de BI foram  
116 realizadas utilizando MrBayes v. 3.2.6 (Ronquist et al. 2012), implementado no cluster CIPRES  
117 (<https://www.phylo.org/portal2/home.action>), selecionando o modelo de evolução de acordo com  
118 o Critério de Informação Akaike (AIC), com o auxílio do MrModeltest 2.3 (Nylander 2004). A  
119 árvore ML foi estimada usando o RAxML ([http://www.phylo.org/index.php/tools/raxmlhpc2\\_tgb.html](http://www.phylo.org/index.php/tools/raxmlhpc2_tgb.html))  
120 implementado no CIPRES. O suporte do nó foi estimado através da análise de bootstrap com  
121 1000 replicações.

122 Árvores obtidas através das análises BI e ML foram visualizadas no programa FigTree v  
123 1.4.2 (Rambaut 2014). Todas as sequências utilizadas nas análises filogenéticas foram depositadas  
124 no GenBank (Tabela Suplementar 2). As culturas representativas das espécies identificadas neste  
125 estudo foram depositadas na Coleção de Cultura de Fungos Fitopatogênicos “Prof. Maria Menezes”  
126 (CMM) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil.

127

## 128 **Patogenicidade e agressividade em mudas de videira**

129

130 A patogenicidade e a agressividade de 30 isolados de *Lasiodiplodia*, representando as espécies  
131 identificadas neste estudo, foram testadas em mudas de videira (cv. Isabel) com três meses de idade.  
132 Um ferimento superficial (1 cm de comprimento, 2 mm de profundidade) foi feito num lado do

133 caule de cada muda, a 15 cm acima do colo, usando um escalpelo esterilizado. O ferimento foi  
134 inoculado com um disco de micélio (4 mm de diâmetro) de cada isolado, removido da margem de  
135 uma cultura com 5 dias de idade em batata dextrose ágar (BDA; Acumedia, Lansing, USA). Discos  
136 de BDA não colonizados foram usados como testemunhas. A área inoculada foi envolvida com  
137 Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, USA) para prevenir a rápida desidratação. As mudas foram  
138 mantidas em casa de vegetação ( $27\pm 2$  °C de temperatura,  $68\pm 8$  % de umidade relativa) e aos 21  
139 dias após a inoculação foram avaliadas em relação à presença e severidade dos sintomas. Os caules  
140 foram cortados longitudinalmente e as lesões internas observadas visualmente. Os isolados foram  
141 considerados patogênicos quando a área da lesão avançou além da área inoculada (1 cm). A  
142 agressividade dos isolados foi avaliada pela mensuração do comprimento da lesão com um  
143 paquímetro digital (Mitutoyo Co., Tokyo, Japan). O experimento foi organizado em delineamento  
144 inteiramente casualizado com 15 repetições por tratamento (isolado) e uma muda por repetição. O  
145 experimento foi repetido uma vez. As diferenças entre as espécies de *Lasiodiplodia* foram  
146 comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis com comparações de médias de postos, ao nível de 5%  
147 de significância.

148

## 149 **Resultados**

150

151 A análise filogenética de *tef1- $\alpha$*  dos 94 isolados de *Lasiodiplodia* permitiu a identificação de oito  
152 haplótipos. Para confirmar a identidade dos isolados em nível de espécie, 30 isolados representando  
153 todos os haplótipos foram sequenciados para a região ITS. O conjunto combinado de dados *tef1- $\alpha$*   
154 e ITS consistiu em 65 isolados, incluindo 33 isolado do GenBank e dois taxas fora do grupo (Tabela  
155 Suplementar 1). O alinhamento continha 793 caracteres (291 de *tef1- $\alpha$*  e 502 de ITS). A maioria

156 dos clados foi fortemente apoiada pelas análises ML e BI na árvore concatenada e satisfaz os  
157 critérios do Reconhecimento de Espécie Filogenética pela Concordância Genealógica (GCPSR)  
158 nas árvores de genes individuais. Os métodos ML e BI produziram árvores com topologias  
159 semelhantes, sendo apresentada somente a ML (Fig. 2).

160 Entre os 30 isolados de *Lasiodiplodia* agruparam em oito diferentes clados, correspondentes  
161 a seis espécies (*L. crassispora*, *L. euphorbicola*, *L. hormozganensis*, *L. iraniensis*, *L.*  
162 *pseudotheobromae* e *L. theobromae*) e dois híbridos (*L. xbrasiliense* e *L. xlaeliocattleyae*) (Fig. 2;  
163 Tabela Suplementar 2). Considerando os 94 isolados, *L. theobromae* foi a espécie mais frequente  
164 (25,5%), seguida de *L. pseudotheobromae* (23,4%), *L. xbrasiliense* (18,1%), *L. iraniensis* (11,7%),  
165 *L. hormozganensis* (9,6%), *L. xlaeliocattleyae* (5,3%), *L. euphorbicola* (4,3%) e *L. crassispora*  
166 (2,1%) (Tabela Suplementar 2).

167 O número de espécies *Lasiodiplodia* constatadas em cada polo de produção variou em  
168 função do número de amostras analisadas. No Vale do São Francisco foram constatadas as seis  
169 espécies e os dois híbridos (63 isolados) de *Lasiodiplodia*, enquanto no Vale do Siriji (15 isolados)  
170 foram observadas apenas *L. theobromae* e *L. pseudotheobromae*, e no Vale do Jaguaribe (16  
171 isolados) *L. theobromae*, *L. pseudotheobromae* e o híbrido *xbrasiliense*. Entre as amostras de *Vitis*  
172 *labrusca* (15 isolados) foram constatadas somente *L. pseudotheobromae* e *L. theobromae*,  
173 enquanto em *V. vinifera* (79 isolados) foram registradas as seis espécies e os dois híbridos de  
174 *Lasiodiplodia* (Tabela Suplementar 2).

175 Todos os 30 isolados de *Lasiodiplodia* foram patogênicos às mudas de videira, causando  
176 lesões necróticas nos caules. Observou-se diferença significativa ( $P \leq 0.05$ ) na severidade da  
177 doença produzida pelas diferentes espécies de *Lasiodiplodia*, indicando diferenças em  
178 agressividade (Fig. 3). As espécies *L. hormozganensis*, *L. iraniensis* e *L. euphorbicola* foram as

179 mais agressivas às mudas de videira (213,6 mm a 200,9 mm), sem diferirem entre si, mas diferindo  
180 das demais. Por outro lado, *L. theobromae*, *L. pseudotheobromae* e *L. xbrasiliense* foram as menos  
181 agressivas (82,1 mm a 133,3 mm). As demais espécies apresentaram agressividade intermediária  
182 (164,2 mm a 128,5 mm).

183

## 184 **Discussão**

185

186 Estudos de filogenia e patogenicidade têm sido essenciais no fornecimento de novas informações  
187 sobre a diversidade de *Lasiodiplodia* em videiras (Úrbez-Torres 2011; Úrbez-Torres et al. 2012;  
188 Yan et al. 2013; Pitt et al. 2015; Correia et al. 2016), principalmente no reconhecimento de espécies  
189 e híbridos que não poderiam ser diagnosticados com base apenas em caracteres fenotípicos  
190 clássicos. No presente trabalho foram identificados seis espécies e dois híbridos do gênero  
191 *Lasiodiplodia* causando morte descendente em videiras no Nordeste do Brasil, incluindo o  
192 principal polo de produção e exportação de uvas finas de mesa (Vale do São Francisco), um  
193 importante polo de produção de uvas rústicas (Vale do Siriji) e um novo polo de produção de uvas  
194 finas (Vale do Jaguaribe).

195 Espécies de *Lasiodiplodia* têm sido relatadas causando doenças em diversas plantas  
196 cultivadas na região Nordeste do Brasil (Marques et al. 2013; Netto et al. 2014; Correia et al. 2016;  
197 Netto et al. 2017). *L. theobromae* é reconhecido como um patógeno global capaz de causar doenças  
198 em mais de 370 espécies de plantas (Farr & Rossman 2018). No Nordeste do Brasil, essa espécie  
199 é geralmente apresentada como a mais frequentemente encontrada em estudos de filogenia  
200 molecular, distribuição e patogenicidade de Botryosphaeriaceae (Correia et al. 2013; Marques et  
201 al. 2013; Netto et al. 2014; Correia et al. 2016; Netto et al. 2017).

202           *Lasiodiplodia pseudotheobromae* foi relatado pela primeira vez por Alves et al. (2008) a  
203 partir de isolados previamente identificados como *L. theobromae*. Na época da sua descrição, esse  
204 fungo estava presente em poucos hospedeiros (*Acacia mangium*, *Citrus aurantium*, *Coffea* sp.,  
205 *Gmelina arborea* e *Rosa* sp.) e com distribuição geográfica conhecida limitada (Costa Rica,  
206 Holanda, Suriname e Zaire) (Alves et al. 2008). No entanto, atualmente essa espécie parece ser de  
207 ocorrência comum em uma ampla gama de hospedeiros e em muitos países (Farr & Rossman 2018).  
208 No Brasil, *L. pseudotheobromae* tem sido relatada em cajueiro (Netto et al. 2017), coqueiro  
209 (Rosado et al. 2016), pinhão-manso (Machado et al. 2014a), laranja (Coutinho et al. 2017), mamão  
210 (Netto et al. 2014), mandioca (Machado et al. 2014b), manga (Marques et al. 2013),  
211 tamarindo (Coutinho et al. 2017) e videira (Correia et al. 2013; Correia et al. 2016).

212           *Lasiodiplodia xbrasiliense*, o terceiro fungo mais frequentemente identificado neste estudo,  
213 foi descrito em 2014 causando podridão em frutos de mamão no Brasil, e tem sido relatado em  
214 mais quatro países, incluindo Madagascar (Cruywagen et al. 2017), Peru (Rodriguez-Galvez et al.  
215 2017), Tailândia (Doilom et al. 2015) e Turquia (Yildiz et al. 2014), causando doenças em  
216 diferentes hospedeiros. No Brasil, além do mamão também foi relatado em manga (Netto et al.  
217 2014), videira (Correia et al. 2016), coqueiro (Rosado et al. 2016), cajueiro (Netto et al. 2017),  
218 pinha e seriguela (Coutinho et al. 2017). A primeira descrição de *L. xbrasiliense* foi baseada em  
219 estudos morfológicos, de patogenicidade e molecular para os loci *tef1- $\alpha$*  e ITS. No entanto,  
220 Cruywagen et al. (2017) descreveram recentemente *L. brasiliense* como sendo um híbrido de *L.*  
221 *theobromae* e outra espécie desconhecida. Análises de árvores individuais para cinco loci (*tef1- $\alpha$* ,  
222 *ITS*, *Tub2*, *rpb2* e *cmdA*) mostraram incongruências entre o locus *tef1- $\alpha$*  e os demais loci estudados.  
223 Para esses autores, a interpretação dos dados *tef1- $\alpha$*  deve ser feita cuidadosamente e não apenas em

224 combinação com ITS, uma vez que os híbridos podem não serem reconhecidos quando apenas um  
225 ou dois loci são usados na identificação de novas espécies crípticas (Cruywagen et al. 2017).

226 Além de *L. theobromae*, *L. pseudotheobromae* e *L. xbrasiliense*, mais quatro espécies e um  
227 híbrido do gênero *Lasiodiplodia* foram observados nesse estudo. Em estudo anterior, Correia et al.  
228 (2016) relatou a presença destes oito patógenos em vinhedos no Vale do São Francisco, no  
229 Nordeste do Brasil. No presente estudo, a amostragem foi expandida para dois outros polos de  
230 produção de uvas de mesa nessa região, denominados Vale do Siriji (Estado de Pernambuco) e  
231 Vale do Jaguaribe (Ceará). No primeiro polo foram observadas apenas *L. theobromae* e *L.*  
232 *pseudotheobromae*, enquanto no segundo polo constatadas as espécies *L. theobromae* e *L.*  
233 *pseudotheobromae* e o híbrido *L. xbrasiliense*. O polo do Vale do Jaguaribe iniciou o cultivo de  
234 videiras (*V. vinífera*) com as variedades Itália e Benitaka, há menos de 10 anos, abrangendo área  
235 total de 20 ha (IBGE 2018). O polo do Vale do Siriji, o cultivo de uvas (*V. labrusca*) acontece há  
236 mais de 65 anos, liderado principalmente por pequenos produtores, cobrindo área aproximada de  
237 500 ha (IBGE 2018), plantados com a cultivar Isabel, material rústico e adaptado às condições  
238 climáticas e de relevo acidentado da região (Tavares & Lima, 2009). No Vale do São Francisco, o  
239 cultivo de videiras (*V. vinífera*) teve início nos anos 1960 e atualmente ocupa 6,1 mil hectares,  
240 explorados por pequenos, médios e grandes produtores (Codevasf 2016).

241 A presença das oito espécies de *Lasiodiplodia* associadas a videiras nesse polo pode estar  
242 relacionada à maior intensificação de produção e maior introdução de materiais de propagação nas  
243 áreas de cultivo. O elevado número de espécies de *Lasiodiplodia* observados em *V. vinífera* pode  
244 ser decorrente da maior suscetibilidade desta espécie de videira às doenças, quando comparada a  
245 *V. labrusca*, que é considerada uma espécie rústica (Creasy & Creasy 2009). No entanto, não deve

246 ser descartada a hipótese da maior introdução de materiais de propagação de *V. vinifera* no Vale  
247 do São Francisco, considerando a grande área plantada comparada a *V. labrusca* no Vale do Sirji.

248 Neste estudo, *L. xbrasiliense* foi um dos patógenos menos agressivos em mudas de videiras,  
249 contrariando os resultados obtidos por Correia et al. (2016), no qual *L. xbrasiliense* foi reportado  
250 como o mais agressivo em ramos destacados de videira. Essa variação na agressividade de *L.*  
251 *xbrasiliense* pode estar relacionada a sua condição de híbrido, pois híbridos podem ser  
252 considerados estáveis ou transitórios de acordo com a conservação dos conjuntos cromossômicos  
253 parentais ao longo do tempo (Deporte et al. 2016). Além disso, as inoculações nesse estudo foram  
254 realizadas em mudas de videira, enquanto no estudo de Correia et al. (2016) as inoculações foram  
255 em ramos destacados de videira, o que pode ter favorecido o saprofitismo e não a patogenicidade,  
256 e influenciado na avaliação da severidade da doença.

257 A descoberta de híbridos entre as espécies de *Lasiodiplodia* (Cruywagen et al. 2017)  
258 aumenta a importância da identificação e análise da patogenicidade e agressividade dos isolados  
259 deste gênero em plantas cultivadas, pois híbridos podem colonizar uma ampla gama de  
260 hospedeiros, serem mais agressivos e se adaptarem mais rapidamente às mudanças ambientais  
261 (Deporte et al. 2016; Inderbitzin et al. 2011). No entanto, nesse estudo os híbridos de *Lasiodiplodia*  
262 apresentaram agressividade baixa (*L. xbrasiliense*) ou intermediária (*L. xlaeliocattleyae*),  
263 indicando que generalizações sobre esse aspecto devem ser evitadas.

264 Apesar de *L. theobromae* ter sido a espécie mais frequente, não é o único agente etiológico  
265 e nem o mais agressivo. Todas espécies de *Lasiodiplodia* constatadas nesse estudo têm potencial  
266 para causar a morte descendente em videiras no Nordeste brasileiro, mas *L. hormozganensis*, *L.*  
267 *iraniensis* e *L. euphorbicola* foram as mais agressivas. Doenças fúngicas que ocorrem no troco da  
268 videira são as mais destrutivas em todo o mundo (Gramaje et al. 2018). O conhecimento dos



269 patógenos que causam doenças em videiras é importante para o desenvolvimento de estratégias  
270 específicas de manejo (Úrbez-Torres et al. 2015). Embora já existam avanços no conhecimento da  
271 biologia, ecologia, epidemiologia e controle de doenças do tronco da videira, ainda não existe uma  
272 medida efetiva de controle desenvolvida, devido ao grande número de patógenos associados a  
273 doenças no tronco da videira (Gramaje et al. 2018).

274  
275 **Agradecimentos:** Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal  
276 de Nível Superior (CAPES). S. J. Michereff e M. P. S. Câmara também agradecem a bolsa de  
277 pesquisa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

278  
279 **Conformidade com os padrões éticos**  
280 Divulgação de potencial conflito de interesses - Os autores não têm nenhum conflito de interesses.  
281 Consentimento informado - Todos os autores revisaram o manuscrito e aprovaram sua submissão  
282 ao European Journal of Plant Pathology.

