



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



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Tese de Doutorado

**Caracterização de espécies fúngicas associadas à
mancha marrom em *Nopalea cochenillifera* e fatores
relacionados à agressividade de espécies de
Botryosphaeriaceae causadoras da doença**

Erica Cinthia Conforto

**Recife – PE
2017**

ERICA CINTHIA CONFORTO

**CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES FÚNGICAS
ASSOCIADAS À MANCHA MARROM EM *NOPALEA
COCHENILLIFERA* E FATORES RELACIONADOS À
AGRESSIVIDADE DE ESPÉCIES DE
BOTRYOSPHAERIAEAE CAUSADORAS DA DOENÇA**

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

**RECIFE – PE
FEVEREIRO – 2017**

**CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES FÚNGICAS
ASSOCIADAS À MANCHA MARROM EM NOPALEA
COCHENILLIFERA E FATORES RELACIONADOS À
AGRESSIVIDADE DE ESPÉCIES DE
BOTRYOSPHAERiaceae CAUSADORAS DA DOENÇA**

ERICA CINTHIA CONFORTO

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Prof. Dr. Sami Jorge Michereff (UFRPE) – Orientador

Prof. Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara (UFRPE) – Co-orientador

**RECIFE – PE
FEVEREIRO – 2017**

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

C748c Conforto, Erica Cinthia
Caracterização de espécies fúngicas associadas à mancha marrom em *Nopalea cochenillifera* e fatores relacionados à agressividade de espécies de Botryosphaeriaceae causadoras da doença / Erica Cinthia Conforto. – 2017.
126 f. : il.

Orientador: [Sami Jorge Michereff](#).
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, BR-PE, 2017.
Inclui referências.

1. *Nopalea cochenillifera* 2. Mancha-marrom do cladódio
3. Filogenia 4. Etiologia 5. Agressividade 6. Botryosphaeriaceae
7. Epidemiologia comparativa I. Michereff, [Sami Jorge](#), orient.
II. Título

CDD 632

**CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES FÚNGICAS
ASSOCIADAS À MANCHA MARROM EM *NOPALEA
COCHENILLIFERA* E FATORES RELACIONADOS À
AGRESSIVIDADE DE ESPÉCIES DE
BOTRYOSPHAERiaceae CAUSADORAS DA DOENÇA**

ERICA CINTHIA CONFORTO

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 21/02/2017.

ORIENTADOR:

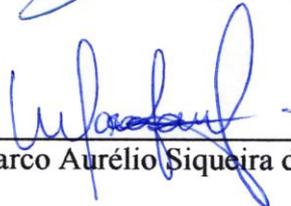


Prof. Dr. Sami Jorge Michereff (UFRPE)

EXAMINADORES:



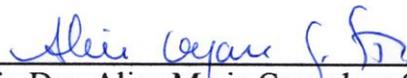
Prof. Dr. Delson Laranjeira (UFRPE)



Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama (UFRPE)



Prof. Dr. Alexandre Reis Machado (UFPE)



Profa. Dra. Alice Maria Gonçalves Santos (UFPI)

**RECIFE – PE
FEVEREIRO – 2017**

*Aos meus maiores tesouros Nelson e Antonia, por estarem em minha vida,
Aos meus pais, Alberto e María Angela pelo exemplo de amor,
dedicação, honestidade e lealdade.
Eternamente agradecida.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária (INTA) pela concessão da bolsa de estudo e a confiança depositada em mim.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da UFRPE pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sami Michereff pela orientação, dedicação e valiosa contribuição na minha formação.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Marcos Câmara pelos conhecimentos aportados.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia por sua generosidade nos conhecimentos transmitidos.

Aos produtores de palma forrageira.

Ao Eng. Guillermo March pelo incentivo para fazer o doutorado no Brasil.

Aos colegas do Laboratório de Epidemiologia de Doenças de Plantas, Tamiris, Fabio, José, João, Soraya, Susan, Ellen, Catarina, Moara e Marcondes pela ajuda e momentos compartilhados.

À Gabriela Calderón e Mayumi Innokuti pela amizade.

À Analía e Fernanda por estarem sempre incondicionalmente apesar da distância.

Às minhas amigas Nanzu, Fanny, Vani e Evi pelas conversas, conselhos e ajuda sempre que precisei.

Aos meus irmãos e sobrinhos porque apesar da distancia sempre estavam por perto.

Aos meus pais pela liberdade em cada uma de minhas escolhas.

A Nelson e Antonia por serem o exemplo mais claro de amor e paciência.

A Darcy Martins e Romildo Angeiras pela predisposição e presteza.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	vi
RESUMO GERAL	viii
GENERAL ABSTRACT	ix
CAPÍTULO I – Introdução Geral	11
Referências Bibliográficas	25
CAPÍTULO II – Characterization of fungal species associated with cladode brown spot in <i>Nopalea cochenillifera</i> in Brazil	33
Abstract	35
Introduction	36
Materials and methods	38
Results	44
Discussion	46
Acknowledgements	50
References	50
CAPÍTULO III – Efeito de ferimento, temperatura e umidade na agressividade de espécies de Botryosphaeriaceae em <i>Nopalea cochenillifera</i>	86
Resumo	88
Abstract	89
Introdução	90
Materiais e métodos	92
Resultados	97
Discussão	103
Agradecimentos	108
Referências	109
CONCLUSÕES GERAIS	125

RESUMO GERAL

A mancha-marrom é uma importante doença em cladódios de *Nopalea cochenillifera* no Nordeste do Brasil, mas sua etiologia tem sido controversa. Os objetivos desse trabalho foram: a) caracterizar as espécies fúngicas associadas à mancha-marrom com base na análise de sequências de DNA e morfologia; b) avaliar a patogenicidade e a agressividade dos isolados; c) comparar o efeito de ferimento, temperatura e umidade na agressividade de quatro espécies de Botryosphaeriaceae associadas com a doença. Foram caracterizados 50 isolados fúngicos pela análise das sequências da região do espaço interno transcrito do rDNA (ITS) e dos genes fator de alongação 1- α (EF1- α), β -tubulin (TUB2), segunda maior unidade da RNA polimerase (RPB2), glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPDH) e mating type apn2mat/IGS (ApMat). Foram identificados sete gêneros fúngicos e 20 espécies: *Alternaria longipes*, *A. tenuissima*, *Alternaria* sp. (ex *Nimbya gomphrenae*), *Colletotrichum fructicola*, *C. siamense*, *Fusarium lunatum*, *F. incarnatum*, *F. verticillioides*, *Lasiodiplodia euphorbicola*, *L. iraniensis*, *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae*, *Lasiodiplodia* sp., *Neofusicoccum batangaru*, *Neopestalotiopsis australis*, *N. protearum*, *Neopestalotiopsis* sp., *Nigrospora sphaerica*, *N. oryzae* e *Nigrospora* sp. Todas as espécies são reportadas pela primeira vez no mundo no gênero *Nopalea*. Todos os isolados foram patogênicos a *N. cochenillifera*, com *L. iraniensis* e *F. lunatum* sendo as espécies mais agressivas e *F. verticillioides* a menos agressiva. Nenhuma espécie de Botryosphaeriaceae avaliada (*L. iraniensis*, *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae* e *N. batangarum*) induziu sintomas nos cladódios sem ferimento, mas em cladódios feridos todas as espécies induziram sintomas. Todas as espécies expressaram maior agressividade quando inoculadas imediatamente após a realização do ferimento e *N. batangarum* foi a mais sensível à idade do ferimento. Houve diferença entre as espécies em relação à temperatura ótima para expressão da máxima agressividade, que variou entre 22,2 °C (*L. pseudotheobromae*) a 30,4 °C (*L. theobromae*). Todas as espécies induziram sintomas na ausência de umidade relativa elevada, mas o período ótimo de duração da umidade variou entre 12,7 h (*N. batangarum*) e 16,0 h (*L. theobromae*). Na maioria dos experimentos, *L. iraniensis* foi a espécie mais agressiva.

Palavras-chave: *Nopalea cochenillifera*, mancha-marrom do cladódio, filogenia, etiologia, agressividade, Botryosphaeriaceae, epidemiologia comparativa.

GENERAL ABSTRACT

Cladode brown spot is an important disease of *Nopalea cochenillifera* in the Northeast of Brazil, but its etiology is controversial. The objectives of this work were: a) to characterize fungal species associated with cladode brown spot based in DNA sequences and morphology analysis; b) to evaluate the pathogenicity and aggressiveness of the isolates; c) to compare the effect of wound, temperature and humidity in the aggressiveness of four species of Botryosphaeriaceae associated to disease. Fifty fungal isolates were characterized by sequence analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacers of rDNA (ITS) region and genes translation elongation factor 1- α (EF1- α), β -tubulin (TUB2), second largest subunit of RNA polymerase (RPB2), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) and the apn2mat/IGS (ApMAT). Seven fungal genus and twenty species were identified: *Alternaria longipes*, *A. tenuissima*, *Alternaria* sp. (ex *Nimbya gomphrenae*), *Colletotrichum fructicola*, *C. siamense*, *Fusarium lunatum*, *F. incarnatum*, *F. verticillioides*, *Lasiodiplodia euphorbicola*, *L. iraniensis*, *L. pseutheobromae*, *L. theobromae*, *Lasiodiplodia agrestis* sp. nov., *Neofusicoccum batangaru*, *Neopestalotiopsis australis*, *N. protearum*, *Neopestalotiopsis* sp., *Nigrospora sphaerica*, *N. oryzae* and *Nigrospora* sp. All species are reported in the genus *Nopalea* for the first time worldwide. All isolates were pathogenic to *N. cochenillifera*, with *L. iraniensis* and *F. lunatum* being the most aggressive species e *F. verticillioides* the least aggressive. No Botryosphaeriaceae species evaluated (*L. iraniensis*, *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae* e *N. batangarum*) induced symptoms in the cladodes without wound, but in wounded cladodes all species induced symptoms. All species expressed the highest aggressiveness when inoculated immediately after the wound and *N. batangarum* was the species most sensitive to the age of the wound. There was difference between the species in relation to the optimum temperature for the expression of maximum aggressiveness, which varied between 22.2 °C (*L. pseudotheobromae*) and 30.4 °C (*L. theobromae*). All species induced symptoms in the absence of high relative humidity, but the optimal duration of moisture ranged from 12.7 h (*N. batangarum*) to 16.0 h (*L. theobromae*). In most experiments, *L. iraniensis* was the most aggressive species.