283  
284  
285 **Referências**

286  
287 Alves, A., Crous, P. W., Correia, A., & Phillips, A. J. L. (2008). Morphological and molecular data  
288 reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity* 28, 1–13.  
289 Bertsch, C., Ramirez-Suero, M., Magnin-Robert, M., Larignon, P., Chong, J., Abou-Mansour, E.,  
290 Spagnolo, A., Clement, C., & Fontaine, F. (2013). Grapevine trunk diseases: complex and  
291 still poorly understood. *Plant Pathology* 62 243-265.

- 292 Bonfield, J.K., & Staden, R. (1996). Experiment files and their application during large-scale  
293 sequencing projects. *DNA Sequence* 6 109-117.
- 294 Codevasf – Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba. Available  
295 at [http://www.codevasf.gov.br/noticias/2014/exportacao-de-uva-deve-crescer-30-em-](http://www.codevasf.gov.br/noticias/2014/exportacao-de-uva-deve-crescer-30-em-projeto-da-codevasf-no-semiarido-baiano/)  
296 [projeto-da-codevasf-no-semiarido-baiano/](http://www.codevasf.gov.br/noticias/2014/exportacao-de-uva-deve-crescer-30-em-projeto-da-codevasf-no-semiarido-baiano/).
- 297 Correia, K. C., Câmara, M. P. S., Barbosa, M. A. G., Sales, R. J. R., Agustí-Brisach, C., Gramaje,  
298 D., García-Jiménez, J., Abad-Campos, P., Armengol, J., & Michereff, S. J. 2013. Fungal  
299 trunk pathogens associated with table grape decline in Northeastern Brazil. *Phytopathologia*  
300 *Mediterranea* 52 380–387.
- 301 Correia, K. C., Silva, M. A., Morais Júnior, M. A., Armengol, J., Phillips, A. J. L., Câmara, M. P.  
302 S., & Michereff, S. J. 2016. Phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia*  
303 species associated with dieback of table grape in the main Brazilian exporting region. *Plant*  
304 *Pathology* 65 92–103.
- 305 Coutinho, I. B. L., Freire, F. C. O., Lima, C. S., Lima, J. S., Gonçalves, F. J. T., Machado, A. R.,  
306 Silva, A. M. S., & Cardoso, J. E. (2017). Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with  
307 perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. *Plant Pathology* 66 90-104.
- 308 Creasy, G. L., & Creasy, L. L. (2009). **Grapes**. Wallingford: Cab International, 295 p.
- 309 Cruywagen, E. M., Slippers, B., Roux, J., & Wingfield, M. J. (2017). Phylogenetic  
310 species recognition and hybridisation in *Lasiodiplodia*: a case study on species from baobabs.  
311 *Fungal Biology* 121 420-436.
- 312 Depotter, J. R. L., Seidl, M. F., Wood, T. A., & Thomma, B. P. H. J. (2016). Interspecific  
313 hybridization impacts host range and pathogenicity of filamentous microbes. *Current*  
314 *Opinion in Microbiology* 32 7–13.

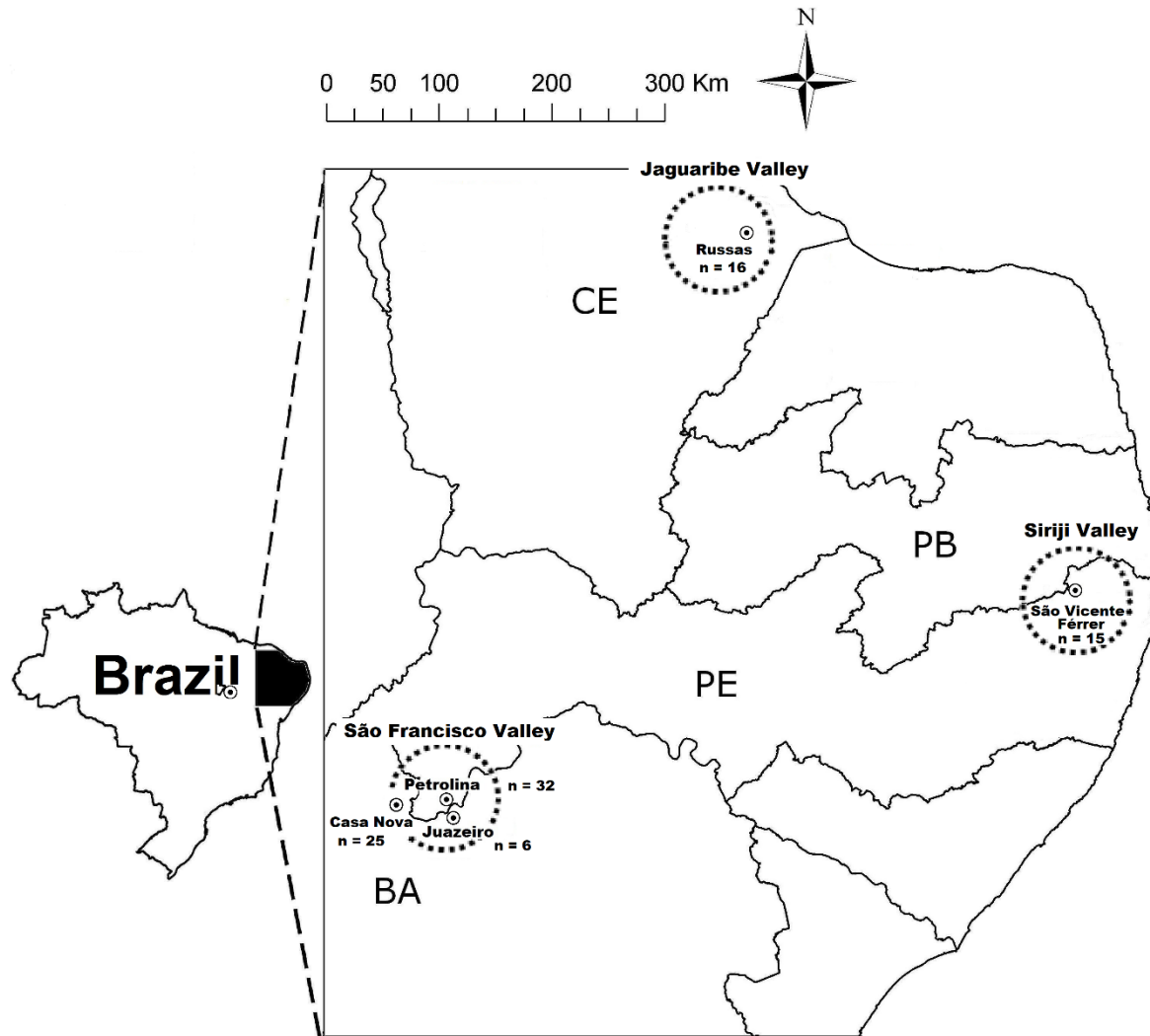
- 315 Doilom, M., Shuttleworth, L. A., Roux, J., Chukeatirote, E., & Hyde, K. D. (2015).  
316 Botryosphaeriaceae associated with *Tectonagrandis* (teak) in northern Thailand. *Phytotaxa*  
317 233 1-26.
- 318 Farr, D. F., & Rossman, A. Y., (2018). Fungal database: U.S. National Fungus Collections, ARS,  
319 USDA. Available <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>. Accessed 05 May 2018.
- 320 Gramaje, D., Úrbez-Torres, J. R., & Sosnowski, M.R. (2018). Managing grapevine trunk diseases  
321 with respect to etiology and epidemiology: current strategies and future prospects. *Plant*  
322 *Disease* 102 12-39.
- 323 IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2018. Available at  
324 <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6588#resultado>.
- 325 Inderbitzin, P., Davis, R. M., Bostock, R. M., & Subbarao, K. V. (2011). The ascomycete  
326 *Verticillium longisporum* is a hybrid and a plant pathogen with an expanded host range.  
327 **PLoS ONE** 6:e18260.
- 328 Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S., & Madden, T. L.  
329 (2008). NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research* 36 (Web Server issue)  
330 W5-9.
- 331 Katoh, K., & Toh, H. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7:  
332 improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30 772-780.
- 333 Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., & Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple  
334 sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* 30 3059–3066.
- 335 Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis  
336 version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33 1870-1874.
- 337 Machado, A. R., Pinho, D. B., Pereira, O. L. (2014a). Phylogeny, identification and pathogenicity  
338 of the Botryosphaeriaceae associated with collar and root rot of the biofuel plant *Jatropha*

- 339           *curcas* in Brazil, with a description of new species of *Lasiodiplodia*. *Fungal Diversity* 67  
340           231–247.
- 341 Machado, A. R., Pinho, D. B., Oliveira, S. A. S., & Pereira, O. L., (2014b). New occurrences of  
342           Botryosphaeriaceae causing black root rot of cassava in Brazil. *Tropical Plant Pathology* 39  
343           464–470.
- 344 Marques, W. M., Lima, N. B., Morais Júnior, M. A., Barbosa, M. A. G., Souza, B. O., Michereff,  
345           S. J., Phillips, A. J. L., Câmara, M. P. S. (2013). Species of *Lasiodiplodia* associated with  
346           mango in Brazil. *Fungal Diversity* 61 181-193.
- 347 Martín, M. T., & Cobos, R. 2007. Identification of fungi associated with grapevine decline in  
348           Castilla y León (Spain). *Phytopathologia Mediterranea* 46 18-25.
- 349 Moller, E. M., Bahnweg, G., Sandermann, H., & Geiger, H. H. (1992). A simple and efficient  
350           protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies,  
351           and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research* 20 6115-6116.
- 352 Netto, M. S. B., Assunção, I. P., Lima, G. S. A., Marques, M. W., Lima, W. G., Monteiro, J. H. A.,  
353           Balbino, V. Q., Michereff, S. J., Phillips, A. J. L., & Câmara, M. P. S. (2014). Species of  
354           *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. *Fungal Diversity* 67 127–41.
- 355 Netto, M. S. B., Lima, W. G., Correia, K. C., Silva, C. F. B. D., Thon, M., Martins, R. B., Miller,  
356           R. N. G., Michereff, S. J., & Câmara, M. P. S. (2017). Analysis of phylogeny, distribution,  
357           and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with gummosis of *Anacardium*  
358           Brazil, with a new species of *Lasiodiplodia*. *Fungal Biology* 121 437–451.
- 359 Nylander, J. A. A. (2004). MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary  
360           Biology Centre, Uppsala University.

- 361 Pitt, W. M., Huang, R., Steel, C. C., & Savocchia, S. (2013). Pathogenicity and epidemiology of  
362 *Botryosphaeriaceae* species isolated from grapevines in Australia.  
363 *Australasian Plant Pathology* 42 573-582.
- 364 Phillips A, Alves A, Abdollahzadeh J, Slippers B, Wingfield M, Groenewald J, & Crous P, (2013).  
365 The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. *Studies in Mycology* 76 51-  
366 167.
- 367 Phillips, A. J. L., Alves, A., Correia, A., & Luque, J. (2005). Two new species of *Botryosphaeria*  
368 with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. *Mycologia* 97 513-529.
- 369 Rambaut A. (2014). Figtree, a graphical viewer of phylogenetic trees. 1.4.2 ed. Edinburgh: The  
370 author, Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh.
- 371 Rodríguez-Gálvez, E., Guerrero, P., Barradas, C., Crous, P. W., & Alves, A. (2017). Phylogeny  
372 and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of mango in Peru. *Fungal*  
373 *Biology* 121 452-465.
- 374 Rolshausen, P. E., Akgül, D. S., Perez, R., Eskalen, A., and Gispert, C. (2013). First report of wood  
375 canker caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on grapevine in California. *Plant Disease* 97  
376 1511.
- 377 Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu,  
378 L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic  
379 inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61 539-542.
- 380 Rosado, A. W. C., Machado, A. R., Freire, F. O., Pereira, O. L. (2016). Phylogeny, identification  
381 and pathogenicity of *Lasiodiplodia* associated with postharvest stem-end rot of coconut in  
382 Brazil. *Plant Disease* 100 561-568.

- 383 Rozas, J., Sánchez-Delbarrio, J. C., Messeguer, X., & Rozas, R. (2003). DnaSP, DNA  
384 polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19 2496-2497.
- 385 Slippers, B., Crous, P. W., Denman, S., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J. (2004).  
386 Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species  
387 previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia* 96: 83-101.
- 388 Slippers, B., Crous, P. W., Jami, F., Groenewald, J. Z., & Wingfield, M. J. (2017). Diversity in the  
389 Botryosphaerales: Looking back, looking forward. *Fungal Biology* 121 307-321.
- 390 Tavares, S.C.C.H., & Lima, V.C. (2009). A indicação geográfica da uva de São Vicente Férrer e  
391 Macaparana – PE a partir das pesquisas da Embrapa. Recife: Embrapa Solos - UEP Recife  
392 (Embrapa Solos - UEP Recife. Circular Técnica, 43).
- 393 Úrbez-Torres, J. R. (2011). The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines.  
394 *Phytopathologia Mediterranea* 50 S5-S45.
- 395 Úrbez-Torres, J. R., Leavitt, G. M., Guerrero, J. C., Guevara, J., & Gubler, W. D. (2008).  
396 Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the  
397 causal agents of Bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Disease* 92 519-529.
- 398 Úrbez-Torres, J. R., Peduto, F., Striegler, R. K., Urrea-Romero, K. E., Rupe, J. C., Cartwright, R.  
399 D. & Gubler, W.D. (2012). Characterization of fungal pathogens associated with grapevine  
400 trunk diseases in Arkansas and Missouri. *Fungal Diversity* 52 169–189.
- 401 Úrbez-Torres, J. R., Phillips, A. J. L., & Gubler, W. D. (2015). *Botryosphaeria* Dieback. Pages 33-  
402 39 in: *Compendium of Grape Diseases, Disorders, and Pests*, 2nd Ed., W. F. Wilcox, W. D.  
403 Gubler, and J. K. Uyemoto, eds. APS Press, St Paul, MN.

- 404 Yan, J. Y., Xie, Y., Zhang, W., Wang, Y., Liu, J.-K., Hyde, K. D., Seem, R. C., Zhang, G. Z., Wang,  
405 Z.-Y., Yao, S.-W., Bai, X.-J., Dissanayake, A. J., Peng, Y.- L., & Li, X.-H. (2013). Species  
406 of Botryosphaeriaceae involved in grapevine dieback in China. *Fungal Diversity* 61:221-236.
- 407 Yang, T., Groenewald, J. Z., Cheewangkoon, R., Jami, F., Abdollahzadeh, J., Lombard, L.,  
408 & Crous, P. W. (2017). Families, genera, and species of Botryosphaeriales. *Fungal*  
409 *Biology* 121: 322-346.
- 410 Yildiz, A., Benlioglu, K., Benlioglu, H. (2014). First report of strawberry dieback caused by  
411 *Lasiodiplodia theobromae*. *Plant Disease* 98: 1579.
- 412 vanNiekerk, J. M., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Fourie, P. H., & Halleen, F. (2004). DNA  
413 phylogeny, morphology and pathogenicity of Botryosphaeria species on grapevines.  
414 *Mycologia* 96: 781-798.
- 415 White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal  
416 ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J.,  
417 White, T. J. (eds), PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications. Academic, San  
418 Diego, p. 315-322.
- 419 Wilcox, W. F., Gubler, W. D., and Uyemoto, J. K. (2015). Compendium of Grape Diseases,  
420 Disorders, and Pests, 2nd Ed. *American Phytopathological Society* Press, St. Paul, MN.
- 421 Wunderlich, L., Klonsky, K., & Stewart, D. (2015). Sample cost to establish a vineyard and  
422 produce wine grapes in the Sierra Nevada Foothills (Red Wine Variety – 5 Acre Bilateral  
423 Cordon Vineyard). University of California Cooperative Extension. Retrieved 05 May 2017  
424 from [https://coststudyfiles.ucdavis.edu/uploads/cs\\_public/df/68/df68d252-a08d-49d1-8eb6-](https://coststudyfiles.ucdavis.edu/uploads/cs_public/df/68/df68d252-a08d-49d1-8eb6-965637c0b615/wine-grape-sn-2015.pdf)  
425 [965637c0b615/wine-grape-sn-2015.pdf](https://coststudyfiles.ucdavis.edu/uploads/cs_public/df/68/df68d252-a08d-49d1-8eb6-965637c0b615/wine-grape-sn-2015.pdf).

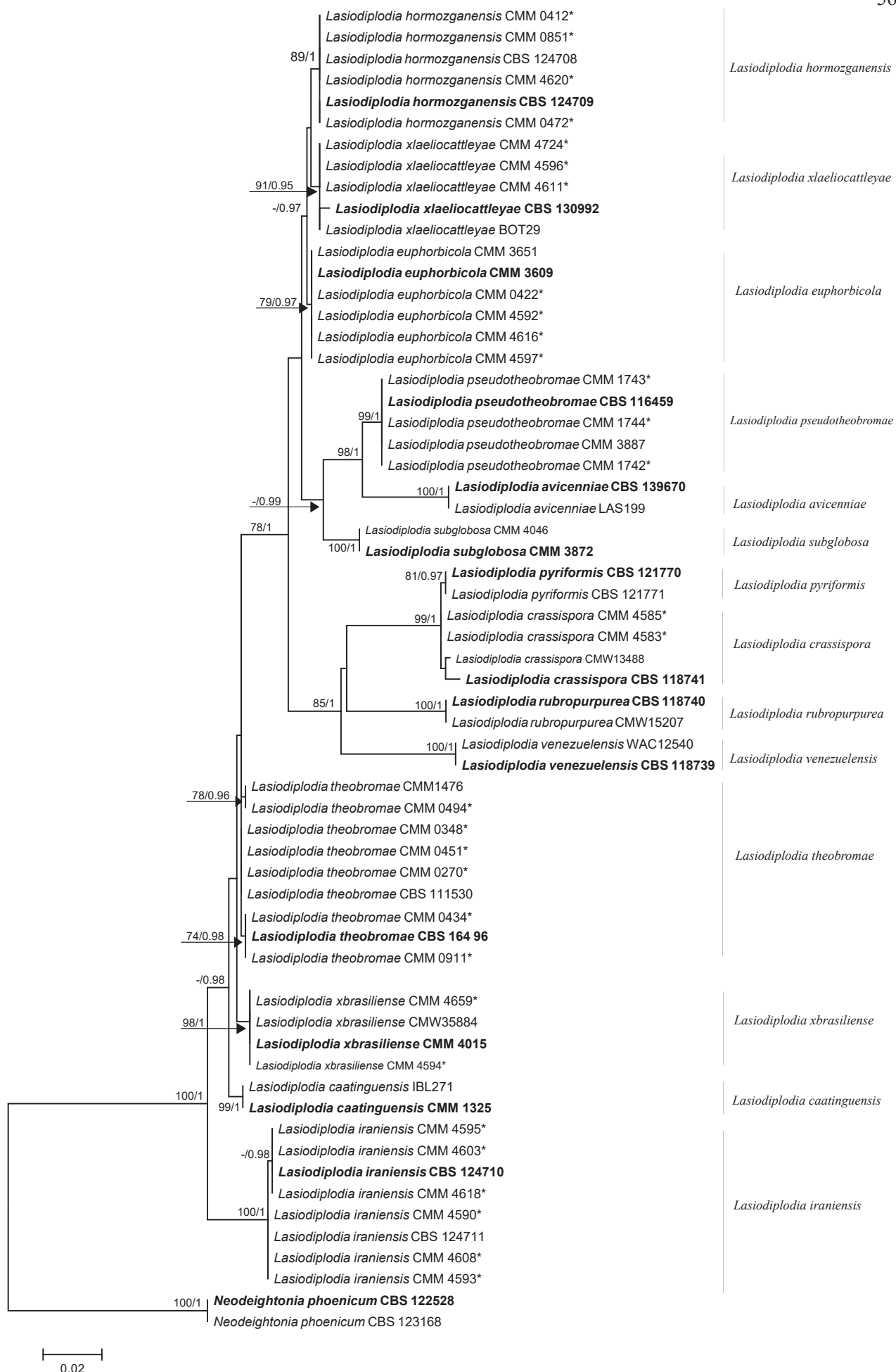


426

427

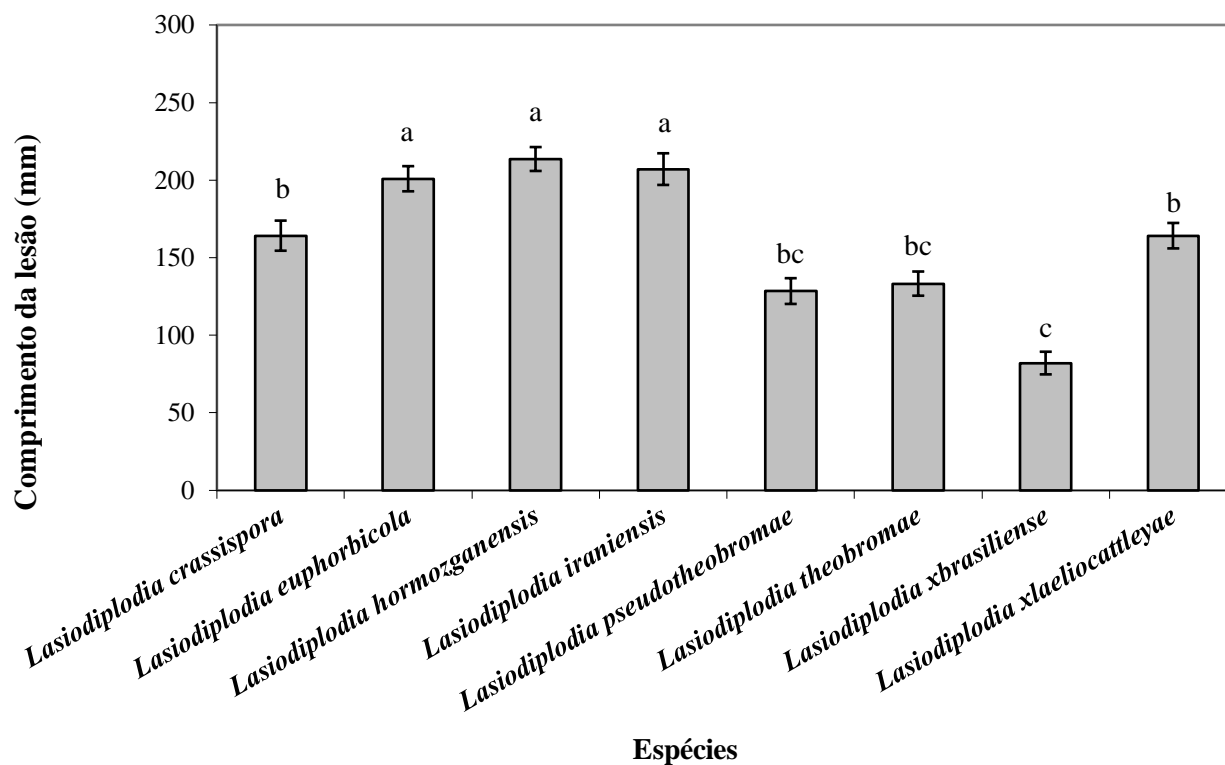
428 **Fig. 1** Locais de coleta de isolados de *Lasiodiplodia* associados à morte descendente da videira em  
 429 três polos de produção (Vale do São Francisco, Vale do Siriji e Vale do Jaguaribe) no Nordeste  
 430 brasileiro. n = número de isolados analisados em cada município; BA = Bahia, CE = Ceará, PE =  
 431 Pernambuco, estados brasileiros





**Fig. 2** Árvore de Máxima Verossimilhança (ML) resultante da análise combinada dos dados da sequência *tef1- $\alpha$*  e ITS. Os valores de suporte do bootstrap ML ( $> 70\%$ ) e a probabilidade posterior bayesiana ( $> 0.95$ ) são dadas nos nós. A árvore foi enraizada com *Neodeightonia phoenicum*. Isolados “ex-type” estão em negrito. \* Isolados obtidos neste estudo. A barra de escala representa o número de substituições por sítio.

1



2

3 **Fig. 3** Comprimento médio da lesão (mm) causado por oito espécies de *Lasiodiplodia* associadas  
4 com a morte descendente da videira no Nordeste brasileiro, aos 21 dias após a inoculação em mudas  
5 de videira (cv. Isabel) com discos de ágar colonizados com micélio. Barras acima da coluna são os  
6 erros padrões das médias. Colunas com a mesma letra não diferente significativamente, conforme  
7 o teste de Kruskal-Wallis ( $P = 0,05$ )

**Tabela Suplementar 1** Espécies de *Lasiodiplodia* de referência utilizadas nas análises filogenéticas com os genes ITS e *tefl-α*

Espécies	Isolados	Hospedeiro	País	Coletor (s)	Número de acesso GenBank	
					ITS	<i>tefl-α</i>
<i>Lasiodiplodia avicenniae</i>	CBS 139670	<i>Avicennia marina</i>	South Africa	J.A Osorio & Jol. Roux	KP860835	KP860680
<i>Lasiodiplodia avicenniae</i>	Las199	<i>Avicennia marina</i>	USA	J.A Osorio & Jol. Roux	KU587957	KU587946
<i>Lasiodiplodia caatinguensis</i>	CMM 1325	<i>Citrus sinensis</i>	Brazil	I. B. L.Coutinho/J. S. Lima	KT154760	KT008006
<i>Lasiodiplodia caatinguensis</i>	IBL271	<i>Anacardium occidentale</i>	Brazil	J. S. Lima/J. E. Cardoso	KT154756	KT154750
<i>Lasiodiplodia citricola</i>	CBS 124706	<i>Citrus</i> sp., twigs	Iran	A. Shekari	GU945353	GU945339
<i>Lasiodiplodia citricola</i>	CBS 124707, ex-type	<i>Citrus</i> sp., twigs	Iran	J. Abdollahzadeh & A. Javadi	GU945354	GU945340
<i>Lasiodiplodia crassispora</i>	CMW 13488	<i>Eucalyptus urophylla</i>	Venezuela	–	DQ103552	DQ103559
<i>Lasiodiplodia crassispora</i>	CBS 118741, ex-type	<i>Santalum album</i>	Australia	T. Burgess	DQ103550	EU673303
<i>Lasiodiplodia euphorbicola</i>	CBS 356.59	<i>Theobroma cacao</i>	Sri Lanka	A. Riggenbach	EF622082	EF622062
<i>Lasiodiplodia euphorbicola</i>	CMM 3609, ex-type	<i>Jatropha curcas</i>	Brazil	A.R. Machado & O.L. Pereira	KF234543	KF226689
<i>Lasiodiplodia hormozganensis</i>	CBS 124708	<i>Mangifera indica</i>	Iran	J. Abdollahzadeh & A. Javadi	GU945356	GU945344
<i>Lasiodiplodia hormozganensis</i>	CBS 124709, ex-type	<i>Olea</i> sp.	Iran	J. Abdollahzadeh & A. Javadi	GU945355	GU945343

<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CBS 124710, ex-type	<i>Salvadora persica</i>	Iran	J. Abdollahzadeh & A. Javadi	GU945346	GU945334
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CBS 124711	<i>Juglans</i> sp.	Iran	A. Javadi	GU945347	GU945335
<i>Lasiodiplodia parva</i>	CBS 456.78, ex-type	Cassava-field soil	Colombia	O. Rangel	EF622083	EF622063
<i>Lasiodiplodia parva</i>	CBS 494.78	Cassava-field soil	Colombia	O. Rangel	EF622084	EF622064
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	CBS 116459, ex-type	<i>Gmelina arborea</i>	Costa Rica	J. Carranza-Velazquez	EF622077	EF622057
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	CGMCC3.18043	<i>Morus alba</i> lim	China	–	KX499872	KX499910
<i>Lasiodiplodia pyriformis</i>	CBS 121770, ex-type	<i>Acacia mellifera</i>	Namibia	F.J.J. van der Walt & J. Roux	EU101307	EU101352
<i>Lasiodiplodia pyriformis</i>	CBS 121771	<i>Acacia mellifera</i>	Namibia	F.J.J. van der Walt & J. Roux	EU101308	EU101353
<i>Lasiodiplodia rubropurpurea</i>	CBS 118740, ex-type	<i>Eucalyptus grandis</i>	Australia	T.I. Burgess	DQ103553	EU673304
<i>Lasiodiplodia rubropurpurea</i>	WAC 12536	<i>Eucalyptus grandis</i>	Australia	T.I. Burgess	DQ103554	DQ103572
<i>Lasiodiplodia subglobosa</i>	CMM 3872, ex-type	<i>Jatropha curcas</i>	Brazil	A.R. Machado & O.L. Pereira	KF234558	KF226721
<i>Lasiodiplodia subglobosa</i>	CMM 4046	<i>Jatropha curcas</i>	Brazil	A.R. Machado & O.L. Pereira	KF234560	KF226723
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CBS 111530	Unknown	Unknown	–	EF622074	EF622054
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CBS 164.96, ex-neotype	Fruit along coral reef coast	Papua New Guinea	A. Aptroot	AY640255	AY640258
<i>Lasiodiplodia venezuelensis</i>	CBS 118739, ex-type	<i>Acacia mangium</i>	Venezuela	S. Mohali	DQ103547	EU673305

<i>Lasiodiplodia venezuelensis</i>	WAC 12540	<i>Acacia mangium</i>	Venezuela	S. Mohali	DQ103548	DQ103569
<i>Lasiodiplodia brasiliense</i>	CMM 4015, ex-type	<i>Mangifera indica</i>	Brazil	M.W. Marques	JX464063	JX464049
<i>Lasiodiplodia brasiliense</i>	CMW35884	<i>Adansonia madagascariensis</i>	Madagascar	–	KU887094	KU886972
<i>Lasiodiplodia laeliocattleyae</i>	BOT-29	<i>Mangifera indica</i> ,	Egypt	A. Ismail	JN814401	JN814428
<i>Lasiodiplodia laeliocattleyae</i>	CBS 130992	<i>Mangifera indica</i>	Egypt	A. Ismail	JN814397	JN814424
<i>Neodeightonia phoenicum</i>	CBS 123168	<i>Phoenix canariensis</i>	Spain	F. Garcia	EU673339	EU673308
<i>Neodeightonia phoenicum</i>	CBS 122528, ex-type	<i>Phoenix dactylifera</i>	Spain	F. Garcia	EU673340	EU673309

1 **Tabela Suplementar 2** Isolados de *Lasiodiplodia* coletados de pomares de videira no Nordeste brasileiro e caracterizados nesse estudo

2

Taxon	Código do isolado <sup>a</sup>	Hospedeiro	Localização <sup>b</sup> (Polo de produção)	No. acesso GenBank	
				<i>tef1-α</i>	ITS
<i>Lasiodiplodia crassispora</i>	CMM 4583	<i>Vitis vinifera</i>	Casa Nova/BA (VSF)	MG979519	MG954353
<i>Lasiodiplodia crassispora</i>	CMM 4585	<i>V. vinifera</i>	Casa Nova/BA (VSF)	MG979520	MG954354
<i>Lasiodiplodia euphorbicola</i>	CMM 4592	<i>V. vinifera</i>	Casa Nova/BA (VSF)	MG979516	MG954346
<i>Lasiodiplodia euphorbicola</i>	CMM 4597	<i>V. vinifera</i>	Petrolina/PE (VSF)	MG979517	MG954347
<i>Lasiodiplodia euphorbicola</i>	CMM 4616	<i>V. vinifera</i>	Petrolina/PE (VSF)	MG979518	MG954348
<i>Lasiodiplodia euphorbicola</i>	CMM 0422	<i>V. vinifera</i>	Petrolina/PE (VSF)	MH265120	MH263667
<i>Lasiodiplodia hormozganensis</i>	CMM 4620	<i>V. vinifera</i>	Casa Nova/BA (VSF)	MG979515	MG954349
<i>Lasiodiplodia hormozganensis</i>	CMM 0412	<i>V. vinifera</i>	Petrolina/PE (VSF)	MH265118	MH263665
<i>Lasiodiplodia hormozganensis</i>	CMM 0472	<i>V. vinifera</i>	Petrolina/PE (VSF)	MH265117	MH263664
<i>Lasiodiplodia hormozganensis</i>	CMM 0851	<i>V. vinifera</i>	Petrolina/PE (VSF)	MH265119	MH263666
<i>Lasiodiplodia hormozganensis</i>	CMM 0292	<i>V. vinifera</i>	Petrolina/PE (VSF)	MH632275	-
<i>Lasiodiplodia hormozganensis</i>	CMM 0408	<i>V. vinifera</i>	Casa Nova/BA (VSF)	MH632276	-
<i>Lasiodiplodia hormozganensis</i>	CMM 0496	<i>V. vinifera</i>	Petrolina/PE (VSF)	MH632277	-
<i>Lasiodiplodia hormozganensis</i>	CMM 0503	<i>V. vinifera</i>	Petrolina/PE (VSF)	MH632278	-
<i>Lasiodiplodia hormozganensis</i>	CMM 0619	<i>V. vinifera</i>	Casa Nova/BA (VSF)	MH632279	-
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CMM 4590	<i>V. vinifera</i>	Juazeiro/BA (VSF)	MG979509	MG954334
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CMM 4593	<i>V. vinifera</i>	Petrolina/PE (VSF)	MG979510	MG954335