Keywords: *Nopalea cochenillifera*, cladode brown spot, phylogeny, etiology, aggressiveness, Botryosphaeriaceae, comparative epidemiology.

Capítulo I

Introdução Geral

CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES FÚNGICAS ASSOCIADAS À MANCHA MARROM EM *NOPALEA COCHENILLIFERA* E FATORES RELACIONADOS À AGRESSIVIDADE DE ESPÉCIES DE BOTRYOSPHAERIAEAE CAUSADORAS DA DOENÇA

INTRODUÇÃO GERAL

1. Origem e importância da palma forrageira

A palma forrageira (*Opuntia* Mill. e *Nopalea* Salm-Dyck) é uma espécie nativa do México e teve influência na economia agrícola no período pré-hispânico. Atualmente possui ampla distribuição geográfica, cultivada em vários continentes (África, América, Ásia e Europa) com diversas utilidades na indústria cosmética, alimentícia e farmacêutica, além de seu potencial na recuperação de solos, ornamentação e produção de forragem (REYES-AGUERO et al., 2005). No Brasil, a palma foi introduzida, provavelmente, no final do século XVIII, procedente das Ilhas Canárias, destinada à criação da cochonilha para produção de corantes, e somente no início do século XX começou a ser utilizado como planta forrageira para a alimentação animal. Para Nordeste brasileiro, foi trazida pelos portugueses, aproximadamente em 1818, quando novos jardins botânicos foram instalados no estado de Pernambuco (SIMÕES; SANTOS; DIAS, 2005).

O Nordeste brasileiro ocupa 1.600.000 km² do território nacional, com 62% da sua área apresentando pluviosidade anual abaixo de 800 mm, característica de região semiárida. Nesta região, a vegetação predominante é denominada caatinga, representada por 73% de plantas xerófilas, entre essas, muitas cactáceas adaptadas às condições adversas de clima e solo (LOPES; SANTOS; VASCONCELOS, 2012). Uma das atividades desenvolvidas na região é a pecuária de subsistência, com destaque para gado bovino, ovino e caprino, criados extensivamente, com alimentação baseada na vegetação nativa (OLIVEIRA et al., 2010). Neste contexto, a palma forrageira, dotada de características morfológicas e mecanismos fisiológicos especiais típicos das plantas CAM, torna-se uma das plantas mais adaptadas às condições ecológicas das zonas áridas e semiáridas do mundo, transformando-se numa forrageira estratégica, minimizando a escassez de forragens na estação seca (BARBERA,

2001; REBMAN; PINKAVA, 2001). A maior área implantada de palma forrageira encontra-se no Nordeste semiárido, com aproximadamente 550.000 ha, concentrados nos estados de Pernambuco, Alagoas, Bahia, Sergipe, Rio Grande do Norte, Ceará e Paraíba (LOPES; SANTOS; VASCONCELOS, 2012).

A produção de leite no Brasil cresceu de 32,0 bilhões de litros em 2011 para 35,1 bilhões de litros em 2016. A região Nordeste foi responsável por 5,2% do aumento da produção nacional de leite em 2015, destacando-se Pernambuco que aumentou a sua produção em 6,1% (CONAB, 2017). Esse estado é o segundo maior produtor de leite na região Nordeste, com produção anual de 942 milhões de litros, superado apenas pela Bahia, com produção anual de 1.238 milhões de litros (IBGE, 2017).

Nos últimos anos o estado de Pernambuco vem se destacando como líder em estudos referentes a aumento de produção de palma forrageira, como resposta à crescente demanda de produtos de origem animal, como também devido ao interesse econômico em outros subprodutos derivados da cultura (ROCHA, 2012).

2. Classificação botânica da palma forrageira e variedades cultivadas na região semiárida

A palma forrageira pertence à divisão Embryophyta, subdivisão Angiospermea, classe Dicotyledoneae, subclasse Archiclamideae, ordem Opuntiales e família das Cactáceas. As cactáceas são plantas suculentas, ramificadas com um conjunto de estratégias adaptativas, evolutivas e ecológicas que lhes conferem uma grande capacidade de desenvolvimento nos diferentes habitat. Os gêneros *Opuntia* e *Nopalea* são os mais importantes e utilizados como espécies forrageiras em regiões áridas e semiáridas (BARBERA, 2001; REBMAN; PINKAVA, 2001). Duas espécies de palma forrageira se destacam no Nordeste brasileiro: *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill., com as variedades Gigante e Redonda, e *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm. Dyck., com a variedade Miúda ou Doce (FERREIRA et al., 2012; LOPES; SANTOS; VASCONCELOS, 2012; OLIVEIRA et al., 2010). Nos últimos anos, têm aumentado as áreas cultivadas com *Opuntia tuna* (L.) Mill., cuja variedade Orelha-de-elefante é considerada resistente à cochonilha-do-carmim (*Dactylopius opuntiae* Cockerell), principal inseto-praga da cultura (LIMA et al., 2013).

A cultivar Gigante apresenta porte bem desenvolvido e caule menos ramificado que a cultivar Miúda, o que transmite um aspecto mais ereto e crescimento vertical pouco frondoso.

Cladódio de forma oval-elíptica ou sub-ovalada e coloração verde-fosco. As flores são hermafroditas, de coloração amarela brilhante e cuja corola fica aberta na antese. O fruto é uma baga ovóide, grande, de cor amarela, passando à roxa quando madura. Essa palma é considerada a mais produtiva e mais resistente às regiões secas, no entanto, é menos palatável e de menor valor nutricional. A cultivar Redonda é originada da Gigante, possui porte médio e caule muito ramificado lateralmente, prejudicando assim o crescimento vertical. Seu cladódio possui forma arredondada e ovóide. Apresenta grandes rendimentos de material mais tenro e palatável que a cultivar Gigante (LOPES; SANTOS; VASCONCELOS, 2012). As duas cultivares são altamente suscetíveis à cochonilha do carmim (LOPES et al., 2012).

A cultivar Míuda apresenta plantas de porte pequeno e caule ramificado. O cladódio possui forma acentuadamente ovalada e coloração verde intenso brilhante. As flores são vermelhas e sua corola permanece meio fechada durante o ciclo. O fruto é uma baga de coloração roxa. Comparada às variedades anteriores, a Míuda é a mais nutritiva e palatável, com elevada resistência à cochonilha-do-carmim, porém apresenta menor resistência à seca (LOPES et al., 2012; LOPES; SANTOS; VASCONCELOS, 2012). Nos últimos anos, tem sido registrada uma grande expansão das áreas cultivadas com palma Míuda no Nordeste brasileiro em função da elevada resistência à cochonilha-do-carmim e às excelentes características de palatabilidade e digestibilidade para ruminantes (LOPES et al., 2012).

3. Doenças da palma forrageira

Apesar da rusticidade e elevada adaptabilidade a diferentes ambientes, bem como ser nativa de regiões muito quentes e clima seco, a palma forrageira é afetada por vários patógenos, dentre os quais se encontram vários gêneros de fungos (*Aecidium*, *Alternaria*, *Armillaria*, *Aspergillus*, *Botryosphaeria*, *Cercospora*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Cytospora*, *Dothiorella*, *Fusarium*, *Gloesporium*, *Gnomonia*, *Lasiodiplodia*, *Macrophomina*, *Mycosphaerella*, *Nigrospora*, *Pestalotia*, *Phoma*, *Phyllosticta*, *Pleospora*, *Pseudocercospora*, *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Scytalidium* e *Sphaceloma*), oomicetos (*Phytophthora*), bactérias (*Rhizobium*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*), vírus (*Zygocactus virus X*) e fitoplasmas (16SrXIII-Mexican periwinkle virescence) (AMMAR; SHLTOUT; KAMHAWY, 2004; BARBOSA et al., 2012; FLORES-FLORES et al., 2013; MÉNDEZ-GALLEGOS; TALAVERA-MAGAÑA; GARCÍA-HERRERA, 2008;

QUEZADA-SALINAS et al., 2006; SANTOS et al., 2006; SOUZA et al., 2010; SUASTE-DZUL et al., 2012).