<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CMM 4608	<i>V. vinifera</i>	Petrolina/PE (VSF)	MH265121	MH263655
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CMM 4595	<i>V. vinifera</i>	Petrolina/PE (VSF)	MG979512	MG954337
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CMM 4618	<i>V. vinifera</i>	Casa Nova/BA (VSF)	MG979513	MG954338
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CMM 4603	<i>V. vinifera</i>	Casa Nova/BA (VSF)	MG979514	MG954339
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CMM 4580	<i>V. vinifera</i>	Petrolina/PE (VSF)	MH632282	-
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CMM 4586	<i>V. vinifera</i>	Casa Nova/BA (VSF)	MH632283	-
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CMM 4610	<i>V. vinifera</i>	Juazeiro/BA (VSF)	MH632284	-
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CMM 4622	<i>V. vinifera</i>	Casa Nova/BA (VSF)	MH632285	-
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CMM 4625	<i>V. vinifera</i>	Juazeiro/BA (VSF)	MH632286	-
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	CMM 1742	<i>V. labrusca</i>	São Vicente Férrer/PE (VSI)	MG979505	MG954350
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	CMM 1743	<i>V. labrusca</i>	São Vicente Férrer/PE (VSI)	MH265122	MH263656
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	CMM 1744	<i>V. labrusca</i>	São Vicente Férrer/PE (VSI)	MH265123	MH263657
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	CMM 4587	<i>V. vinifera</i>	Petrolina/PE (VSF)	MH632241	-
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	CMM 4606	<i>V. vinifera</i>	Casa Nova/BA (VSF)	MH632242	-
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	CMM 4607	<i>V. vinifera</i>	Petrolina/PE (VSF)	MH632243	-
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	CMM 4627	<i>V. labrusca</i>	São Vicente Férrer/PE (VSI)	MH632244	-
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	CMM 4628	<i>V. labrusca</i>	São Vicente Férrer/PE (VSI)	MH632245	-
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	CMM 4631	<i>V. labrusca</i>	São Vicente Férrer/PE (VSI)	MH632246	-
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	CMM 4636	<i>V. labrusca</i>	São Vicente Férrer/PE (VSI)	MH632247	-
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	CMM 4640	<i>V. labrusca</i>	São Vicente Férrer/PE (VSI)	MH632248	-
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	CMM 4646	<i>V. vinifera</i>	Russas/CE (VJA)	MH632249	-
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	CMM 4648	<i>V. vinifera</i>	Russas/CE (VJA)	MH632250	-

<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	CMM 4649	<i>V. vinifera</i>	Russas/CE (VJA)	MH632251	-
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	CMM 4650	<i>V. vinifera</i>	Russas/CE (VJA)	MH632252	-
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	CMM 4652	<i>V. vinifera</i>	Russas/CE (VJA)	MH632253	-
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	CMM 4653	<i>V. vinifera</i>	Russas/CE (VJA)	MH632254	-
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	CMM 1734	<i>V. labrusca</i>	São Vicente Férrer/PE (VSI)	MH632255	-
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	CMM 1735	<i>V. labrusca</i>	São Vicente Férrer/PE (VSI)	MH632256	-
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	CMM 1738	<i>V. labrusca</i>	São Vicente Férrer/PE (VSI)	MH632257	-
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	CMM 1740	<i>V. labrusca</i>	São Vicente Férrer/PE (VSI)	MH632258	-
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	CMM 1741	<i>V. labrusca</i>	São Vicente Férrer/PE (VSI)	MH632259	-
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CMM 0270	<i>V. vinifera</i>	Juazeiro/BA (VSF)	MH265111	MH263663
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CMM 0348	<i>V. vinifera</i>	Petrolina/PE (VSF)	MH265112	MH263662
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CMM 0434	<i>V. vinifera</i>	Casa Nova/BA (VSF)	MH265113	MH263660
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CMM 0451	<i>V. vinifera</i>	Petrolina/PE (VSF)	MH265114	MH263661
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CMM 0494	<i>V. vinifera</i>	Petrolina/PE (VSF)	MH265115	MH263658
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CMM 0911	<i>V. labrusca</i>	São Vicente Férrer/PE (VSI)	MH265116	MH263659
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CMM 0326	<i>V. vinifera</i>	Casa Nova/BA (VSF)	MH632287	-
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CMM 0346	<i>V. vinifera</i>	Petrolina/PE (VSF)	MH632288	-
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CMM 0352	<i>V. vinifera</i>	Juazeiro/BA (VSF)	MH632289	-
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CMM 0376	<i>V. vinifera</i>	Petrolina/PE (VSF)	MH632290	-
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CMM 0391	<i>V. vinifera</i>	Casa Nova/BA (VSF)	MH632291	-
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CMM 0397	<i>V. vinifera</i>	Juazeiro/BA (VSF)	MH632292	-
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CMM 0407	<i>V. vinifera</i>	Petrolina/PE (VSF)	MH632293	-



<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CMM 0416	<i>V. vinifera</i>	Petrolina/PE (VSF)	MH632294	-
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CMM 0437	<i>V. vinifera</i>	Casa Nova/BA (VSF)	MH632295	-
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CMM 0453	<i>V. vinifera</i>	Petrolina/PE (VSF)	MH632296	-
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CMM 0458	<i>V. vinifera</i>	Petrolina/PE (VSF)	MH632297	-
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CMM 0499	<i>V. vinifera</i>	Petrolina/PE (VSF)	MH632298	-
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CMM 0723	<i>V. vinifera</i>	Casa Nova/BA (VSF)	MH632299	-
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CMM 0787	<i>V. vinifera</i>	Casa Nova/BA (VSF)	MH632300	-
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CMM 0804	<i>V. vinifera</i>	Casa Nova/BA (VSF)	MH632301	-
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CMM 0933	<i>V. labrusca</i>	São Vicente Férrer/PE (VSI)	MH632302	-
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CMM 1033	<i>V. vinifera</i>	Russas/CE (VJA)	MH632303	-
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CMM 1040	<i>V. vinifera</i>	Russas/CE (VJA)	MH632304	-
<i>Lasiodiplodia xbrasiliense</i>	CMM 4659	<i>V. vinifera</i>	Russas/CE (VJA)	MG979521	MG954340
<i>Lasiodiplodia xbrasiliense</i>	CMM 4594	<i>V. vinifera</i>	Casa Nova/BA (VSF)	MG979522	MG954341
<i>Lasiodiplodia xbrasiliense</i>	CMM 4582	<i>V. vinifera</i>	Petrolina/PE (VSF)	MH632260	-
<i>Lasiodiplodia xbrasiliense</i>	CMM 4589	<i>V. vinifera</i>	Petrolina/PE (VSF)	MH632261	-
<i>Lasiodiplodia xbrasiliense</i>	CMM 4591	<i>V. vinifera</i>	Casa Nova/BA (VSF)	MH632262	-
<i>Lasiodiplodia xbrasiliense</i>	CMM 4598	<i>V. vinifera</i>	Petrolina/PE (VSF)	MH632263	-
<i>Lasiodiplodia xbrasiliense</i>	CMM 4600	<i>V. vinifera</i>	Petrolina/PE (VSF)	MH632264	-
<i>Lasiodiplodia xbrasiliense</i>	CMM 4602	<i>V. vinifera</i>	Casa Nova/BA (VSF)	MH632265	-
<i>Lasiodiplodia xbrasiliense</i>	CMM 4612	<i>V. vinifera</i>	Casa Nova/BA (VSF)	MH632266	-
<i>Lasiodiplodia xbrasiliense</i>	CMM 4624	<i>V. vinifera</i>	Petrolina/PE (VSF)	MH632267	-
<i>Lasiodiplodia xbrasiliense</i>	CMM 4645	<i>V. vinifera</i>	Russas/CE (VJA)	MH632268	-

<i>Lasiodiplodia xbrasiliense</i>	CMM 0961	<i>V. vinifera</i>	Russas/CE (VJA)	MH632269	-
<i>Lasiodiplodia xbrasiliense</i>	CMM 4647	<i>V. vinifera</i>	Russas/CE (VJA)	MH632270	-
<i>Lasiodiplodia xbrasiliense</i>	CMM 4651	<i>V. vinifera</i>	Russas/CE (VJA)	MH632271	-
<i>Lasiodiplodia xbrasiliense</i>	CMM 4654	<i>V. vinifera</i>	Russas/CE (VJA)	MH632272	-
<i>Lasiodiplodia xbrasiliense</i>	CMM 4656	<i>V. vinifera</i>	Russas/CE (VJA)	MH632273	-
<i>Lasiodiplodia xbrasiliense</i>	CMM 4658	<i>V. vinifera</i>	Russas/CE (VJA)	MH632274	-
<i>Lasiodiplodia xlaeliocattleyae</i>	CMM 4724	<i>V. vinifera</i>	Casa Nova/BA (VSF)	MG979508	MG954343
<i>Lasiodiplodia xlaeliocattleyae</i>	CMM 4596	<i>V. vinifera</i>	Petrolina/PE (VSF)	MG979507	MG954344
<i>Lasiodiplodia xlaeliocattleyae</i>	CMM 4611	<i>V. vinifera</i>	Casa Nova/BA (VSF)	MG979506	MG954345
<i>Lasiodiplodia xlaeliocattleyae</i>	CMM 4613	<i>V. vinifera</i>	Petrolina/PE (VSF)	MH632280	-
<i>Lasiodiplodia xlaeliocattleyae</i>	CMM 4614	<i>V. vinifera</i>	Casa Nova/BA (VSF)	MH632281	-

3

4 <sup>a</sup>CMM = Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos “Prof. Maria Menezes”, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil

5 <sup>b</sup>Estados brasileiros: BA = Bahia, CE = Ceará, PE = Pernambuco; Polo de Produção: VSF – Vale do São Francisco, VSI – Vale do Siriji, VJA – Vale do  
6 Jaguaribe

7 <sup>c</sup>As = tropical com verão seco; BSh = semiárido. Conforme Alvares et al. (2013)

8

## Capítulo III

---

---

### **Genetic diversity and population structure of *Lasiodiplodia theobromae* from different hosts in northeastern Brazil and Mexico**

1 **Genetic Diversity and Population Structure of *Lasiodiplodia theobromae* from**  
2 **Different Hosts in Northeastern Brazil and Mexico**

3

4 T. J. S. Rêgo<sup>1</sup>, G. E. Jiménez<sup>2</sup>, K. C. Correia<sup>3</sup>, J. M. Tovar-Pedraza<sup>4</sup>, M. P. S. Câmara<sup>1</sup>,  
5 S. J. Michereff<sup>1,3</sup>, J. Armengol<sup>2</sup>, M. Berbegal<sup>2</sup>

6

7 <sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de  
8 Pernambuco, 52710900, Recife, Pernambuco, Brasil; <sup>2</sup>Instituto Agroforestal  
9 Mediterráneo, Universitat Politècnica de València, 46022, Valencia, Spain; <sup>3</sup>Centro de  
10 Ciências Agrárias e da Biodiversidade, Universidade Federal do Cariri, 63133-610, Crato,  
11 Ceará, Brasil; <sup>4</sup>Coordinación Culiacán, Centro de Investigación en Alimentación y  
12 Desarrollo, 80110, Culiacán, Sinaloa, Mexico.

13

14 **Abstract**

15

16 The study of genetic diversity and population structure of 117 isolates of *L. theobromae*  
17 from Brazil (n=100) and Mexico (n=17) using simple repeat markers (SSR) revealed low  
18 genetic diversity among populations and the existence of two genetic groups. All Mexican  
19 isolates were grouped with Brazilian isolates suggesting a low level of differentiation  
20 between these populations. Furthermore, no evident host or climate-based population  
21 differentiation was observed for *L. theobromae* in Brazil. The populations studied were  
22 mostly clonal, but additional studies are needed to better understand the mode of  
23 reproduction of the pathogen. As populations of *L. theobromae* present low diversity in  
24 northeastern Brazil it is likely that the development of resistant cultivars is a good strategy  
25 of management.

26

27 **Keywords** Microsatellites, population biology, SSR, variability.

28

29

30 **Introduction**

31

32 Brazil ranks third in the world fruit producing countries, with more than 37 million t  
33 (FAO 2018) representing US\$ 9.5 billion in value (IBGE 2018). Fruit crops are grown  
34 widely in the country but the northeastern states are among the largest producers. In 2016,

35 the northeastern region of Brazil produced 8.7 million t of fruit, corresponding to 23.5%  
36 of the national production (IBGE 2018). Of this total, 2.1 million t were obtained from  
37 cashew, mango, papaya, and grapevine, the most economically relevant fruit crops grown  
38 in the region (IBGE 2018).

39 In recent years, fungal diseases affecting cashew, mango, papaya, and grapevine crops  
40 have been reported in northeastern Brazil, with prevalence of infections caused by  
41 members of the family Botryosphaeriaceae (Correia et al. 2013; Marques et al. 2013;  
42 Netto et al. 2014; Correia et al. 2016; Coutinho et al. 2017; Netto et al. 2017).  
43 Botryosphaeriaceae species are important pathogens of native and non-native plants  
44 worldwide (Slippers and Wingfield 2007; Philips et al. 2013; Jami et al. 2017). For  
45 instance, research on the identification and prevalence of Botryosphaeriaceae spp. in fruit  
46 producing orchards and at post-harvest conditions in northeastern Brazil showed that  
47 *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl. (syn. *Botryodiplodia theobromae* Pat.)  
48 is present in all areas studied, being the most frequent species causing dieback, gummosis,  
49 leaf spot, stem-end rot, and fruit rot symptoms (Correia et al. 2013; Marques et al. 2013;  
50 Netto et al. 2014; Correia et al. 2016; Coutinho et al. 2017; Netto et al. 2017).

51 The fungus *L. theobromae* is distributed globally in the tropics and subtropics, causing  
52 diseases in several species of host plants (Farr and Rossman 2018). *Lasiodiplodia*  
53 *theobromae*, known as a latent pathogen, is a fungus with an latent infection ability when  
54 environmental conditions favor its development, making it difficult its control (Mohali et  
55 al. 2005). In Brazil, there are few products registered for the management of *L.*  
56 *theobromae*, and are restricted to avocado (*Persea americana*), cotton (*Gossypium* spp.),  
57 *Annona* spp., banana (*Musa* spp.), cacao (*Theobroma cacao*), citrus (*Citrus* spp.), coconut  
58 (*Cocos nucifera*), and papaya (*Carica papaya*) crops (Agrofit 2018).

59 In the last 25 years, the population genetics of plant pathogens has been studied in  
60 many pathosystems (McDonald and McDermott 1993; Chen and McDonald 1996;  
61 Cortesi and Milgroom 2001; Scortichini 2005; Ciampi et al. 2008; Sakalidis et al. 2013;  
62 Berbegal et al. 2013; Gramaje et al. 2014; Mehl et al. 2017; Manawasinghe et al. 2018).  
63 The inferences obtained from genetic analysis of plant pathogen populations may be  
64 useful in studies aiming to obtain pathogen resistant cultivars and in the management of  
65 fungicides in crop systems (McDonald and Linde 2002). For example, a study of  
66 populations of *Neofusicoccum parvum*, a member of the family Botryosphaeriaceae,  
67 demonstrated that this pathogen is genetically diverse, showed 12 lines identified using

68 microsatellite markers, with some of these lineages shared between different countries  
69 (Sakalidis et al. 2013).

70 Knowledge of the amount and distribution of genetic variation within and among  
71 populations is an important component in understanding the population biology of  
72 phytopathogenic fungi (McDonald et al. 1999). A large amount of genetic diversity  
73 distributed over a small spatial scale suggests the possibility of rapid adaptation by a  
74 pathogen to environmental changes (new resistance genes in the host plant or fungicides).  
75 A high degree of genetic similarity among populations collected from widely separated  
76 geographical regions suggests the occurrence of long-distance dispersal and gene flow  
77 (McDonald et al. 1999). Furthermore, population genetic studies can be performed to  
78 infer about the contribution of asexual and sexual reproduction in populations of  
79 pathogens (Liu et al. 1996).

80 On a global scale, genetics of *L. theobromae* populations have been studied primarily  
81 using microsatellite or simple-sequence repeat (SSR) markers (Mohali et al. 2005;  
82 Begoude et al. 2012; Shah et al. 2011). SSR markers have become very valuable for  
83 population genetic analysis because they are highly polymorphic, codominant, and locus-  
84 specific (Mason 2015; Milgroom 2015). Rapidly mutating markers like SSRs offer unique  
85 advantages since divergence in contemporary populations can be observed when it is not  
86 visible using other marker systems allowing genetically separate closely related  
87 individuals (Varshney et al. 2005). In a preliminary study, Burgess et al. (2003) developed  
88 eight polymorphic SSR markers for *L. theobromae* and determined that host species  
89 seemed to influence the population structure of this pathogen.

90 Other genetic diversity studies of *L. theobromae* in South Africa, Mexico, Venezuela  
91 and Punjab suggested that this species presents predominantly clonal reproduction and  
92 frequent gene flow (Mohali et al. 2005; Shah et al. 2011). However, there are still few  
93 studies involving the population genetics of this pantropical pathogen (Burgess et al.  
94 2003; Mohali et al. 2005; Shah et al. 2010, 2011; Begoude et al. 2012). Although recent  
95 research has studied the identity, distribution, and pathogenicity of *L. theobromae* in  
96 Brazil (Marques et al. 2013; Netto et al. 2014; Machado et al. 2014; Correia et al. 2016;  
97 Rosado et al. 2016; Coutinho et al. 2017; Netto et al. 2017), currently there is no  
98 knowledge on the population genetic diversity and structure of this pathogen at a regional  
99 level, and compared with other countries.

100 In the present study, the variation in the genetic diversity of *L. theobromae* in  
101 northeastern Brazil and Mexico was analyzed using microsatellite markers with the

102 following objectives: (i) determining the diversity and structure of *L. theobromae*  
103 populations from Brazil and Mexico and, (ii) inferring the mode of reproduction of the  
104 pathogen. This information will provide critical insights into the pathogen biology and  
105 implications for disease management.

106

## 107 **Materials and methods**

108 **Fungal isolates and DNA extraction.** A total of 117 *L. theobromae* isolates from  
109 Brazil and Mexico were genotyped in this study (Supplementary Table 1). Isolates from  
110 Brazil (n = 100) and Mexico (n = 17) were obtained from the Culture Collection of  
111 Phytopathogenic Fungi “Prof. Maria Menezes” (CMM) of the Universidade Federal  
112 Rural de Pernambuco, Brazil. The identity of all isolates was confirmed by sequencing a  
113 partial region of the translation elongation factor 1-alpha (EF1- $\alpha$ ) and the rDNA ITS  
114 region as described in previous studies (Marques et al. 2013; Netto et al. 2014; Correia et  
115 al. 2016; Netto et al. 2017) (Table Supplementary 1). The population of Brazil were  
116 collected between 2006 and 2013 from cashew (n = 27), mango (n = 21), papaya (n = 29)  
117 and grapevine (n = 23), and the isolates from Mexico were collected in 2014 from mango  
118 (n = 17) (Table Supplementary 1).

119 The isolates from Brazil were grouped into two populations based on climate types  
120 according to Köppen’s climate classification map for Brazil (Alvares et al. 2013): tropical  
121 with dry summer (As) and semiarid (BSh). The As climate is located in coastal regions  
122 with a strong rainfall gradient (east to west), from 1,500 to 700 mm concentrated in a  
123 rainy season from May to July and a dry season from September to December. The BSh  
124 climate is dry, with high indices of insolation during most of the year with a drought  
125 period of nine months and a rainy period from February to April (Alvares et al. 2013).  
126 Both climate types-based populations included isolates from five states of northeastern  
127 Brazil: As climate (Ceará, Paraíba, Pernambuco, and Rio Grande do Norte) and BSh  
128 climate (Bahia, Pernambuco, and Rio Grande do Norte) (Table Supplementary 1). The  
129 Mexican isolates were obtained from mango orchards located in four states (Chiapas,  
130 Guerrero, Sinaloa, and Veracruz) (Table Supplementary 1).

131 Pure cultures of *L. theobromae* were grown in potato-dextrose-agar (PDA, Biokar  
132 diagnostics, Beauvais, France) medium and incubated at 25°C in the dark for a period of  
133 five days. Mycelium was scraped from the colony surface using a sterile pipette tip and  
134 genomic DNA was extracted using the E.Z.N.A. Plant Miniprep Kit (Omega Biotek®,  
135 Doraville, GA) following the manufacturer’s instructions.

136 **Haplotype identification.** Primers for eight previously characterized SSR loci  
137 (LAS3&4, Las13&14, LAS15&16, LAS17&18, LAS21&22, LAS27&28, LAS29&30,  
138 and LAS 35&36) (Burgess et al. 2003) were tested for specific amplification,  
139 polymorphism and reproducibility of the allele calls with a selection of 11 *L. theobromae*  
140 isolates representing different origins and hosts. Primers were synthesized by Metabion  
141 International (Berlin, Germany). All amplifications were performed in 20 µl reaction  
142 volume containing 1x PCR buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 0.2 µM each primer,  
143 0.05 U Horse-Power™ Taq DNA polymerase (Canvax Biotech, S.L. Córdoba, Spain),  
144 and 1 µl of DNA template. PCR amplifications were performed on a Veriti 96 Well  
145 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA) using the following conditions:  
146 an initial step of 5 min at 94°C, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 s,  
147 annealing at 56°C for 30 s, elongation at 72°C for 30 s and a final extension at 72°C for  
148 6 min. Amplification products were purified (Kit Quickclean, dominion MBL, Córdoba,  
149 Spain) and sequenced to validate the variation in the number of SSR repeats at the  
150 sequencing service of the Institute of Molecular and Cellular Biology of Plants (IBMCP,  
151 UPV-CSIC).

152 Fluorescent dye labeling of PCR fragments was performed for each SSR locus in one  
153 reaction using three primers: SSR forward primer with M13 tail  
154 (TGTAACGACGGCCAGT) at its 5' end, SSR reverse primer, and the fluorochrome  
155 6-carboxyfluorescein (FAM)-labeled M13 primer (TGTAACGACGGCCAGT)  
156 (Invitrogen, Carlsbad, CA), as described by Schuelke (2000) with minor modifications  
157 (Bebegal et al. 2013). PCR reactions (20 µl) were performed with the following final  
158 concentrations: 1x PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 0.04 µM M13-SSRf primer, 0.16 µM  
159 SSRr primer, 0.16 µM FAM-M13 primer, 0.05 U Horse-Power™ Taq DNA polymerase,  
160 and 1 µl of DNA template. The PCR program consisted of an initial step of 2 min for  
161 94°C followed by 35 cycles of denaturation 94°C for 30 s, 56°C for 30 s, 72°C 30 s, and  
162 final extension 72°C for 6 min.

163 Samples were prepared in 96-well plates using 0.13 µl of *GeneScan™500 LIZ®*  
164 internal standard (Applied Biosystems), 10.87 µl of Hi-Di Formamide (Applied  
165 Biosystems), and 1 µl of the SSR-PCR product, obtaining a total volume of 12 µl. A  
166 negative control was included in each plate. Capillary electrophoresis to determine the  
167 sizes of the fluorescent labeled fragments was performed on a 3130xl/Genetic Analyzer®  
168 sequencer (Applied Biosystems) at the sequencing service of the Institute of Molecular  
169 and Cellular Biology of Plants (IBMCP, UPV-CSIC). Allele sizes were determined using



170 the GeneMarker V2.6.3 software package (Applied Biosystems). The analysis was  
171 replicated for a subset of isolates to confirm reproducibility of results.

172 **Data analysis.** *Genetic diversity and mode of reproduction.* For each population  
173 defined either by country of origin or climate within northeastern Brazil, the total number  
174 of alleles and allele frequencies at each SSR locus were estimated. A multilocus genotype  
175 (MLG) was constructed for each isolate by combining data for single SSR alleles and  
176 expected multilocus genotype (eMLG) based on rarefaction were calculated using the R  
177 package *poppr* V.2.3.0 (R Core Team 2017; Kamvar et al. 2015). Given the clonality  
178 observed analyses were conducted for the clone-corrected data set, only one isolate of  
179 each MLG for each geographical location and host by population were considered. The  
180 Stoddart and Taylor's diversity index (G) (1988) and evenness index  $E_5$  (Grünwald et al.  
181 2003) were calculated using the same R package.

182 The standardized index of association ( $r_{barD}$ ) as an estimate of linkage disequilibrium,  
183 was calculated to investigate the mode of reproduction (Agapow and Burt 2001; Kamvar  
184 et al. 2015). The expectation of  $r_{barD}$  for a randomly mating population is zero and  
185 significant deviation from this value would suggest clonal reproduction. The test was not  
186 performed in Mexico population with a very low sample size after clone correction due  
187 to lack of statistical power (Fincham and Day 1963). Significance was tested based on  
188 999 permutations and conducted in the R package *poppr* using the clone corrected data  
189 (Kamvar et al. 2015).

190 *Population structure.* The standardized measure of genetic differentiation  $G'st$   
191 described by Hedrick (2005) is suitable to estimate subdivision among populations. It  
192 ranges from 0 to 1, independent of the extent of populations genetic variation and loci  
193 mutation rates (Hedrick 2005). Pairwise  $G'st$  values within the clone corrected data were  
194 calculated using the R packages *strataG* V.1.0.5 (Archer et al. 2017) and *mmod* V.1.3.3  
195 (Winter 2012). Statistical significance was calculated based on 1000 permutations.  
196 Analysis of Molecular Variance (AMOVA) was performed using the R package *ade4*  
197 V.1.7-5 (Dray and Dufour 2007; Excoffier et al. 1992). AMOVA was calculated on clone  
198 corrected data to estimate the variance explained by populations defined by country of  
199 origin or individuals within populations. Statistical significance was tested using 999  
200 permutations.

201 Discriminant analysis of principal components (DAPC) was performed to infer  
202 clusters of populations without considering previous geographic/climate types-based  
203 assignment criteria. This approach is based on sequential K-means clustering of principal

204 component analysis (PCA) and discriminant analysis (DA) (Jombart et al. 2010). DAPC  
205 was conducted with the R package *adegenet* V. 2.0.1 (Jombart 2008) using the Bayesian  
206 information criterion (BIC) to infer the optimal number of groups. Important advantages  
207 of the DAPC are that maximizes variation between the groups, minimizing the within-  
208 group genetic variability and it does not require assumptions regarding evolutionary  
209 models (Jombart et al. 2010).

210 To assess the relationships among MLGs, minimum spanning network (MSN) was  
211 constructed from the clone-corrected dataset including isolates from Brazil and Mexico.  
212 Bruvo's genetic distance matrix and MSN were generated using the R package *poppr*  
213 V.2.3.0 (Kamvar et al. 2015; R Core Team 2017). Genetic distance described by Bruvo  
214 et al. (2004), takes SSR repeat number into account being a distance of 0.1 equivalent to  
215 one mutational step (one repeat). The neighbor-joining algorithm based on Bruvo's  
216 distance was also run using the same R package with 1,000 bootstrap replicates. In the  
217 resulting tree, DAPC clustering was represented to visualize how both clustering patterns  
218 hold up.

219

## 220 **Results**

221 Six of the eight primer pairs successfully amplified SSR loci for *L. theobromae* from  
222 Brazil and Mexico. Allele sizes determined by DNA sequencing of 11 representative  
223 isolates were consistent with allele sizes determined by fragment analysis. Three loci  
224 (Las3&4, Las21&22, and Las35&36) were polymorphic for the 117 isolates genotyped.  
225 The number of observed alleles per locus was 4 resulting in a total of 11 MLGs (Table  
226 1). The Brazilian population exhibited 5 MLGs, the Mexican population 4 MLGs, and  
227 both populations shared 2 MLGs (Figure 1A).

228 A clone correction of data set was performed to remove the bias of resampled MLG in  
229 the analysis, resulting in 42 representative isolates of the two climate types (17 in BSh  
230 and 25 in As) of northeastern Brazil and 10 representative isolates of Mexico. Of the 6  
231 MLGs observed in the Mexican population, the most frequent one was MLG11 (40%),  
232 followed by MLG7 (20%); the remaining 4 MLGs were observed once (10%) (Figure  
233 1A). In Brazil, 6 (MLG1, MLG3, MLG4, MLG5, MLG6, and MLG7) of the 7 MLGs  
234 were present in the two climate types studied (Figure 2B). The most frequent MLG was  
235 MLG7 (47.6%), followed by MLG6 (21.4%), and the less frequent MLGs were MLG1  
236 and MLG2 (4.8%), with genotype MLG2 exclusive of the As climate population (Figure  
237 2B).

238 In general, populations showed low genetic diversity. The genotypic richness (R) for  
239 the Mexican population was higher (0.56) than the observed for the Brazilian population  
240 (0.15) (Table 1). Evenness ( $E_5$ ) values were 0.66 and 0.79 for Brazilian and Mexican  
241 populations, respectively (Table 1). A high level of genotypic diversity (G) was observed  
242 for the Mexican population (4.17) whereas the Brazilian population exhibited lower  
243 diversity (3.42) (Table 1). When considering the Brazilian populations defined by climate  
244 types, R and  $E_5$  values were low and similar for both populations, ranging from 0.31 to  
245 0.25 and from 0.71 to 0.66, for BSH and As populations respectively (Table 1). Genotypic  
246 diversity values observed were also low for populations of different climate types in  
247 Brazil (3.32 and 3.42 for BSh and As populations, respectively) (Table 1).

248 Global population from Brazil showed significant deviation in  $r_{barD}$  value from the  
249 null hypothesis of recombination supporting clonal reproduction (Table 1). However,  
250 when considering populations defined by climate types in Brazil, As population showed  
251 consistent results with the global population but for BSh population the null hypothesis  
252 could not be rejected ( $P = 0.016$ ) indicating linkage equilibrium or presence of sexual  
253 reproduction (Table 1).

254 The minimum spanning network (MSN) revealed two main groups when considering  
255 the global population of Brazil and Mexico. The first group included MLGs of both  
256 countries and the second group only two MLGs exclusive of Brazil (MLG3 and MLG4)  
257 (Figure 1A). The MSN performed between the isolates belonging to the two different  
258 climate types of northeastern Brazil showed one main group which was present in both  
259 populations including the most frequent MLGs (MLG6 and MLG7), and a second small  
260 group with two MLGs being one MLG exclusive of the As population (MLG2) (Figure  
261 1B).

262 The Bruvo's distance-based dendrogram using Neighbor-Joining grouped the 11  
263 genotypes of the global population into two groups. The cluster I consisted of two MLGs  
264 and cluster II included nine MLGs. Multivariate analysis showed the presence of five  
265 subgroups represented by colors in the dendrogram, where cluster I grouped one subgroup  
266 (green) and cluster II grouped four (purple, blue, black and red) (Figure 2A). For  
267 northeastern Brazil populations, two main groups were also identified. Cluster I was  
268 represented by two MLGs (MLG1 and MLG2) whereas the rest of the MLGs were  
269 grouped in the Cluster II. The multivariate analysis showed four subgroups in the  
270 dendrogram, where cluster I grouped one subgroup (blue) and cluster II grouped three  
271 (red, green, and purple) (Figure 2B).

272 Pairwise  $G'st$  values calculated on the clone corrected data showed very low genetic  
273 differentiation among Mexico and Brazil populations and within Brazilian populations  
274 ( $G'st = 0.104$  and  $G'st = 0.014$ , respectively,  $P > 0.01$ ). Results of population subdivision  
275 analysis based on  $G'st$  were consistent with those obtained by the AMOVA. Analysis of  
276 molecular variance on the clone corrected data revealed only 3.4% of variation between  
277 Mexican and Brazilian populations ( $P = 0.16$ ). None of the calculated values were  
278 statistically significant showing that further sampling is likely needed.