As doenças de origem fúngica são as mais importantes na cultura da palma forrageira, podendo afetar cladódios, sistema radicular e frutos nas fases de pré e pós-colheita. A maior severidade das doenças fúngicas tem sido correlacionada com estresse nutricional, suscetibilidade de variedades e clones, e adensamento da cultura. Neste grupo de doenças destacam-se as podridões de raízes e de cladódios da base, e as manchas dos cladódios, que reduzem a produtividade e limitam o cultivo de espécie, variedade ou clone de maior interesse de cultivo ou valor comercial (BARBOSA et al., 2012; GRANATA, 2001).

Dentre as podridões de raízes e de cladódios da base que ocorrem na palma forrageira no Nordeste brasileiro destacam-se a podridão negra (*Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl.), a podridão seca escamosa, a gomose (*Dothiorella ribis* (Grossenb. & Duggar) Sacc.), a podridão de fusário *Fusarium solani* (Mart.) Sacc.), a podridão de macrofomina (*Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid.), a podridão de esclerócio (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) e a rizoctoniose (*Rhizoctonia solani* Kühn). Entre as manchas dos cladódios, as mais importantes no Nordeste brasileiro são a mancha escamosa (*Scytalidium lignicola* Pes.) e a mancha marrom (BARBOSA et al., 2012; SOUZA et al., 2010).

A mancha marrom é de ocorrência comum na palma forrageira em vários países. A etiologia dessa doença tem sido controversa, sendo atribuída a diferentes espécies fúngicas, incluindo *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl, *Alternaria tenuissima* (Nees) Wiltshire, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz. & Sacc., *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn, *Fusarium lunatum* (Ellis & Everhart) Arx, *L. theobromae*, *Phialophora cyclaminis* e *Pseudocercospora opuntiae* Ayala-Escobar, U. Braun & Crous, (AMMAR; SHLTOUT; KAMHAWY, 2004; BARBOSA et al., 2012; FLORES-FLORES et al., 2013; SOUZA et al., 2010).

A mancha marrom é a doença mais importante *N. cochenillifera* no Nordeste brasileiro, tendo sido assinalada em 2001 com elevada incidência (70%) e severidade em cultivo no município de São Bento do Una - PE. Nos últimos anos, essa doença ocorre em vários municípios de Pernambuco (BARBOSA et al., 2012), bem como nos estados de Alagoas e da Paraíba (SOUZA et al., 2010), sendo atribuída exclusivamente a *A. alternata* (= *A. tenuis* Nees) (BARBOSA et al., 2012; LIMA et al., 2011).

Os sintomas da doença são manchas inicialmente de coloração marrom claro que logo podem evoluir a marrom escuro ou preta, de formas variadas, circulares ou elípticas, medindo 1,0-3,0 cm de diâmetro com presença ou não de esporulação na superfície da lesão

dependendo do agente causal. As lesões podem se estender de uma face à outra do cladódio, exibindo perfurações devido à queda do tecido infectado. As manchas podem coalescer, formando grandes áreas necrosadas e causando a queda dos cladódios (BARBOSA et al., 2012; GRANATA, 2001; SANTOS et al., 2006; SOUZA et al., 2010). A doença apresenta sintomas similares, independentemente do patógeno, porém pode ter leves variações dependendo da espécie do fungo, das variedades da cultura e das condições climáticas (FLORES-FLORES et al., 2013).

As medidas de controle se baseiam na remoção e destruição dos cladódios afetados (BARBOSA et al., 2012; SOUZA et al., 2010). Não existem fungicidas registrados no Brasil para o controle das doenças da palma forrageira (MAPA, 2017). Como as opções de controle são muito reduzidas, há necessidade do desenvolvimento de novas estratégias de manejo da doença.

4. Gêneros fúngicos associados à mancha marrom

4.1. *Alternaria*

O gênero *Alternaria* foi originalmente descrito por Ness, em 1816, baseado em *Alternaria tenuis* Nees como única espécie. Em 1912, von Keissler sinonimizou *A. tenuis* e *Torula alternata* Fr. como *A. alternata* Fr. Posteriormente, estudos das características morfológicas do gênero permitiram identificar 275 espécies de *Alternaria* (SIMMONS, 2007). Atualmente, com a combinação de ferramentas moleculares e morfológicas, o complexo *Alternaria* está dividido em 26 seções incluindo nove gêneros, *Alternaria* Ness, *Chalastospora* E.G Simmons, *Crivellia* Shoemaker & Inderbitzin, *Embellisia* E.G Simmons, *Nimbya* E.G. Simmons, *Stemphylium* Wallr, *Ulocladium* Preuss, *Undifilum* B.M. Pryor, Creamer, Shoemaker, McLain-Romero & Hambl. e *Sinomyces* Yong Wang bis & X.G. Zhang (GRUM-GRZHIMAYLO et al., 2015; WOUDEMBERG et al., 2013, 2014). *Alternaria* produz esporos escuros, multicelulares, com um bico na célula apical, septos transversais ou longitudinais em cadeias simples ou ramificadas. É um gênero complexo, de ampla distribuição geográfica, que inclui espécies saprófitas, endófitas e patogênicas de plantas e humanos (THOMMA, 2003), associado a uma grande quantidade de substratos (sementes, plantas, solos, animais e outros). O gênero inclui várias espécies patogênicas em cultivos de

importância econômica, causando principalmente manchas foliares em mais de 100 espécies de plantas e doenças pós-colheita (ROTEM, 1994).

As espécies do gênero *Alternaria* têm sido descritas, principalmente, baseado na morfologia e/ou especificidade do hospedeiro (WOUDENBERG et al., 2014). Na atualidade, conhecida a complexidade taxonomica do gênero, só a identificação morfológica não é suficiente. Múltiplos métodos moleculares têm sido testados, como RAPD (Amplificação aleatória de DNA polimórfico) (ROBERTS et al., 2000), AFLP (Polimorfismos de comprimento de fragmento amplificado) (SOMMA et al., 2011), SSH (Hibridização subtrativa seletiva) (ROBERTS et al., 2012), e a caracterização de sequências através da amplificação de regiões genômicas (STEWART et al., 2013). Para isto, uma grande variedade de marcadores moleculares são usados, sendo os mais utilizados a região ITS (Espaço interno transcrito) e os genes SSU (Subunidade ribossomal menor 18S nrDNA), LSU (Subunidade ribossomal maior 28S nrDNA), GPDH (Glicerol-3-fosfato desidrogenase), RPB2 (RNA polimerase 2), EF1- α (Fator de alongação 1- α), Alt a 1 (Alergeno maior), endoPG (Endopoligalacturonase) e OPA10-2 (Operon A). Para criar uma taxonomia consistente do gênero *Alternaria*, os estudos morfológicos devem ser acompanhados de estudos moleculares que nem sempre são conclusivos, devido à pouca variação molecular entre espécies (WOUDENBERG et al., 2013, 2014).

4.2. *Curvularia*

O gênero *Curvularia* foi descrito por Boedijn, em 1933, baseado na espécie-tipo *Curvularia lunata*, sendo posteriormente descritas 37 espécies (ELLIS, 1971; SIVANESAN, 1987). Atualmente no Index Fungorum são encontradas 122 espécies epítificadas (HYDE et al., 2014). *Curvularia* se caracteriza por produzir micélio escuro, conídios transversalmente septados, curvados com a célula média assimétrica, mas também têm sido encontrados conídios retos (SIVANESAN, 1987). Suas espécies são reconhecidas como saprófitas, patógenos de plantas, animais e humanos. Em plantas, *Curvularia* é associado principalmente à família das *Poaceae*, causando manchas foliares em cereais, cultivos hortícolas e forrageiras (DE LUNA et al., 2002).

Estudos filogenéticos são fundamentais para a identificação de espécies de *Curvularia*, tendo em vista que em muitos casos a descrição morfológica não tem correspondência com a filogenética (MANAMGODA et al., 2013). *Curvularia* e *Bipolaris* Shoemaker são difíceis de diferenciar pela morfologia. Pela análise da região ITS e do gene GPDH foi possível detectar

que nove espécies do gênero *Bipolaris* agruparam com *Curvularia* (BERBEE et al., 1999). Os principais marcadores utilizados para estes gêneros são ITS, GPDH, EF1- α e LSU, mas estudos recentes mostraram que a combinação dos genes GPDH e RPB2 parece ter resultados promissores para o gênero *Curvularia* (MADRID et al., 2014).

4.3. *Colletotrichum*

O gênero *Colletotrichum* foi relatado pela primeira vez por Tode, em 1790, dentro do gênero *Vermicularia*. Em 1837, Corda caracterizou o gênero como fungos que produzem conídios hialinos, fusiformes ou levemente curvados e acérvulos com setas, e reclassificou como *Colletotrichum*. Tradicionalmente as espécies de *Colletotrichum* têm sido identificadas e delimitadas por seus hospedeiros e por caracteres morfológicos como tamanho e forma de esporos, appresorios, presença de setas, e características culturais das colônias (CANNON et al., 2012; SUTTON, 1992). *Colletotrichum* engloba espécies saprófitas, epífitas, endófitas, fitopatogênicas e patogênicas ao homem, de grande importância mundial causando doenças numa ampla gama de culturas de importância econômica e plantas ornamentais (HYDE et al., 2009; LIU et al., 2007; PRIHASTUTI et al., 2009).