279

## 280 Discussion

281 To the best of our knowledge, this is the first study that aims to investigate the genetic  
282 structure and the mode of reproduction of a *L. theobromae* collection obtained from Brazil  
283 and Mexico. These populations were defined based on the country of origin and climate  
284 types within northeastern Brazil and the analysis was performed using the microsatellite  
285 markers developed by Burgess et al. (2003) to analyze *L. theobromae* isolates collected  
286 from pines and eucalyptus in South Africa, Mexico, and Indonesia.

287 Minimum spanning network analysis and discriminant analysis of principal  
288 components identified two distinct genetic clusters in the Brazilian and Mexican  
289 populations of *L. theobromae*, the first one with nine MLGs including the two most  
290 common MLGs found in this study (MLG11 and MLG10), and the second one containing  
291 only two MLGs in Brazil (MLG3 and MLG4). All Mexican isolates were grouped with  
292 Brazilian isolates suggesting the existence of a low level of differentiation between these  
293 populations. These results agree with those obtained by Burgess et al. (2003) indicating  
294 that geographical location did not determine the genetic relationship between isolates of  
295 *L. theobromae*.

296 The two MLGs only found in Brazil were identified in mango and cashew isolates.  
297 Both crops belong to the family Anacardiaceae and are not annual crops in the areas  
298 studied. A single mango isolate belonged to the two exclusive MLGs in Brazil and was  
299 obtained from an orchard with a conventional cultivation system and located  
300 approximately 149 km apart from cashew. The cashew tree is a native plant from Brazil  
301 and its cultivation was considered in the past an extractive activity. In general, the  
302 orchards are little capitalized and farmers do not use modern inputs (Leite and Pessoa  
303 2009). In another study, the movement of Botryosphaeriaceae species among the native  
304 tree *Syzygium cordatum* and plantations of *Eucalyptus* spp., both from the family  
305 Myrtaceae, was observed (Pavlic et al. 2007). In a more recent complementary study

306 using SSR markers to analyze 114 isolates of the *Neofusicoccum parvum*/*N. ribis*  
307 complex from South Africa, greater genetic diversity was observed in the population  
308 isolated from native tree *Syzygium cordatum*, with isolates assigned to three  
309 subpopulations showing little or no differentiation between them (Pavlic-Zupanc et al.  
310 2015).

311 No evident population differentiation based on host or climate was observed for *L.*  
312 *theobromae* in Brazil. These results are consistent with those found in previous studies  
313 where the relationships between *L. theobromae* isolates from different hosts and  
314 geographical origins did not contribute in the differentiation of pathogen haplotypes  
315 (Begoude et al. 2012; Mohali et al. 2005).

316 *Lasiodiplodia theobromae* spores develop in a sticky matrix, are relatively large (21.5–  
317 31.5 × 13–17 µm) (Phillips et al. 2013), and can be dispersed by wind or rain splash  
318 (Úrbez-Torres 2011). In this context, the spores are not likely to be spread over large  
319 distances (Mehl et al. 2017). Another explanation for the genetic similarity among the  
320 studied populations would be the movement of infected material (Begoude et al. 2012).  
321 *Lasiodiplodia theobromae* is recognized as a latent pathogen that could be dispersed when  
322 seeds or asymptomatic plant material are moved between different regions (Burgess et al.  
323 2016; Mohali et al. 2005). In a recent study, Mehl et al. (2017) suggested that *L.*  
324 *theobromae* isolates collected from different hosts and countries of the world represent a  
325 single species distributed worldwide, without apparent phylogeographic structure, and  
326 commented that the only possible explanation for this result is the long-distance human  
327 dispersal of this pathogen.

328 Seven MLGs were obtained using the SSR markers in the populations of *L.*  
329 *theobromae* from Brazil. The lack of diversity found in this study emphasizes the low  
330 genetic diversity of this fungus in northeastern Brazil. Some other studies have analyzed  
331 the genetic structure of *L. theobromae* populations from different countries and hosts with  
332 variable results. Begoude et al. (2012) reported high to moderate levels of genetic  
333 diversity of *L. theobromae* collected from *Theobroma cacao* and *Terminalia* spp. in  
334 Cameroon. Mohali et al. (2005) reported low levels of genotypic diversity of *L.*  
335 *theobromae* collected from *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, *Eucalyptus urophylla* and  
336 *Acacia mangium* in Venezuela, and Shah et al. (2011) reported high levels of genetic  
337 diversity of *L. theobromae* collected from *Pyrus* sp. in India. These variable results might  
338 be related to the intrinsic characteristics of the different countries and hosts used in each  
339 study. Botryosphaeriaceae species are known for their role as endophytes, pathogens, and

340 saprophytes in different host plants (Phillips et al. 2013). *Lasiodiplodia theobromae* can  
341 establish in tropical, subtropical and temperate regions, causing diseases in more than 370  
342 plant species. (Farr and Rossmann 2018; Slippers et al. 2017). This innate plasticity  
343 observed in *L. theobromae* increases its importance as a plant pathogen, since  
344 microorganisms with large ecological niches may show greater potential to colonize new  
345 habitats (Lee and Gelembiuk 2008).

346 Although studies for *L. theobromae* are scarce, there is some information available on  
347 the genetic diversity of other Botryosphaeriaceae populations from different host plants  
348 and geographic origins. For example, in a recent study of 151 *Botryosphaeria dothidea*  
349 isolates obtained mainly from grapevine in China and overseas using SSR markers, a high  
350 diversity of *B. dothidea* was observed and five genetic populations were identified  
351 including isolates from different hosts within China and other countries, indicating both  
352 endemic host shifts and exotic introduction (Manawasinghe et al. 2018).

353 Stevens (1925) reported *Botryosphaeria rhodina* (Berk. and M. A. Curtis) Arx. as the  
354 teleomorph of *L. theobromae* for the first time in 1925. However, Crous et al. (2006)  
355 restricted the nomenclature *Botryosphaeria* to *B. dothidea* and *B. corticis*, being this  
356 genus no longer applied to the sexual state of *Lasiodiplodia* species. This decision was  
357 based on the lack of concise reports on the connection between *B. rhodina* and *L.*  
358 *theobromae*. In addition, in recent years, cryptic species have been described from isolates  
359 previously identified as *L. theobromae* (Burgess et al. 2006; Alves et al. 2008; Cruywagen  
360 et al. 2017), leading to uncertainty on the accuracy of information regarding the sexual  
361 status of *L. theobromae* (Begoude et al. 2012). In the present study, linkage disequilibrium  
362 analysis showed evidence of recombination in *L. theobromae* population of the BSh  
363 climate type. However, in nature, it is difficult to observe sexual structures of *L.*  
364 *theobromae* and the fungus appears to exist predominantly in an asexual form (Mohali et  
365 al. 2005).

366 In Brazil, the BSh climate type is characterized by annual mean precipitation of less  
367 than 800 mm (Alvares et al. 2013). The conditions of temperature, luminosity and relative  
368 humidity of the air in that region, as well as the use of technologies, such as irrigation  
369 management, allow for the intensive fruit production throughout the year. However, it is  
370 likely that stress conditions experienced by plants are extended to plant pathogens by  
371 forcing them to recombine. Thus, our results suggest that *L. theobromae* may develop  
372 sexual state in its life cycle under such conditions. In a previous study performed by  
373 Begoude et al. (2012), using SSR markers with populations of *L. theobromae* and *L.*

374 *pseudotheobromae* from *Terminalia* spp. and *T. cacao*, these authors observed that these  
375 two species develop regular sexual reproduction in humid forests areas with bimodal  
376 rainfall in Cameroon. Considering the results obtained, it is difficult to reach conclusions  
377 about the species mode of reproduction and further research is needed to analyze such  
378 questions.

379 Overall, in the present study, the population structure and mode of reproduction of *L.*  
380 *theobromae* were explored using the microsatellite markers developed by Burgess et al.  
381 (2003). The results showed low genetic diversity, and two genetic clusters were  
382 identified, without structure based on the geographic region, host of origin or climate  
383 type. Populations studied were mostly clonal but further studies are needed to better  
384 understand the mode of reproduction of the pathogen. Our results suggest that the  
385 management of *L. theobromae* infections won't likely be so challenging as for other  
386 Botryosphaeriaceae species. For example, development of resistant cultivars for  
387 commercial cultivation could be used to reduce the impact of diseases caused by *L.*  
388 *theobromae*. Since populations of this latent pathogen present low diversity in  
389 northeastern Brazil, it is possible that the durability of resistant cultivars would be  
390 relatively long-lived (McDonald and Linde 2002).

391

### 392 **Acknowledgments**

393 This study was financial supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal  
394 de Nível Superior–CAPES, “Ciência sem Fronteiras–CAPES” (process number  
395 88881.132070/2016-01) and the Universitat Politècnica de València. We thank Maela  
396 León and Valentin Garrigues (Universidad Politècnica de València, Valencia, Spain) for  
397 laboratory support.

398

399

400 **Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

401

### 402 **Literature Cited**

403

404 Agapow, P. M., and Burt, A. 2001. Indices of multilocus linkage disequilibrium.  
405 Molecular Ecology Notes 1:101–102.

- 406 Agrofit: Sistemas de agrotóxicos fitossanitários. Brasília, Brazil: Ministério da  
407 Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2018.  
408 [[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)].
- 409 Alvares, C. A., Stape, J. L., Sentelhas, P. C., Gonçalves, J. L. M., and Sparovek, G.  
410 Köppen's climate classification map for Brazil. 2013. *Meteorologische Zeitschrift*  
411 22:711–728.
- 412 Alves, A., Crous, P. W., Correia, A., Phillips, A. J. L. 2008. Morphological and molecular  
413 data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity* 28:1–  
414 13.
- 415 Archer, F. I., Adams P. E., and Schneiders, B. B. 2017. STRATAG: An R package for  
416 manipulating, summarizing and analysing population genetic data. *Molecular*  
417 *Ecology* 17:5–11.
- 418 Arnaud-Haond, S., Duarte, C. M., Alberto, F., and Serrao, E. A. 2007. Standardizing  
419 methods to address clonality in population studies. *Mol. Ecol.* 16:5115-5139.
- 420 Begoude, A. D. B., Slippers, B., Perez, G., Wingfield, M. J. and Roux, J. 2012. High gene  
421 flow and outcrossing within populations of two cryptic fungal pathogens on a native  
422 and non-native host in Cameroon. *Fungal Biology* 116:343–353.
- 423 Berbegal, M., Pérez-Sierra, A., Armengol, J., and Grünwald N. J. 2013. Evidence for  
424 multiple introductions and clonality in Spanish populations of *Fusarium*  
425 *circinatum*. *Phytopathology* 103:851–861.
- 426 Bruvo, R., Michiels, N. K., D'Souza, T. G., and Schulenburg, H. 2004. A simple method  
427 for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level.  
428 *Mol. Ecol.* 13:2101-2106.
- 429 Burgess, T. I., Crous, C. J., Slippers, B. Hantula, J., and Wingfield, M. J. 2016. Tree  
430 invasions and biosecurity: Eco-evolutionary dynamics of hitchhiking fungi. *AoB*  
431 *Plants* 8:plw076.
- 432 Burgess, T. I., Barber, P. A., Mohali, S., Pegg, G., de Beer, W., and Wingfield M. J. 2006.  
433 Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence  
434 comparisons and morphology. *Mycologia* 98:423–435.
- 435 Burgess, T. I., Wingfield, M. J., and Wingfield, B. D. 2003. Development and  
436 characterization of microsatellite loci for the tropical tree pathogen *Botryosphaeria*  
437 *rhodina*. *Molecular Ecology Notes* 3:91–94.



- 438 Chen, R. S., and McDonald, B. A. 1996. Sexual reproduction plays a major role in the  
439 genetic structure of populations of the fungus *Mycosphaerella graminicola*.  
440 Genetics 142:1119–1126.
- 441 Ciampi, M. B., Meyer, M. C., Costa, M. J. N., Zala, M., McDonald, B. A., Ceresini P. C.  
442 2008. Genetic structure of populations of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-1  
443 IA from soybean in Brazil. Phytopathology 98:932–941.
- 444 Correia, K. C., Câmara, M. P. S., Barbosa, M. A. G., Sales, R. J. R., Agustí-Brisach, C.,  
445 Gramaje, D., García-Jiménez, J., Abad-Campos, P., Armengol, J., and Michereff,  
446 S. J. 2013. Fungal trunk pathogens associated with table grape decline in  
447 Northeastern Brazil. Phytopathologia Mediterranea 52:380–387.
- 448 Correia, K. C., Silva, M. A., Morais Júnior, M. A., Armengol, J., Phillips, A. J. L.,  
449 Câmara, M. P. S., and Michereff, S. J. 2016. Phylogeny, distribution and  
450 pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of table grape in the  
451 main Brazilian exporting region. Plant Pathology 65:92–103.
- 452 Cortesi, P., and Milgroom, M. G. 2001. Outcrossing and diversity of vegetative  
453 compatibility types in populations of *Eutypa lata* from grapevines. Journal of Plant  
454 Pathology 83:79–86.
- 455 Coutinho, I. B. L., Freire, F. C. O., Lima, C. S., Lima, J. S., Gonçalves, F. J. T., Machado,  
456 A. R., Silva, A. M. S., and Cardoso, J. E. 2017. Diversity of genus *Lasiodiplodia*  
457 associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. Plant  
458 Pathology 66:90–104.
- 459 Crous, P. W., Slippers, B., Wingfield, M. J., Rheeder, J., Marasas, W. F. O., Phillips, A.  
460 J. L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P., and Groenewald, J. Z. 2006. Phylogenetic  
461 lineages in the Botryosphaeriaceae. Studies in Mycology 55:239–257.
- 462 Cruywagen, E. M., Slippers, B., Roux, J., and Wingfield, M. J. 2017. Phylogenetic  
463 species recognition and hybridisation in *Lasiodiplodia*: a case study on species from  
464 baobabs. Fungal Biology 121:420–436.
- 465 Dray, S., and Dufour, A. B. 2007. The ade4 package: implementing the duality diagram  
466 for ecologists. Journal of Statistical Software 22:1–20.
- 467 Excoffier, L., Smouse, P. E., and Quattro, J. 1992. Analysis of molecular variance inferred  
468 from metric distances among DNA haplotypes: Application to human  
469 mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131:479–491.
- 470 FAO. 2018. FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations.  
471 Online publication. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>

- 472 Farr, D. F., and Rossman, A. Y. 2018. Fungal databases: U.S. National Fungus  
473 Collections, ARS, USDA. Online publication. [https://nt.ars-](https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/)  
474 [grin.gov/fungaldatabases/](https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/)
- 475 Fincham, J. R. S., and Day, P. R. 1963. Fungal Genetics. Ed. Blackwell Scientific  
476 Publication, Oxford, UK.
- 477 Gramaje, D., León, M., Santana, M., Crous, P. W., and Armengol, J. 2014. Multilocus  
478 ISSR Markers Reveal Two Major Genetic Groups in Spanish and South African  
479 Populations of the Grapevine Fungal Pathogen *Cadophora luteo-olivacea*. PLOS  
480 ONE 9 e110417.
- 481 Grünwald, N. J., Goodwin, S. B., Milgroom, M. G., and Fry, W. E. 2003. Analysis of  
482 genotypic diversity data for populations of microorganisms. *Phytopathology* 93:  
483 738–746.
- 484 Hedrick, P. W. 2005. A standardized genetic differentiation measure. *Evolution* 59:1633-  
485 1638.
- 486 IBGE. 2018. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Online publication.  
487 [https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2013-agencia-de-](https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2013-agencia-de-noticias/releases/16814-pam-2016-valor-da-producao-agricola-nacional-foi-20-maior-do-que-em-2015.html)  
488 [noticias/releases/16814-pam-2016-valor-da-producao-agricola-nacional-foi-20-](https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2013-agencia-de-noticias/releases/16814-pam-2016-valor-da-producao-agricola-nacional-foi-20-maior-do-que-em-2015.html)  
489 [maior-do-que-em-2015.html](https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2013-agencia-de-noticias/releases/16814-pam-2016-valor-da-producao-agricola-nacional-foi-20-maior-do-que-em-2015.html)
- 490 Jami F., Wingfield M. J., Gryzenhout M., and Slippers B. 2017. Diversity of tree-infecting  
491 Botryosphaerales on native and non-native trees in South Africa and Namibia.  
492 *Australasian Plant Pathology* 46:529–545.
- 493 Jombart, T. 2008. Adegnet: R package for the multivariate analysis of genetic markers.  
494 *Bioinformatics* 24:1403–1405.
- 495 Jombart, T., Devillard, S., and Balloux, F. 2010. Discriminant analysis of principal  
496 components: a new method for the analysis of genetically structured populations.  
497 *BCM Genetics* 11:94.
- 498 Kamvar, Z. N., Brooks, J. C., and Grunwald, N. J. 2015. Novel R tools for analysis of  
499 genome-wide population genetic data with emphasis on clonality. *Frontiers in*  
500 *Genetics* 6:208.
- 501 Lee, C. E., and Gelembiuk, G. W. 2008. Evolutionary origins of invasive populations.  
502 *Evolutionary Applications* 1:427–448.
- 503 Leite, L. A. S., and Pessoa, P. F. A. P. 2009. Ageitec – Agência Embrapa de Informação  
504 Tecnológica. Brasília, Brazil: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