As espécies de *Colletotrichum* em geral causam antracnoses em folhas, ramos e frutos, que com o avanço da doença resultam em lesões necróticas deprimidas podendo atingir qualquer órgão da planta (CAI et al., 2009; PENG et al., 2012). A identificação baseada em caracteres morfológicos tem sido um problema para o gênero, pois poucos caracteres são confiáveis e muitos deles são plásticos, dependendo das condições experimentais (CAI et al., 2009). Mudanças significantes para o entendimento do gênero têm acontecido com a incorporação de abordagens polifásico que inclui o uso de dados morfológicos e análises filogenéticas (CAI et al., 2009; CANNON et al., 2012; DOYLE et al., 2013). As primeiras aplicações de estudos de DNA para distinguir espécies de *Colletotrichum* foram publicadas em 1992 (MILLS; HODSON; BROWN, 1992; SREENIVASAPRASAD et al., 1992), que detectaram variação nas sequências de ITS entre seis espécies de *Colletotrichum*. O número de estudos utilizando métodos moleculares para compreender as relações entre espécies de *Colletotrichum* aumentou rapidamente desde então, mas a maioria incluía pequenos grupos de espécies e geralmente associados a uma cultura em particular. A primeira análise filogenética multilocus foi publicada em 2002 (TALHINHAS et al., 2002), que utilizou ITS, TUB2 (β -tubulina) e HIS4 (Histona 4) para estudar espécies de *C. acutatum* Simonds. Em 2012, um estudo de filogenia de *Colletotrichum* (CANNON, 2012) analisou as sequências de seis genes

e revelou pelo menos nove clados (acutatum, graminicola, spaethianum, destructivum, dematium, gloeosporioides, boninense, truncatum e boninense), sugerindo o uso de uma combinação de marcadores para obter um sistema de identificação robusto para *Colletotrichum*. Atualmente, o estudo do gênero inclui o uso das seguintes regiões gênicas: ACT (Actina), CHS1 (Quitina sintase), TUB2, CAL (Calmadulina), GADPH, HIS3 (Histona 3), GS (Glutamina sintetase), DNA lyase e ApMat (Mating type) (CANNON et al., 2012; DAMM et al., 2012a, b; DOYLE et al., 2013; PENG et al., 2012; WEIR et al., 2012). Alguns autores indicam que a utilização somente de GADPH resolve a maioria das espécies do gênero com bastante precisão. Alguns desses marcadores são utilizados somente para resolver clados específicos, como por exemplo ApMat, para resolver as espécies dentro do complexo gloeosporioides. A combinação desses marcadores pode resolver a posição da maioria das espécies de *Colletotrichum* (HYDE et al., 2014).

4.4. *Fusarium*

O gênero *Fusarium* foi descrito por Link, em 1809, com base na morfologia característica dos conídios. O maior avanço na taxonomia do gênero foi propiciado por Wollenweber e Reinking, em 1935, que reconheceram 16 seções, 55 espécies, 65 variedades e 22 formas especiais de *Fusarium*. A diversidade de espécies de *Fusarium* e suas relações evolutivas incrementaram drasticamente nos últimos 15 anos. Atualmente, estima-se que o gênero compreenda pelo menos 300 espécies filogenéticas, agrupadas em 14 complexos de espécies, embora menos da metade tenham sido formalmente descritas (TAKAYUKI; O'DONNELL; GEISER, 2014).

Como características morfológicas do gênero se destacam o micélio denso e cotonoso, com a produção de abundantes conídios de forma fusiformes, que podem ser microconídios e/ou macroconídios produzidos em esporodóquios. As estruturas de resistência são clamidósporos individuais ou em cadeias de disposição apical ou intercalar (LESLIE; SUMMERELL, 2006). O gênero tem distribuição cosmopolita e inclui espécies saprófitas em solo e matéria orgânica, endófitos de plantas, patógenos de plantas e humanos, como também produtores de micotoxinas (HYDE et al., 2014) As espécies fitopatogênicas mais importantes estão agrupadas em quatro complexos de espécies: complexo *F. fujikuroi*, com espécies que produzem doenças importantes em cereais, como milho e arroz; complexo *F. graminearum*, com agentes causais da mancha do trigo e cevada, que produzem contaminação dos grãos com micotoxinas; complexo *F. oxysporum*, com espécies que causam doenças vasculares em mais

de 100 de cultivos de importância agrônômica; complexo *F. solani*, com espécies que causam podridões no colo e raízes de plantas (TAKAYUKI; O'DONNELL; GEISER, 2014).

É difícil quantificar o número exato de espécies de *Fusarium* atualmente reconhecidas. Mais de 1500 nomes são listados no MycoBank. Os últimos estudos do gênero baseados em filogenia, têm se concentrado em resolver as relações evolutivas no nível de espécies que são de importância para a agricultura e saúde humana (O'DONNELL et al., 2010). Estes estudos têm sido substanciais para entender as relações filogenéticas dentro do gênero, permitindo reconhecer a vários importantes patógenos de plantas como por exemplo *F. oxysporum* e *F. solani*, como complexo de espécies (LAURENCE et al., 2014; O'DONNELL et al., 2008). A filogenia do gênero *Fusarium* foi inferida recentemente com a utilização dos genes RPB1 (RNA polimerase 1) e RPB2, uma vez que estes genes são muito informativos (O'DONNELL et al., 2013). Com a finalidade de identificação de rotina a utilização de TEF1 apresenta um excelente desempenho (HYDE et al., 2014). Um aspecto importante do gênero é a disponibilidade de uma base de dados exclusiva, com sequências devidamente identificadas e provenientes de isolados de coleções reconhecidas (GEISER et al., 2004). A comparação de sequências de TEF1 com a base de dados permite uma rápida e precisa identificação da maioria das espécies de *Fusarium* (HYDE et al., 2014).

4.5. *Lasiodiplodia*

O gênero *Lasiodiplodia* foi identificado por Ellis, in 1894, com *L. tubericola* como espécie-tipo, que logo foi sinonimizada com *L. theobromae*. O gênero se caracteriza por apresentar picnídios com conídios hialinos quando imaturos e marrons e septados quando amadurecem. A principal característica que distingue *Lasiodiplodia* de outros gêneros relacionados da família Botryosphaeriaceae é a presença de paráfises picnidiais e de estrias longitudinais em conídios maduros (BURGESS et al., 2006; PHILLIPS et al., 2008, 2013).

Espécies de *Lasiodiplodia* ocorrem principalmente em regiões tropicais e subtropicais, tendo sido descritas como saprófitas, endófitas e parasitas (BURGESS et al., 2006). Mais de 690 espécies de plantas são hospedeiras de *Lasiodiplodia* (FARR; ROSSMAN, 2017), causando os mais variados sintomas, incluindo cancos no caule, gomose, morte descendente e podridões em pós-colheita (MANAWASINGHE et al., 2016).

A classificação taxonômica de *Lasiodiplodia* é confusa. Durante os últimos 150 anos, esse fungo tem recebido muitos nomes e tem sido tratado como muitas espécies diferentes. Essa situação chegou ao fim com a monografia de Punithalingam (1976), que reduziu muitas

espécies à sinonímia de *L. theobromae*. Posteriormente, estudos baseados nas sequências dos genes ITS e EF1 levaram à identificação de espécies crípticas dentro do complexo de espécies *L. theobromae* (PHILLIPS et al., 2013). Pela análise filogenética multilocus baseada nas sequências combinadas dos genes ITS, EF1, TUB2, SSU, LSU, RPB2 e ACT 30 espécies de *Lasiodiplodia* foram reconhecidas até janeiro de 2017 (COUTINHO et al., 2017; NETTO et al., 2016).

4.6. *Phialophora*

O gênero *Phialophora* foi descrito por Medlar, em 1915, reportando *P. verrucosa* como espécie-tipo. Suas espécies estão presentes em diferentes ecossistemas como endófitas, saprófitas, patógenos de plantas e humanos (YAN et al., 1995). Numerosos estudos foram realizados com base em características morfológicas, com a finalidade de compreender as relações entre as diferentes espécies do gênero e sua identificação (CAIN, 1952; COLE; KENDRICK, 1973). Porém, a delimitação de espécies torna-se difícil pela pouca quantidade de caracteres morfológicos confiáveis e sua natureza polimórfica (YAN et al., 1995). Alguns estudos têm sido publicados utilizando técnicas moleculares para analisar o complexo grupo de espécies dentro do gênero *Phialophora*, com destaque para os marcadores ITS, LSU, TUB2 e SSU combinados com caracteres morfológicos (DE HOOG et al., 1999; UNTEREINER et al., 2008; YAN et al., 1995). Somado às dificuldades inerentes na identificação das espécies de *Phialophora*, muitas sequências depositadas no GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI) não estão corretamente identificadas (NILSSON et al., 2006). Como resultado, o entendimento das relações filogenéticas das espécies do gênero *Phialophora* é limitado caso não seja baseado em abordagens integrais (KO et al., 2011).

4.7. *Pseudocercospora*

O gênero *Pseudocercospora* foi introduzido originalmente por Spegazzini, em 1910, baseado em *Pseudocercospora vitis* como espécie-tipo. Atualmente existe cerca de 1600 espécies reconhecidas do gênero (MYCOBANK, 2017). *Pseudocercospora* é um gênero cosmopolita, presente em ambientes áridos, úmidos, temperados, tropicais e subtropicais, patógeno de plantas comumente associado a manchas e queimas em folhas e frutos de uma ampla gama de hospedeiros. Suas espécies são reconhecidas também como endófitas,

saprófitas e utilizadas para controle biológico (DEN BREEÏEN et al., 2006). Existem poucos caracteres morfológicos informativos em nível de gênero. Estudos moleculares recentes baseados na sequências de diferentes genes forneceram informações substanciais para a definição deste gênero, que inicialmente era identificado como o anamorfo de *Mycosphaerella* (CROUS et al., 2013). Entre os marcadores utilizados podem ser mencionados a região ITS, LSU, ACT e EF1- α . Futuros estudos que combinem morfologia, dados moleculares e associação com hospedeiro podem ser fundamentais na delimitação desse gênero (GROENEWALD et al., 2013).