- 505 [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/caju/arvore/CONT000fyr9ldm402  
506 wx5ok0pvo4k3azmedk1.html].
- 507 Liu, Y. C., Double, M. L., MacDonald, W. L., Cortesi, P., and Milgroom, M. G. 1996.  
508 Diversity and multilocus genetic structure in populations of *Cryphonectria*  
509 *parasitica*. *Phytopathology* 86:1344–1351.
- 510 Machado, A. R., Pinho, D. B., and Pereira, O. L. 2014. Phylogeny, identification and  
511 pathogenicity of the Botryosphaeriaceae associated with collar and root rot of the  
512 biofuel plant *Jatropha curcas* in Brazil, with a description of new species of  
513 *Lasiodiplodia*. *Fungal Diversity* 67:231–47.
- 514 Manawasinghe, I. S., Zhang, W., Li, X., Zhao, W., Chethana, W. K. T., Xu, J., Chen, Z.,  
515 Dissanayaka, A. J., Mugnai, L., Úrbez-Torres, J. R., Savocchia, S., Hyde, K. D.,  
516 and Yan, J. 2018. Novel microsatellite markers reveal multiple origins of  
517 *Botryosphaeria dothidea* causing the Chinese grapevine trunk disease. *Fungal*  
518 *Ecology* 33:134–142.
- 519 Marques, M. W., Lima, N. B., Morais Junior, M. A., Barbosa, M. A. G., Souza, B. O.,  
520 Michereff, S. J., Phillips, A. J. L., and Câmara, M. P. S. 2013. Species of  
521 *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. *Fungal Diversity* 61:181–93.
- 522 Mason, A. S. 2015. SSR Genotyping. In: Batley J, editor. *Plant Genotyping*. Springer;  
523 New York, NY: pp. 77–89.
- 524 McDonald, B. A., and Linde, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary  
525 potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40:349-379.
- 526 McDonald, B. A., and McDermott, J. M. 1993. The population genetics of plant  
527 pathogenic fungi. *BioScience* 43:311–319.
- 528 McDonald, B. A., Zhan, J., and Burdon, J. J. 1999. Genetic structure of *Rhynchosporium*  
529 *secalis* in Australia. *Phytopathology* 89:639–45.
- 530 Mehl, J., Wingfield, M. J., Roux, J., and Slippers, B. 2017. Invasive everywhere?  
531 Phylogeographic analysis of the globally distributed tree pathogen *Lasiodiplodia*  
532 *theobromae*. *Forests* 8:145. Doi: 10.3390/f8050145.
- 533 Milgroom, M. G. 2015. *Population Biology of Plant Pathogens: Genetics, Ecology, and*  
534 *Evolution*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
- 535 Mohali, S., Burgess, T. I., and Wingfield, M. J. 2005. Diversity and host association of  
536 the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple  
537 sequence repeat markers. *Forest Pathology* 35:385-396.

- 538 Netto, M. S. B., Assunção, I. P., Lima, G. S. A., Marques, M. W., Lima, W. G., Monteiro,  
539 J. H. A., Balbino, V. Q., Michereff, S. J., Phillips, A. J. L., and Câmara, M. P. S.  
540 2014. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil.  
541 Fungal Diversity 67:127–41.
- 542 Netto, M. S. B., Lima, W. G., Correia, K. C., Silva, C. F. B. D., Thon, M., Martins, R. B.,  
543 Miller, R. N. G., Michereff, S. J., and Câmara, M. P. S. 2017. Analysis of  
544 phylogeny, distribution, and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species  
545 associated with gummosis of *Anacardium* in Brazil, with a new species of  
546 *Lasiodiplodia*. Fungal Biology 121:437–451.
- 547 Pavlic, D., Slippers, B., Coutinho, T. A., Wingfield, M. J. 2007. Botryosphaeriaceae  
548 occurring on native *Syzygium cordatum* in South Africa and their potential threat to  
549 *Eucalyptus*. Plant Pathology 56:624–636.
- 550 Pavlic-Zupanc, D., Wingfield, M. J., Boissin, E., and Slippers, B. 2015. The distribution  
551 of genetic diversity in the *Neofusicoccum parvum*/*N. ribis* complex suggests  
552 structure correlated with level of disturbance. Fungal Ecology 13:93–102.
- 553 Phillips, A., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M., Groenewald, J.,  
554 and Crous, P. W. 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from  
555 culture. Studies in Mycology 76:51–167.
- 556 R Core Team. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R  
557 Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available: [http://www.R-](http://www.R-project.org)  
558 [project.org](http://www.R-project.org).
- 559 Rosado, A. W. C., Machado, A. R., Freire, F. O., and Pereira, O. L. 2016. Phylogeny,  
560 identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia* associated with postharvest stem-  
561 end rot of coconut in Brazil. Plant Disease 100:561–568.
- 562 Sakalidis, M.L., Slippers, B., Wingfield, B.D., Hardy, G. E. S. J., and Burgess, T. I. 2013.  
563 The challenge of understanding the origin, pathways and extent of fungal invasions:  
564 Global populations of the *Neofusicoccum parvum*-*N. ribis* species complex.  
565 Diversity and Distributions 19:873–883.
- 566 Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments.  
567 Nature Biotechnology 18:233–234.
- 568 Scortichini, M. 2005. The population structure of some plant pathogenic bacteria: an  
569 ecological and adaptive perspective. Journal of Plant Pathology 87:5–12.
- 570 Shah, M. D., Verma, K.S., Sing, K., and Kaur, R. 2010. Morphological, pathological and  
571 molecular variability in *Botryodiplodia theobromae* (Botryosphaeriaceae) isolates

- 572 associated with dieback and bark canker of pear trees in Punjab, India. *Genetics and*  
573 *Molecular Research* 9:1217-1228.
- 574 Shah, M. D., Verma, K. S., Singh, K., Kaur, R. 2011. Genetic diversity and gene flow  
575 estimates among three populations of *Botryodiplodia theobromae* causing dieback  
576 and bark canker of pear in Punjab. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*  
577 44:951–960.
- 578 Slippers, B., Crous, P. W., Jami, F., Groenewald, J. Z., and Wingfield, M. J. 2017.  
579 Diversity in the Botryosphaeriales: Looking back, looking forward. *Fungal Biology*  
580 121:307–321.
- 581 Slippers, B., and Wingfield, M. J. 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent  
582 pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews*  
583 21:90–106.
- 584 Stevens, N. E. 1925. The life history and relationships of *Diplodia gossypina*. *Mycologia*  
585 17:191–201.
- 586 Stoddart, J. A., and Taylor, J. F. 1988. Genotype diversity: estimation and prediction in  
587 samples. *Genetics* 118:705–711.
- 588 Úrbez-Torres, J. R. 2011. The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines.  
589 *Phytopathologia Mediterranea* 50:S5–S45.
- 590 Varshney, R. K., Graner, A., Sorrells, M. E. 2005. Genomics assisted breeding for crop  
591 improvement. *Trends in Plant Science* 10:621-630.
- 592 Winter, D. J. 2012. Mmod: an R library for the calculation of population differentiation  
593 statistics. *Molecular Ecology Resources* 12:1158–1160.
- 594
- 595
- 596
- 597
- 598
- 599
- 600
- 601
- 602
- 603
- 604
- 605

606

607

608 **Table 1.** Genetic diversity and linkage disequilibrium among loci based on the  
 609 standardized index of association (rbarD) of the populations of *Lasiodiplodia theobromae*  
 610 defined by country of origin or by climate types within northeastern Brazil<sup>a</sup>.

Parameters <sup>b</sup>	Country		Climate types within northeastern Brazil	
	Brazil	Mexico	Semiarid (BSh)	Tropical dry summer (As)
Sample size (N)	42	10	17	25
MLG	7	6	6	7
eMLG	4.5	6	6	6.1
Genotypic richness (R)	0.15	0.56	0.31	0.25
Evenness ( $E_5$ )	0.66	0.79	0.71	0.66
Diversity (G)	3.42	4.17	3.32	3.42
rbarD	0.36	nc	0.27	0.40
<i>P</i> -value	0.001	nc	0.016	0.001

611 <sup>a</sup> The set of nonredundant indices of genotypic diversity recommended by Arnaud-Haond  
 612 et al. (2007) was calculated for each population clone-corrected dataset.

613 <sup>b</sup> MLG, number of multilocus genotypes observed; eMLG, expected multilocus  
 614 genotypes based on rarefaction; R, genotypic richness,  $R = (G - 1)/(N - 1)$ ;  $E_5$ , evenness  
 615 index adapted from Simpson diversity; G, Stoddart and Taylor's diversity (Stoddart and  
 616 Taylor 1988) genotypic diversity; rbarD, the standardized index of association; *P*-value  
 617 for rbarD; nc, cannot be calculated.

618 **Figure captures.**

619

620 **Figure 1.** Minimum spanning network showing the relationships among the  
 621 individual multilocus genotypes (MLGs). **A.** The populations from Brazil (BR) and  
 622 Mexico (MX). **B.** The northeastern Brazil population of *Lasiodiplodia theobromae*  
 623 defined by climate types (Alvares et al. 2013). Each node represents a different MLG.  
 624 Distances and thickness of the lines between nodes are proportional to Bruvo's  
 625 distance (Bruvo et al. 2004). Node colors and sizes correspond the population studied  
 626 and number of individuals, respectively.

627

628 **Figure 1A.**

629

630

631

632

633 POPULATION

634 ■ BR

635 ■ MX

636

637

638

639

640

641

642

643

644

645

646

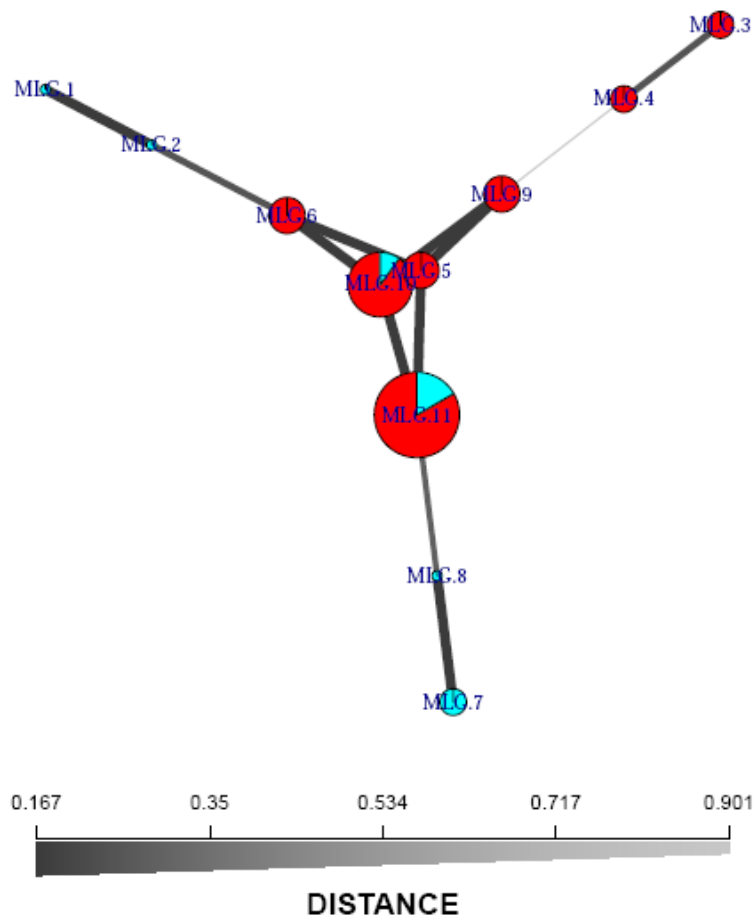
647

648

649

650

651



652

653 **Figure 1B.**

654

655

656 POPULATION

657 ■ BSh

658 ■ As

659

660

661

662

663

664

665

666

667

668

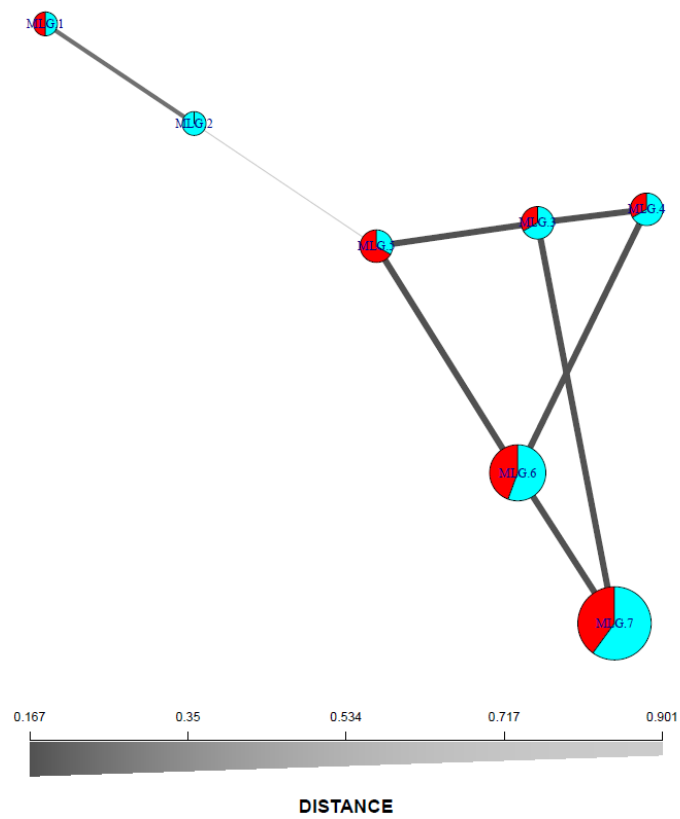
669

670

671

672

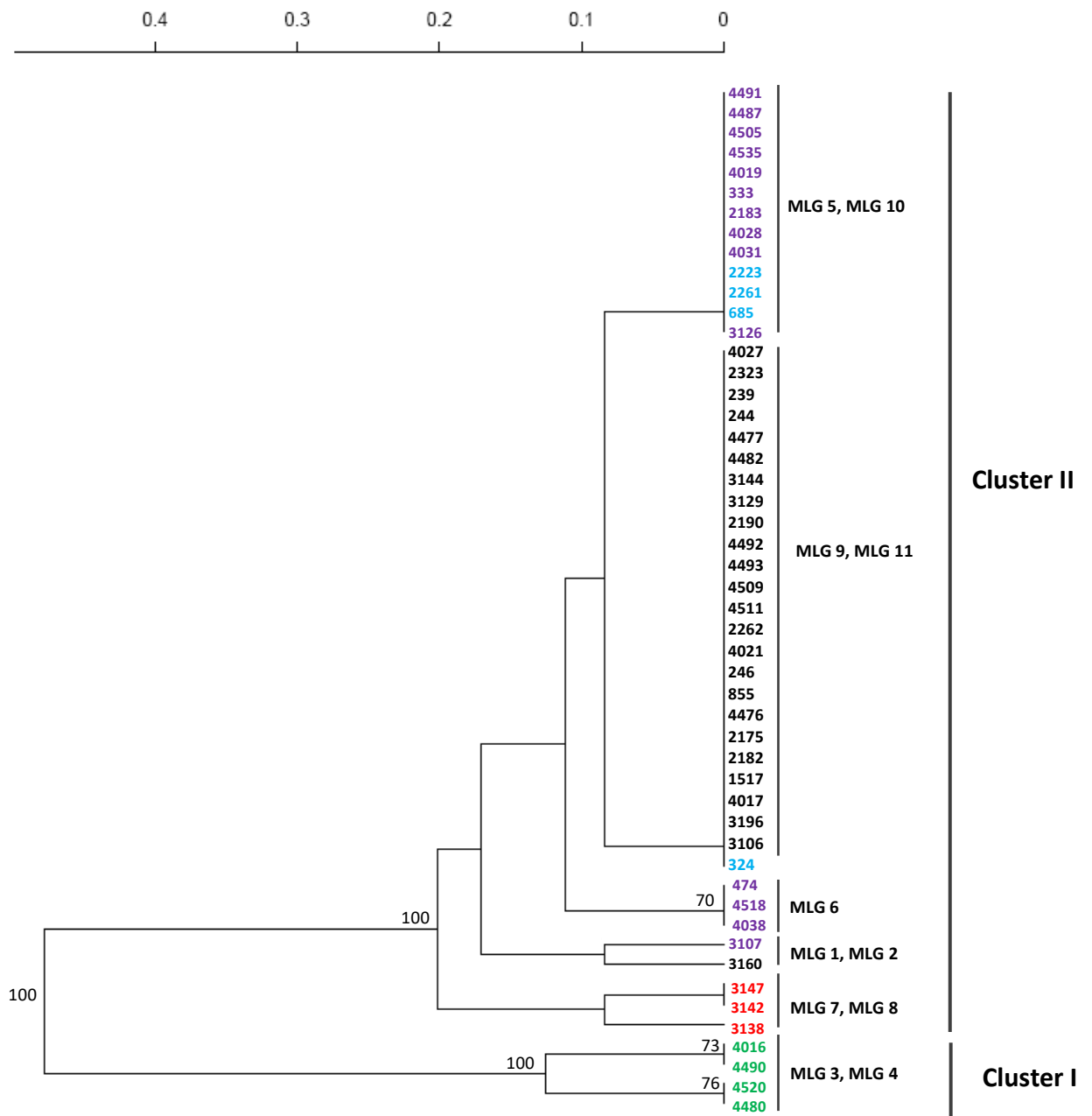
673





674 **Figure 2.** Neighbor-Joining dendrogram of Bruvo's genetic distance (Bruvo et al.  
675 2004) among: **A**, seven observed multilocus genotypes (MLGs) in Brazil and six  
676 MLGs in Mexico, and **B**, seven observed MLGs in northeastern Brazil. The isolates  
677 are colored according to PCA analyses results: **A**, in green, MLGs assigned to cluster  
678 I, in purple, blue, black and red, MLGs assigned to cluster II; **B**, in blue, MLGs  
679 assigned to cluster I, in red, green and purple, isolates assigned to cluster II. Support  
680 values greater than 70% using 1,000 bootstrap samples are shown.  
681