5. Análises moleculares envolvendo fungos associados à mancha marrom

Estudos moleculares dos fungos associados à mancha-marron são escassos. A primeira pesquisa utilizando dados moleculares foi desenvolvida por Ayala et al. (2006), no México, que utilizou isolados provenientes de lesões de cladódios de *O. ficus-indica* e os analisou mediante a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), amplificando a região ITS com os primers ITS1 e ITS4. A análise filogenética foi realizada por Máxima Parcimônia, descrevendo uma espécie nova de *Pseudocercospora* associada à mancha marrom e denominada *P. opuntiae* Ayala-Escobar, U. Braun & Crous. Posteriormente, Flores-Flores et al. (2013) analisaram isolados fúngicos obtidos de *O. ficus-indica* no México utilizando a região ITS com os mesmos primers citados anteriormente. Pela análise filogenética de Neighbour-joining esses autores identificam sete espécies associadas à mancha-marron: *Alternaria alternata*, *Curvularia lunata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium lunatum*, *Fusarium oxysporum*, *Lasiodiplodia theobromae* e *Phialophora cyclaminis*.

A região ITS tem sido popularmente utilizada para identificação de espécies fúngicas e para inferência filogenética subgenérica, dispondo de uma grande quantidade de sequências depositadas no GenBank do NCBI (NILSSON et al., 2008). Durante muito tempo essa região foi proposta como DNA barcode, com alta probabilidade de identificação bem sucedida para uma ampla gama de fungos, conseguindo detectar variações inter e intraespecíficas (SCHOCH et al., 2012). No entanto, estudos recentes questionam a capacidade deste marcador para a identificação de todas as espécies dentro de um gênero ou para espécies estreitamente relacionadas filogeneticamente, gêneros constituídos por complexos de espécies ou que apresentam espécies crípticas que diferem só em uma ou algumas posições de nucleotídeos (LEVENTE, 2012). Como exemplo, no gênero como *Colletotrichum*, ITS só resolve os grandes clados (CANNON et al., 2012); no gênero *Lasiodiplodia*, uso somente de ITS têm

grandes limitações, sendo recomendando somente para distinção em nível de gênero dentro da família Botryosphaeriaceae; para *Fusarium*, a região ITS é considerada pouco informativa e não é recomendado para a identificação e diferenciação de espécies (SUMMERELL; SALLEH; LESLIE, 2003, HYDE et al., 2014).

6. Fatores associados ao desenvolvimento de doenças em plantas

Doenças de plantas se desenvolvem como resultado da combinação de plantas hospedeiras suscetíveis, patógenos virulentos e condições ambientais favoráveis. O nível de desenvolvimento de uma doença resulta da intensidade da interação entre patógeno e hospedeiro, influenciada por fatores como agressividade do patógeno e adequação do tecido hospedeiro e do ambiente (AGRIOS, 2005).

A agressividade de um patógeno pode ser definida como um componente quantitativo da patogenicidade, ou seja, a quantidade de doença induzida por um isolado de um patógeno em um hospedeiro suscetível (AGRIOS, 2005; SHEW; SHEW, 2017). As espécies de um patógeno e os indivíduos dentro de uma espécie podem variar na agressividade. Agentes patogênicos que causam sintomas severos são altamente agressivos, enquanto aqueles que causam sintomas leves são pouco agressivos. Patogenicidade e agressividade no patógeno são características herdadas, mas a agressividade também pode variar com a idade, o estágio de vida, as reservas nutricionais ou a exposição prévia a condições adversas ou favoráveis dos patógenos (SHEW; SHEW, 2017).

As doenças de plantas ocorrem em uma vasta gama de condições ambientais. Sua intensidade, frequência e impacto são afetadas pelo grau de desvio de cada condição ambiental do ponto ótimo para seu desenvolvimento. Entre os fatores que mais influenciam a ocorrência de doenças podem ser mencionados a temperatura e a umidade (AGRIOS, 2005; BEDENDO; AMORIM, 2011; CAMPBELL; MADDEN, 1990; KRANZ, 2003; ROTEM, 1978; STRUCK, 2006).

Os patógenos diferem entre si quanto a sua preferência pelas temperaturas, assim algumas doenças desenvolvem melhor em baixas temperaturas em tanto que outras onde prevalecem temperaturas relativamente altas, mas a influencia da temperatura no patógeno e menos marcada que aquela exercida pela umidade. A maioria dos patógenos podem crescer e se desenvolver em uma ampla faixa de temperaturas, sendo raramente um fator limitante.

O efeito da temperatura sobre o desenvolvimento de uma doença, em particular após a infecção, depende da relação específica patógeno-hospedeiro. O desenvolvimento rápido da doença normalmente ocorre quando a temperatura é ótima para o patógeno, mas esta por baixo ou por cima da ótima para o hospedeiro. A alteração da suscetibilidade do hospedeiro em função da temperatura pode ser atribuída à redução na formação de compostos fenólicos e bloqueio de mecanismos estruturais que dificultam a colonização do tecido vegetal pelo patógeno (BEDENDO; AMORIM, 2011). Temperaturas altas ou baixas podem operar no mecanismo genético da célula a fim de favorecer ou inibir a expressão de determinados genes envolvidos na resistência ou susceptibilidade a doenças (AGRIOS, 2005).

A umidade é outro fator que tem marcada influência não só no início das doenças, mas também no desenvolvimento das mesmas. A umidade pode se apresentar de diferentes formas, como chuva, orvalho, água de irrigação, ou umidade relativa. A umidade, como salpicos de chuva e água corrente, tem um papel fundamental na distribuição e dispersão de muitos patógenos, seja na mesma planta ou entre plantas vizinhas. Outro efeito é talvez o mais importante e sobre a germinação dos esporos e penetração do tubo germinativo no hospedeiro. A maioria dos fungos requer de água livre durante horas na superfície do hospedeiro para germinação e penetração no hospedeiro. Finalmente a umidade também tem influência no hospedeiro, incrementando a suculência dos tecidos e, portanto, a susceptibilidade ao ataque de alguns patógenos, ou por deficiência provocando diferentes graus de subdesenvolvimento incrementando sua predisposição ao ataque de patógenos (AGRIOS, 2005; BEDENDO, AMORIM, 2011).

Existem três vias principais de penetração dos patógenos de plantas em seus hospedeiros: a via direta pela superfície intacta da planta, por aberturas naturais como estômatos e lenticelas e por ferimentos. Os fungos podem utilizar estas três vias e alguns para iniciar o processo de infecção precisam da presença de ferimento por não ter a capacidade de penetrar por via direta (DROBY; WISNIEWSKI; BENKEBLIA, 2011). Ferimentos fornecem locais para entrada de microrganismos nos tecidos, aceleram a taxa de respiração, a transpiração e a permeabilidade das membranas, com a consequente perda de água e compostos celulares solúveis em água, eletrólitos e íons, que favorecem o processo infeccioso (AGRIOS, 2005). Portanto, os fatores associados ao hospedeiro, a presença e a idade do ferimento podem ser determinantes para a ocorrência das doenças (STRUCK, 2006). O processo de cicatrização do tecido lesionado pode também influenciar na severidade da doença, pois durante a cicatrização dos tecidos ocorre a produção e deposição de substâncias incrustantes como a suberina e lignina, nas paredes celulares do lado injuriado para formar a

periderme da lesão (DROBY; WISNIEWSKI; BENKEBLIA, 2011), podendo constituir um mecanismo de resistência estrutural ao processo infeccioso. A menor intensidade de lesões em ferimentos mais antigos pode também ser atribuída ao acúmulo de fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (PR), em resposta à injúria mecânica, que podem inibir as ações de agentes patogênicos (ADASKAVEG; FÖRSTER; SOMMER, 2002).