682 **Figure 2A.**



683

684

685 **Figure 2B.**

686

687

688

689

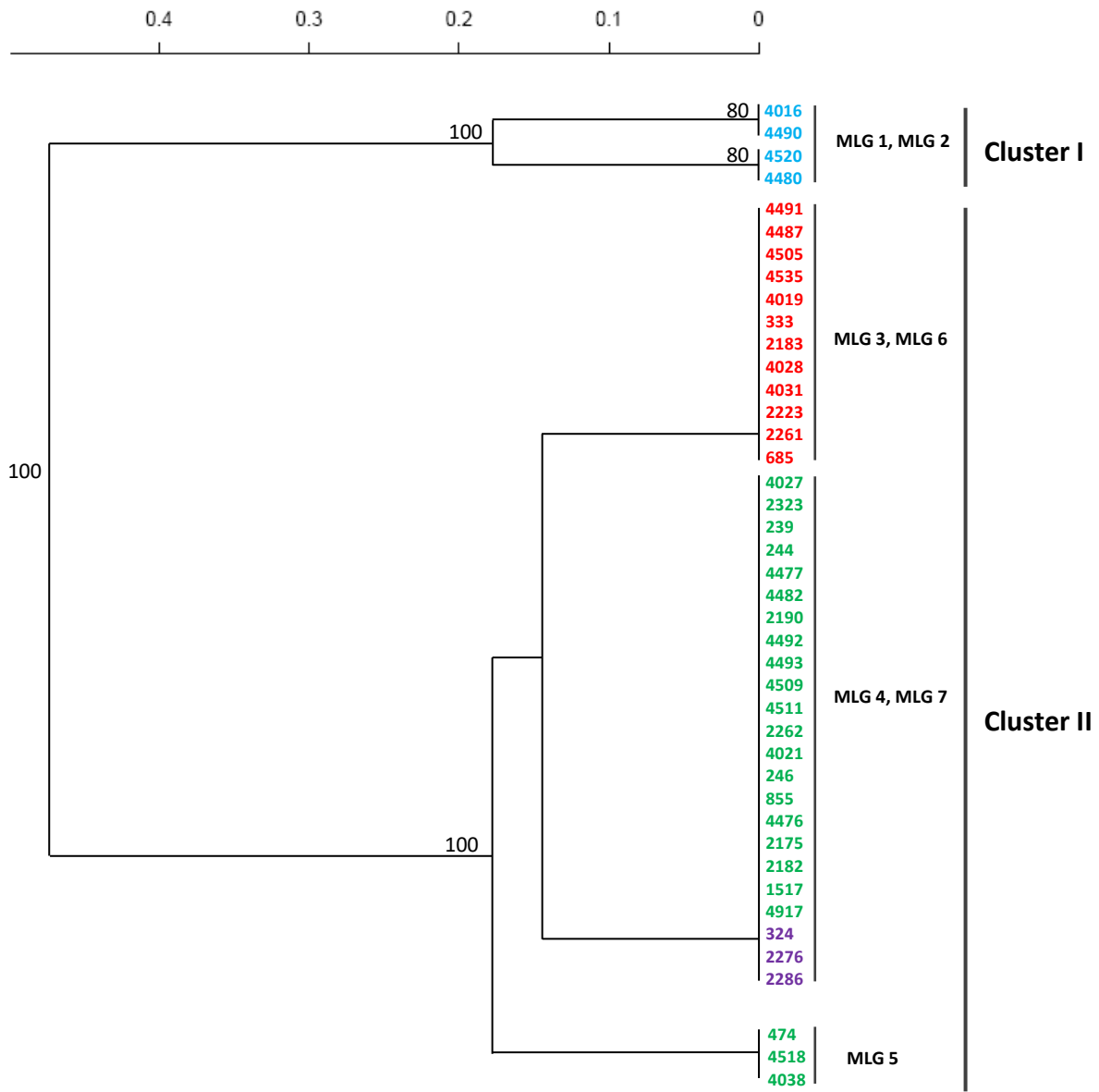
690

691

692

693

694



**Table Supplementary 1.** List of isolates used in this study

<b>Isolate</b>	<b>Host</b>	<b><sup>a</sup>Climate</b>	<b><sup>b</sup>Origin</b>	<b>Country</b>
CMM 0239	grapevine	BSh	Casa Nova/BA	Brazil
CMM 0244	grapevine	BSh	Juazeiro/BA	Brazil
CMM 0246	grapevine	BSh	Petrolina/PE	Brazil
CMM 0249	grapevine	BSh	Petrolina/PE	Brazil
CMM 0278	grapevine	BSh	Petrolina/PE	Brazil
CMM 0296	grapevine	BSh	Juazeiro/BA	Brazil
CMM 0310	grapevine	BSh	Petrolina/PE	Brazil
CMM 0320	grapevine	BSh	Casa Nova/BA	Brazil
CMM 0324	grapevine	BSh	Casa Nova/BA	Brazil
CMM 0330	grapevine	BSh	Casa Nova/BA	Brazil
CMM 0333	grapevine	BSh	Petrolina/PE	Brazil
CMM 0405	grapevine	BSh	Casa Nova/BA	Brazil
CMM 0413	grapevine	BSh	Petrolina/PE	Brazil
CMM 0446	grapevine	BSh	Juazeiro/BA	Brazil
CMM 0456	grapevine	BSh	Petrolina/PE	Brazil
CMM 0474	grapevine	BSh	Petrolina/PE	Brazil
CMM 0685	grapevine	BSh	Petrolina/PE	Brazil
CMM 1517	mango	BSh	Afonso Bezerra/RN	Brazil
CMM 2323	papaya	BSh	Juazeiro/BA	Brazil
CMM 2328	papaya	BSh	Juazeiro/BA	Brazil
CMM 2330	papaya	BSh	Juazeiro/BA	Brazil
CMM 2332	papaya	BSh	Juazeiro/BA	Brazil
CMM 2350	papaya	BSh	Juazeiro/BA	Brazil
CMM 4017	mango	BSh	Ipanguaçu/RN	Brazil
CMM 4024	mango	BSh	Afonso Bezerra/RN	Brazil
CMM 4028	mango	BSh	Ipanguaçu/RN	Brazil
CMM 4031	mango	BSh	Afonso Bezerra/RN	Brazil
CMM 4033	mango	BSh	Ipanguaçu/RN	Brazil
CMM 4035	mango	BSh	Ipanguaçu/RN	Brazil
CMM 4038	mango	BSh	Afonso Bezerra/RN	Brazil
CMM 4127	grapevine	BSh	Petrolina/PE	Brazil
CMM 4016	mango	BSh	Afonso Bezerra/RN	Brazil
CMM 4019	mango	BSh	Petrolina/PE	Brazil
CMM 4021	mango	BSh	Petrolina/PE	Brazil
CMM 4023	mango	BSh	Afonso Bezerra/RN	Brazil
CMM 4027	mango	BSh	Juazeiro/BA	Brazil
CMM 4036	mango	BSh	Afonso Bezerra/RN	Brazil
CMM 4037	mango	BSh	Afonso Bezerra/RN	Brazil
CMM 4039	mango	BSh	Ipanguaçu/RN	Brazil
CMM 4041	mango	BSh	Afonso Bezerra/RN	Brazil
CMM 4042	mango	BSh	Petrolina/PE	Brazil
CMM 4043	mango	BSh	Afonso Bezerra/RN	Brazil

---

CMM 4049	mango	BSh	Ipanguaçu/RN	Brazil
CMM 4053	mango	BSh	Ipanguaçu/RN	Brazil
CMM 2175	papaya	As	Parnamirim/RN	Brazil
CMM 2182	papaya	As	São José do Mipibú/RN	Brazil
CMM 2183	papaya	As	São José do Mipibú/RN	Brazil
CMM 2190	papaya	As	Santa Rita/PB	Brazil
CMM 2191	papaya	As	Santa Rita/PB	Brazil
CMM 2192	papaya	As	Santa Rita/PB	Brazil
CMM 2193	papaya	As	Santa Rita/PB	Brazil
CMM 2198	papaya	As	Santa Rita/PB	Brazil
CMM 2199	papaya	As	Santa Rita/PB	Brazil
CMM 2200	papaya	As	Santa Rita/PB	Brazil
CMM 2202	papaya	As	Santa Rita/PB	Brazil
CMM 2223	papaya	As	Santa Rita/PB	Brazil
CMM 2225	papaya	As	Santa Rita/PB	Brazil
CMM 2226	papaya	As	Santa Rita/PB	Brazil
CMM 2261	papaya	As	Goiania/PE	Brazil
CMM 2262	papaya	As	Goiania/PE	Brazil
CMM 2276	papaya	As	Amaraji/PE	Brazil
CMM 2277	papaya	As	Amaraji/PE	Brazil
CMM 2278	papaya	As	Amaraji/PE	Brazil
CMM 2278	papaya	As	Amaraji/PE	Brazil
CMM 2283	papaya	As	Amaraji/PE	Brazil
CMM 2286	papaya	As	Goiania/PE	Brazil
CMM 2294	papaya	As	Santa Rita/PB	Brazil
CMM 2296	papaya	As	Santa Rita/PB	Brazil
CMM 4476	cashew	As	Canto de Moça/RN	Brazil
CMM 4477	cashew	As	Horizonte/CE	Brazil
CMM 4480	cashew	As	Trairi/CE	Brazil
CMM 4482	cashew	As	Cascavel/CE	Brazil
CMM 4487	cashew	As	Guanaces/Cascavel/CE	Brazil
CMM 4490	cashew	As	Barreira/CE	Brazil
CMM 4491	cashew	As	Camocin de São Félix/PE	Brazil
CMM 4492	cashew	As	Camocin de São Félix/PE	Brazil
CMM 4493	cashew	As	Porto de Galinhas/PE	Brazil
CMM 4494	cashew	As	Porto de Galinhas/PE	Brazil
CMM 4495	cashew	As	Camocin de São Félix/PE	Brazil
CMM 4500	cashew	As	Porto de Galinha/PE	Brazil
CMM 4505	cashew	As	Goiana/PE	Brazil
CMM 4506	cashew	As	São Vicente/PE	Brazil
CMM 4509	cashew	As	São Vicente/PE	Brazil
CMM 4510	cashew	As	Porto de Galinha/PE	Brazil
CMM 4511	cashew	As	Goiana/PE	Brazil
CMM 4512	cashew	As	Porto de Galinha/PE	Brazil
CMM 4513	cashew	As	São Vicente/PE	Brazil
CMM 4518	cashew	As	Russas/CE	Brazil

---

CMM 4520	cashew	As	Pacajus/CE	Brazil
CMM 4522	cashew	As	Cascavel/CE	Brazil
CMM 4524	cashew	As	Horizonte/CE	Brazil
CMM 4526	cashew	As	Horizonte/CE	Brazil
CMM 4530	cashew	As	Goiana/PE	Brazil
CMM 4531	cashew	As	São Vicente/PE	Brazil
CMM 4535	cashew	As	São João/PE	Brazil
CMM 0855	grapevine	As	São Vicente Férrer/PE	Brazil
CMM 0920	grapevine	As	São Vicente Férrer/PE	Brazil
CMM 0922	grapevine	As	São Vicente Férrer/PE	Brazil
CMM 0954	grapevine	As	São Vicente Férrer/PE	Brazil
CMM 0957	grapevine	As	São Vicente Férrer/PE	Brazil
CMM 3138	mango	*	Tonala/Chiapas	Mexico
CMM 3142	mango	*	Tonala/Chiapas	Mexico
CMM 3144	mango	*	Pijijiapan/Chiapas	Mexico
CMM 3148	mango	*	Tonala/Chiapas	Mexico
CMM 3160	mango	*	Ahome/Sinaloa	Mexico
CMM 3196	mango	*	Ahome/Sinaloa	Mexico
CMM 3106	mango	*	Cazones de Herrera, Veracruz	Mexico
CMM 3107	mango	*	Cazones de Herrera, Veracruz	Mexico
CMM 3111	mango	*	Cazones de Herrera, Veracruz	Mexico
CMM 3112	mango	*	Cazones de Herrera, Veracruz	Mexico
CMM 3116	mango	*	Cazones de Herrera, Veracruz	Mexico
CMM 3118	mango	*	Cazones de Herrera, Veracruz	Mexico
CMM 3126	mango	*	Cutzamala de Pinzón, Guerrero	Mexico
CMM 3129	mango	*	Cutzamala de Pinzón, Guerrero	Mexico
CMM 3130	mango	*	Cutzamala de Pinzón, Guerrero	Mexico
CMM 3146	mango	*	Metapa de Dominguez, Chiapas	Mexico
CMM 3147	mango	*	Metapa de Dominguez, Chiapas	Mexico

<sup>a</sup>Climate types within northeastern Brazil: As, Tropical dry summer; BSh, Semiarid; \* not applicable. <sup>b</sup>Estados brasileiros: BA = Bahia, CE = Ceará, PE = Pernambuco.

## **Conclusões Gerais**

---

---

## CONCLUSÕES GERAIS

1. *Lasiodiplodia crassispora*, *L. euphorbicola*, *L. hormozganensis*, *L. iraniensis*, *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae*, *L. xbrasiliense* e *L. xlaeliocattleyae* estão associados à morte descendente da videira no Nordeste do Brasil.
2. *Lasiodiplodia theobromae* e *L. pseudotheobromae* são as espécies mais frequentemente associadas a sintomas de morte descendente da videira no Nordeste do Brasil.
3. Todas as espécies e híbridos relatados neste estudo têm potencial para causar a morte descendente em videiras.
4. As espécies *L. hormozganensis*, *L. iraniensis* e *L. euphorbicola* são as mais agressivas às mudas de videira (cv. Isabel) no Nordeste do Brasil.
5. Os isolados de *L. theobromae* do Nordeste do Brasil e do México apresentam baixa diversidade genética e estão divididos em dois grupos genéticos, sem estrutura baseada na região geográfica, hospedeiro de origem ou tipo de clima.
6. As populações *L. theobromae* estudadas são em sua maioria clonais, mas estudos adicionais são necessários para entender melhor o modo de reprodução no Brasil e globalmente.