Mundialmente, as doenças em palma forrageira têm sido pouco estudadas e inexistem estudos sobre o efeito de fatores do hospedeiro, do patógeno e do ambiente na agressividade dos agentes associados à mancha marrom da palma forrageira. Portanto, pouco é conhecido sobre os aspectos epidemiológicos dessa doença, o que dificulta o desenvolvimento de estratégias de manejo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADASKAVEG, J. E.; FÖRSTER, H.; SOMMER, N. F. Principles of postharvest pathology and management of decays of edible horticultural crops. In: KADER, A. (Ed.). **Postharvest technology of horticultural crops**. Davis: University of California Agriculture and Natural Resources, 2002. p. 163–195.
- AGRIOS, G. N. Plant disease caused by fungi. In: AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. San Diego: Elsevier, 2005. p. 385-614.
- AMMAR, M. I.; SHLTOUT, A. B.; KAMHAWY, M. A. Cladode and fruit rots of prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L. Mill.) in Egypt. **Egyptian Journal of Phytopathology**, Cairo, v. 32, n. 1-2, p. 119–128, 2004.
- AYALA-ESCOBAR, V. B.; YAÑEZ-MORALES, M. J.; BRAUN, U.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. *Pseudocercospora opuntiae* sp. nov., the causal organism of cactus leaf spot in Mexico. *Fungal Diversity*, Kunming, v. 21, n. 1, p. 1–9, 2006.
- BARBERA, G. História e importância econômica e agroecológica. In: BARBERA, G.; INGLESE, P.; PIMIENTA-BARRIOS, E. (Eds.). **Agroecologia, cultivo e usos da palma forrageira**. Roma: FAO/Sebrae, 2001. p. 1–11.
- BARBOSA, R. S.; CALVALCANTI, V. A. L.; LOPES, E. B.; ARAÚJO, E. Doenças da palma forrageira. In: LOPES, E. B. (Ed.). **Palma forrageira: cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semiárido nordestino**. João Pessoa: EMEPA/FAEPA, 2012. p. 81–98.
- BEDENDO, I. P.; AMORIM, L. Ambiente e doença. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Ceres, 2011. p. 133–147.
- BERBEE, M. L.; PIRSEYEDI, M.; HUBBARD, S. *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase gene sequences. **Mycologia**, Bronx, v. 91, n. 6, p. 964–977, 1999.
- BURGESS, T. I.; BARBER, P. A.; MOHALI, S.; PEGG, J.; 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.
- CAI, L.; HYDE, K. D.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B.; WALLER, J.M.; ABANG, M. M.; ZANG, J. C.; YANG, Y. L.; PHOULIYONG, S.; PRIHASTUTI, Z. Y.; SHIVAS, R. G.; MCKENZIE, E. H. C.; JOHNSTON, P. R. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 39, n. 1, p.183–204, 2009.
- CAIN, R. F. Studies of fungi imperfecti I. *Phialophora*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 30, n.3, p. 338–343, 1952.
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley & Sons, 1990. 532 p.

CANNON, P. F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P.R.; WEIR, B. S. *Colletotrichum* current status and future directions. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, n. 1, p. 181–213, 2012.

COLE, G. T.; KENDRICK, B. Taxonomic studies of *Phialophora*. **Mycologia**, Bronx, v. 65, n. 3, p. 661–688, 1973.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira, 2015**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 10 fev. 2017.

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.; BRAUN, U.; HUNTER, G.C.; WINGFIELD, M.J.; VERKLEY, G. J M.; SHIN, H. D.; NAKASHIMA, C.; GROENEWALD, J.Z. Phylogenetic lineages in *Pseudocercospora*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 75, n. 1, p. 37–114, 2013.

DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUDEBERG, J. H. C.; CROUS, P. W. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.73, n. 1, p. 37–113, 2012a.

DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUDEBERG, J. H. C.; JOHNSTON, P. R, WEIR, B.; TAN, Y. P.; SHIVAS, R. G.; CROUS, P. W. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.73, n. 1, p. 1–36, 2012b.

DE HOOG, G. S.; WEENINK, X. O.; VAN DEN ENDE, A. H. G. Taxonomy of the *Phialophora verrucosa* complex with the description of two new species. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 43, p. 107–121, 1999.

DE LUNA, L. Z.; WATSON, A. K.; PAULITZ, T. C. Reaction of rice (*Oryza sativa*) cultivars to penetration and infection by *Curvularia tuberculata* and *C. oryzae*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 86, n. 5, p. 470–476, 2002.

DEN BREEËN, A.; GROENEWALD, J. Z.; VERKLEY, G. J. M.; CROUS, P. W. Morphological and molecular characterisation of *Mycosphaerellaceae* associated with the invasive weed, *Chromolaena odorata*. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 23, n. 1, p. 89–110, 2006.

DOYLE, V. P; OUDEMANS, P. V.; REHNER, S.A.; LITT, A. Habitat and host indicate lineage identity in *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. from wild and agricultural landscape in North America, **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 5, p. 1–21. 2013.

DROBY, S.; WISNIEWSKI, M.; BENKEBLIA, N. Postharvest pathology of tropical and subtropical fruit and strategies for decay control. In: Yahia, E. M. (Ed.). **Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits: fundamental issues**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2011. p. 194–223.

ELLIS, M. B. **Dematiaceous hyphomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 608 p.

FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. **Fungal database: fungus–host distributions** [online]. In: USDA. Beltsville: Systematic Mycology and Microbiology Laboratory – ARS/USDA, 2017.

Disponível em: <<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/fungushost/fungushost.cfm>>. Acesso em: 15 jan. 2017.

FERREIRA, M. A.; BISPO, S. V.; ROCHA FILHO, R. R.; URBANO S. A.; COSTA, C. T. F. The use of cactus as forage for dairy cows in semi-arid regions of Brazil. In: KONVALINA, P. (Ed.). **Organic farming and food production**. Rijeka: InTech, 2012. p. 169–189.

FLORES-FLORES, R.; VELÁZQUEZ-DEL VALLE, M. G.; LÉON-RODRIGUEZ, L.; FLORES-MOCTEZUMA, H. E.; HERNÁNDEZ-LAUZUARDO, A. N. Identification of fungal species associated with cladode spot of prickly pear and their sensitivity to chitosan. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 161, n. 7-8, p. 544–552, 2013.

GRANATA, G. Doenças bióticas e abióticas. In: BARBERA, G.; INGLESE, P.; PIMIENTA-BARRIOS, E. (Eds.). **Agroecologia, cultivo e usos da palma forrageira**. Roma/Brasília: FAO/Sebrae, 2001. p. 112–122.

GROENEWALD, J. Z.; NAKASHIMA, C.; NISHIKAWA, J.; SHIN, H-D.; PARK, J-H; JAMA, A.N.; GROENEWALD, M.; BRAUN, U.; CROUS, P. W. Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 75, n. 1, p. 115–170. 2013.

GRUM-GRZHIMAYLO, A. A, GEORGIEVA, M. L; BONDARENKO, S. A; ALFONS J. M. D. ; BILANENKO, E. N. On the diversity of fungi from soda soils. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 76, n. 1, p. 27–74, 2016.

HYDE, K. D.; NILSSON, R. H.; ALIAS, S. A; ARIYAWANSA, H. A.; BLAIR, J. E.; CAI, L.; DE COCK, A.; DISSANAYAKE, A. J.; GLOCKLING, S. L.; GOONASEKARA, I. D.; GORCZAK, M.; HAHN, M.; JAYAWARDENA, R. S.; AL VAN KAN, J.; LAURENCE, M. H.; LÉVESQUE, C. A.; LI, X.; LIU, J-K.; MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N.; MANAMGODA, D. S.; MARTIN, F. N.; MCKENZIE, E. H. C.; MCTAGGART, A. R.; MORTIMER, P. E.; NAIR, P. V. R.; PAWŁOWSKA, J.; RINTOUL, T. L.; SHIVAS, R. G.; SPIES, C. F. J.; SUMMERELL, B. A.; TAYLOR, P. W. J.; TERHEM, R. B.; UDAYANGA, D.; VAGHEFI, N.; WALTHER, G.; WILK, M.; WRZOSEK, M.; XU, J-C.; YAN, J.; ZHOU, N. One stop shop: backbones trees for important pytopathogenic genera: **Fungal Diversity**, Kunming, v. 67, n. 1, p. 21–125, 2014.

HYDE, K. D.; CAI, L.; CANNON, P. F.; CROUCH, J. A.; CROUS, P. W.; DAMM, U.; GOODWIN, P. H.; CHEN, H.; JOHNSTON, P. R.; JONES, E. B. G.; LIU, Z. Y.; MCKENZIE, E. H. C.; MORIWAKI, J.; NOIREUNG, P.; PENNYCOOK, S. R.; PFENNING, L. H.; PRIHASTUTI, H.; SATO, T.; SHIVAS, R. G.; TAN, Y. P.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B. S.; YANG, Y. L.; ZHANG, J. Z. *Colletotrichum* – names in current use. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 39, n. 1, p. 147–183, 2009.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). **SIDRA**: Sistema IBGE de recuperação automática [on line]. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2017. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda>>. Acesso em: 18 jan. 2017.

KO, T. W. K.; STEPHENSON, S. L.; BAHKALI, A. H.; HYDE, K. D. From morphology to molecular biology: can we use sequence data to identify fungal endophytes? **Fungal Diversity**, Kunming, v. 50, n. 1, p. 113–120, 2011.

KRANZ, J. **Comparative epidemiology of plant diseases**. Berlin: Springer-Verlag, 2003. 206 p.

LAURENCE, M. H.; BURGESS, L. W.; SUMMERELL, B. A.; LIEW, E. C. Y. Genealogical concordance phylogenetic species recognition in the *Fusarium oxysporum* species complex. **Fungal Biology**, Oxford, v. 118, n. 3, p. 374–384, 2014.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Ames: Blackwell Publishing, 2006. 388 p.

LEVENTE, K. Limits of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) sequences as species barcodes for fungi. **PNAS**, Washington, v. 109, n. 27, p. E1811, 2012. DOI: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1207143109>.

LIMA, G. S. A.; ASSUNÇÃO, I. P.; MARTINS, R. B.; SANTOS, H. V.; MICHEREFF, S. J. Development and validation of a standard area diagram set for assessment of alternaria spot on the cladodes of the prickly pear cactus. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 93, n. 3, p. 691–695, 2011.

LIU, X.Y.; DUAN, J.X.; XIE, X.M. *Colletotrichum yunnanense* sp. nov, a new endophytic species from *Buxus* sp. **Mycotaxon**, New York, v, 100, n. 1, p.137–144, 2007.

LOPES, E. B.; SANTOS, D. C. E.; VASCONCELOS, M. F. Cultivo da palma forrageira. In: LOPES, E. B. (Ed.). **Palma forrageira: cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semiárido nordestino**. João Pessoa: EMEPA/FAEPA, 2012. p. 21–60

MADRID, H.; CUNHA, K. C.; GENÉ, J.; DIJKSTERHUIS, J.; CANO, J.; SUTTON, D. A.; GUARRO, J.; CROUS, P. W. Novel *Curvularia* species from clinical specimens. **Persoonia**, Leiden, v. 33, n. 1, p. 48–60, 2014.

MANAMGODA, D. S.; UDAYANGA, D.; CAI, L.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. Endophytic *Colletotrichum* from tropical grasses with a new species *C. endophytica*. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 61, n. 1, p. 107–115. 2013.

MANAWASINGHE, I. S.; PHILLIPS, A. J. L.; HYDE, K. D.; CHETHANA, K. W. T.; ZHANG, W.; ZHAO, W. S.; YAN, J. Y.; LI, X. H. Mycosphere Essays 14: Assessing the aggressiveness of plant pathogenic Botryosphaeriaceae. **Mycosphere**, Guizhou, v.7, n. 7, p. 883-892. 2016

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). **AGROFIT** - Sistema de agrotóxicos fitossanitários [on line]. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2017. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 20 jan. 2017.

MÉNDEZ-GALLEGOS, S. J.; TALAVERA-MAGAÑA, D.; GARCÍA-HERRERA, E. J. Identificación y control de las principales enfermedades del nopal. In: SIMPOSIUM-TALLER “PRODUCCIÓN Y APROVECHAMIENTO DEL NOPAL EN EL NORDESTE

DE MÉXICO”, 7., 2008, Mina, México. **Anais...** Mina: Facultad de Agronomía, UNAL / Museo Bernabé de las Casas, 2008. p. 55–66.

MILLS, P. R.; HODSON, A.; BROWN, A. E. Molecular differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting tropical fruits. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Eds.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992. p. 269–288.

MYCOBANK. **Fungal databases: nomenclature and species bank** [on line]. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center, 2017. Disponível em: < <http://www.mycobank.org/>>. Acesso em: 06 jan. 2017.

NETTO, M. S. B.; LIMA, W. G.; CORREIA, K. C.; DA SILVA, C. F. B.; 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**, London, 2016. Aceito para publicação. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2016.07.006>

NILSSON, R. H.; KRISTIANSOON, E.; RYBERG, M.; HALLENBERG, N.; LARSSON, K-H. Intraspecific ITS variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. **Evolutionary Bioinformatics**, London, v. 4, n. 2, p.193–201, 2008.

NILSSON, R. H.; RYBERG, M.; KRISTIANSOON, E.; ABARENKOV, K.; LARSSON, K. H.; KOLJALG, U. Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 1, n. 1, p. e59, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0000059>.

O'DONNELL, K.; ROONEY, A. P.; PROCTOR, R. H.; BROWN, D. W.; MCCORMICK, S. P.; WARD, T. J.; FRANDBSEN, R. J. N.; LYSØE, E.; REHNER, S. A.; AOKI, T.; ROBERT, V. A. R. G.; CROUS, P. W.; KANG, S.; GEISER, D. M. RPB1 and RPB2 phylogeny supports an early Cretaceous origin and a strongly supported clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 52, n. 1, p. 20–31, 2013.

O'DONNELL, K.; SUTTON, D. A.; FOTHERGILL, A.; MCCARTHY, D.; RINALDIM, G.; BRANDT, M. E.; ZHANG, N.; GEISER, D. M. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, n. 8, p. 2477–2490, 2008.

O'DONNELL, K.; SUTTON, D. A.; RINALDI, M. G.; SARVER, B. A. J.; BALAJEE, S. A.; SCHROERS, H-S.; SUMMERBELL, R.C.; ROBERT, V.A. R. G.; CROUS, P. W.; ZHANG, N.; AOKI, T.; JUNG, K.; PARK, J.; LEE, Y-H.; KANG, S.; PARK, B.; GEISER, D. M. Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, n. 10, p. 3708–3718. 2010.

OLIVEIRA, F. T.; SOUTO, J. S. SILVA, R. P. ANDRADE FILHO, F. C.; PEREIRA JÚNIOR. Palma forrageira: adaptação e importância para os ecossistemas áridos e semiáridos. **Revista Verde**, Mossoró, v. 5, n. 4, p. 27–37. 2010.

PENG, L. J.; YANG, Y. L.; HYDE, K. D.; BAHKALI, A. H.; LIU, Z. *Colletotrichum* species on Citrus leaves in Guizhou and Yunnan provinces, China. **Cryptogamie Mycologie**, Paris, v. 33, n. 2, p. 267–283, 2012.

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, n. 1, p. 51–167. 2013.

PHILLIPS, A. J. L.; ALVES, A.; PENNYCOOK, S. R.; JOHNSTON, P. R.; RAMALEY, A.; AKULOV, A.; CROUS, P. W. Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the Botryosphaeriaceae. **Persoonia**, Leiden, v. 21, n. 1, p. 29–55. 2008.

PRIHASTUTI, H.; CAI, L.; CHEN, H.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in Chiang Mai, Thailand. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 39, n. 1, p. 89–109. 2009.

PUNITHALINGAM, E. Plant diseases attributed to *Botryodiplodia theobromae*. Vaduz: J. Cramer, 1976. 123 p.

QUEZADA-SALINAS, A.; SANDOVAL-ISLAS, S.; ALVARADO-ROSALES, D., CÁRDENAS-SORIANO, E. Etiología de la mancha negra del nopal (*Opuntia ficus-indica* Mill) em Tlalnepantla, Morelos, México. **Agrociencia**, Montecillo, v. 40, n. 1, p. 641–653, 2006.

REBMAN, J. P.; PINKAVA, D. J. *Opuntia* cacti of North America – an overview. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 84, n. 4, p. 474–483, 2001.

REYES-AGUERO, J. A.; AGUIRRE-RIVERA, J. R.; HERNÁNDEZ, H. M. Notas sistemáticas y descripción detallada de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae). **Agrociencia**, Montecillo, v. 39, n. 3, p. 395–408, 2005.

ROBERTS, R. G.; BISCHOFF, J. F.; REYMOND, S.T. Differential gene expression in *Alternaria gaisen* exposed to dark and light. **Mycological Progress**, v. 11, n. 3, p. 373–382. 2012.

ROBERTS, R. G.; REYMOND, S. T.; ANDERSEN, B. RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of small-spored *Alternaria* species and species groups. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, n. 2, p. 151–160. 2000.

ROCHA, J.E.S. Palma Forrageira no Nordeste do Brasil: Estado da Arte. Sobral: EMBRAPA, 2012. 40 p. (EMBRAPA. Documentos, 106)

ROTEM, J. Climatic and weather influences on epidemics. In: HORSFALL, J. G.; COWLING, E. B. (Eds.). **Plant disease: an advanced treatise**. New York: Academic Press, 1978. v. 2, p. 317–337.

ROTEM, J. **The genus *Alternaria***: biology, epidemiology and pathogenicity. St. Paul: APS Press, 1994. 326 p.

SANTOS, D. C.; FARIAS, I.; LIRA, M. A.; SANTOS, M. V. F.; ARRUDA, G. P.; COELHO, R. S. B.; DIAS, F. M.; MELO, J. N. **Manejo e utilização da palma forrageira (*Opuntia e Nopalea*) em Pernambuco**. Recife: IPA, 2006. 48 p. (IPA. Documentos, 30).

SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K. A.; HUHDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J. L.; LEVESQUE, C.A.; CHEN, W. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. **PNAS**, Washington, v. 109, n. 16, p. 6241–6246, 2012.

SHEW, H. D.; SHEW, B. B. What is plant pathology? In: OWNLEY, B. H.; TRIGIANO, R. N. (Eds.). **Plant pathology: concepts and laboratory exercises**. 3. ed. Boca Raton: CRC Press, 2017. p. 3–21.

SIMMONS, E. G. ***Alternaria*: an identification manual**. Utrecht: CBS Fungal Biodiversity Centre, 2007. 775 p.

SIMÕES, D. A.; SANTOS, D. C.; DIAS, F. M. Introdução da palma forrageira no Brasil. In: MENEZES, R. S. C.; SIMÕES, D. A.; SAMPAIO, E. V. S. B. (Eds.). **A palma no Nordeste do Brasil: conhecimento atual e novas perspectivas de uso**. Recife: Editora da Universitária da UFPE, 2005. 258 p.

SIVANESAN, A. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. **Mycological Papers**, Berlin, v. 158, n. 2, p. 154–185. 1987.

SOMMA, S.; POSE, G.; PARDO, A.; MULÈ, G.; PINTO, V. F.; MORETTI, A.; LOGRIECO, A. F. AFLP variability, toxin production, and pathogenicity of *Alternaria* species from Argentinean tomato fruits and puree. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 145, n. 2-3, p. 414–419. 2011.

SOUZA, A. E. F.; NASCIMENTO, L. C.; ARAÚJO, E.; LOPES, E. B.; SOUTO, F. M. Ocorrência e identificação dos agentes etiológicos de doenças em palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill.) no semiárido paraibano. **Biotemas**, Santa Catarina, v. 23, n. 3, p. 11–20, 2010.

SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A. E.; MILLS, P. R. DNA sequence variation and interrelationship among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 41, n. 2, p. 265–281, 1992.

STEWART, J. E.; ANDREW, M.; BAO, X.; CHILVERS, M. I.; CARRIS, L. M.; PEEVER, T. L. Development of sequence characterized amplified genomic regions (SCAR) for fungal systematics: proof of principle using *Alternaria*, *Ascochyta* and *Tilletia*. **Mycologia**, Bronx, v. 105, n. 4, p. 1077–1086, 2013.

STRUCK, C. Infection strategies of plant parasitic fungi. In: Cooke, B. M.; Gareth Jones, D. G.; Kaye, B. (Eds.). **The epidemiology of plant diseases**. 2. ed. London: Springer, 2006. p. 117–137.

SUASTE-DZUL, A.; ROJAS-MARTÍNEZ, R. I.; ZAVALA-MEJÍA, E.; PÉREZ-BRITO, D. Detección molecular de fitoplasmas em nopal tunero (*Opuntia ficus-indica*) con sintomas

- de engrosamiento del cladódio. **Revista Mexicana de Fitopatología**, Texcoco, v. 30, n. 1, p. 72–80, 2012.
- SUMMERELL, B. A.; SALLEH, B.; LESLIE, J. F. A utilitarian approach to identifying *Fusarium* species. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, n. 1, p. 117–128, 2003.
- SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Eds.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992. p. 1–26.
- TAKAYUKI, A.; O'DONNELL, K.; GEISER, D. M. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 80, n. 2, p. 189–201, 2014.
- TALHINHAS, P.; SREENIVASAPRASAD, S.; NEVES-MARTINS, J.; OLIVEIRA, H. Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 9, p. 986–996. 2002.
- THOMMA, B. P. H. J. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 4, n. 4, p. 225–236. 2003.
- UNTEREINER, W. A.; ANGUS, A.; REBLOVA, M.; ORR, M. J. Systematics of the *Phialophora verrucosa* complex: new insights from analyses of beta-tubulin, large subunit nuclear rDNA and ITS sequences. **Botany** v. 86, n. 7, p. 742–750. 2008.
- WEIR, B.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, n. 1, p. 115–180, 2012.
- WOUDENBERG, J. H. C.; GROENEWALD, J. Z.; BINDER, M.; CROWS, P. W. *Alternaria* redefined. Utrecht, **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 75, n. 1, p. 171–212, 2013.
- WOUDENBERG, J. H. C.; TRUTER, M.; GROENEWALD, J. Z.; CROWS, P. W. Large-spored *Alternaria* pathogens in section Porri disentangled. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 79, n. 1, p. 1–47, 2014.
- YAN, Z. H.; ROGERS, S. O.; WANG, C. J. K. Assessment of *Phialophora* species based on ribosomal DNA internal transcribed spacers and morphology. **Mycologia**, Bronx, v. 87, n. 1, p. 72–83, 1995.

Capítulo II

Characterization of fungal species associated with cladode brown spot in *Nopalea cochenillifera* in Brazil

1 **Characterization of fungal species associated with cladode brown spot in**
2 ***Nopalea cochenillifera* in Brazil**

3

4 **C. Conforto^a, N. B. Lima^b, F. J. A. Silva^b, M. P. S Câmara^b and S. J. Michereff^{b*}**

5

6 *^aInstituto de Patologia Vegetal, CIAP-INTA, Córdoba, X5020, Argentina; ^bDepartamento de*
7 *Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife, Brazil*

8

9 * Corresponding author: S. J. Michereff - e-mail: sami.michereff@ufrpe.com

10 Telephone number: +55 8133206208

11 Fax number: +55 8133206200

12 **Abstract**

13

14 Cladode brown spot is an important disease of prickly pear cactus (*Nopalea cochenillifera*) in
15 the semiarid region of Northeast Brazil. It has been reported in several countries, but its
16 etiology is controversial, attributed to a complex of pathogens. Fifty fungal isolates were
17 sampled and identified on the basis of phylogeny, through analysis of ribosomal DNA internal
18 transcribed spacers (ITS), translation elongation factor 1- α (EF1- α), β -tubulin (TUB2),
19 second largest subunit of RNA polymerase (RPB2), glyceraldehyde-3-phosphate
20 dehydrogenase (GPDH) and the *apn2mat*/IGS (ApMAT) gene sequences. Seven fungal genus
21 and twenty species were identified - *Alternaria*: *A. longipes* *A. tenuissima*, *Alternaria* sp. (ex
22 *Nimbya gomphrenae*); *Colletotrichum*: *C. fructicola* and *C. siamense*; *Fusarium*: *F. lunatum*,
23 *F. incarnatum*, and *F. verticillioides*; *Lasiodiplodia*: *L. euphorbicola*, *L. iraniensis*, *L.*
24 *pseutheobromae*, *L. theobromae* and *Lasiodiplodia* sp.; *Neofusicoccum*: *N. batangarum*;
25 *Neopestalotiopsis*: *N. australis*, *N. protearum* and *Neopestalotiopsis* sp.; and *Nigrospora*: *N.*
26 *sphaerica*, *N. oryzae* and *Nigrospora* sp. Four of these species have already been reported in
27 cactaceae of the genus *Opuntia*, but all species are reported in the genus *Nopalea* for the first
28 time worldwide. All isolates were pathogenic to detached cladodes of prickly pear cactus (var.
29 Miúda). Differences in aggressiveness were observed among the species, with *L. iraniensis*
30 and *F. lunatum* characterized as the most aggressive species, whilst *F. verticillioides* as the
31 least aggressive.

32

33 *Keywords*: aggressiveness, cladode disease, *Nopalea cochenillifera*, pathogenicity, phylogeny

34

35 **Introduction**

36

37 The prickly pear cactus is an important crop for the livestock subsistence in semi-arid regions
38 of the world (Ferreira *et al.*, 2012). In Brazil, the extensive production system of cattle, sheep
39 and goats is very important economic activities in northeast semi-arid region, where prickly
40 pear cactus is the largest cultivated area in the world, estimated at 600,000 hectares (Lopes *et*
41 *al.*, 2012). In this region, two species of prickly pear cactus are cultivated, *Opuntia ficus-*
42 *indica* (L.) Mill., with cultivars Gigante and Redonda, and *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm.
43 Dyck., with cultivar Miúda (Ferreira *et al.*, 2012; Lopes *et al.*, 2012). In recent years, a large
44 expansion of cultivated areas with *N. cochenillifera* has been recorded in northeastern Brazil,
45 due of its excellent features of palatability and digestibility for ruminants, and for the high
46 resistance to the cochineal-carmine (*Dactylopius opuntiae* Cockerell), an insect pest that is
47 decimating *O. ficus-indica* crops in semi-arid regions (Lopes *et al.*, 2012).

48 Despite the rusticity and high adaptability to different environments, as well as being
49 native to very hot regions and dry climate, the prickly pear cactus is affected by several fungal
50 diseases, especially in cladodes (Granata, 2001; Souza *et al.*, 2010; Barbosa *et al.*, 2012). In
51 2001, cladode brown spot (CBS) was firstly noticed in *N. cochenillifera* fields of Pernambuco
52 state (northeast region). Currently, the disease occurs in most fields where this species of
53 prickly pear cactus is cultivated in Brazil. The symptoms are characterized by initially brown
54 and then black spots in the cladodes, circular or elliptical in shape, 1.0-3.0 cm in diameter.
55 The lesions may extend from one side to the other of the cladodes, causing perforations due to
56 the fall of the affected tissue. The lesions can coalesce to form large necrotic areas which
57 cause cladode fall (Souza *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2011; Barbosa *et al.*, 2012).

58 CBS was reported in several countries, but its etiology is controversial, being attributed to
59 a complex of pathogens including *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl, *Alternaria tenuissima*

60 (Nees) Wiltshire, *Colletotrichum gloeosporoides* (Penz) Penz. & Sacc., *Curvularia lunata*
61 (Wakker) Boedijn., *Fusarium lunatum* (Ellis & Everhart) Arx, *Fusarium sporotrichoides*
62 Sherb., *Lasidiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl., *Nigrospora sphaerica* (Sacc.) E.W.
63 Mason, *Pseudocercospora opuntiae* Ayala-Escobar, U. Braun & Crous and *Neofusicoccum*
64 *batangarum* Begoude, Jol. Roux & Slippers (Dodge, 1938; Swart & Kriel, 2002; Ammar *et*
65 *al.*, 2004; Souza *et al.*, 2010; Flores-Flores *et al.*, 2013; Conforto *et al.*, 2016). Many of these
66 fungal species have been described as endophytic in Cactaceae (Fisher *et al.*, 1994;
67 Suryanarayanan *et al.*, 2005; Bezerra *et al.*, 2012; Silva-Hughes *et al.*, 2015).

68 The identification of the majority of fungal species associated with CBS was previously
69 based on morphology. However, a polyphasic approach, using combined DNA sequence
70 analysis of multiple loci coupled with morphological data, is now recommended for accurate
71 fungal species identification (Crous *et al.*, 2009; Gherbawy & Voigt, 2010). To date, the few
72 molecular characterizations of fungal species associated with CBS were performed with
73 sequences from the ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) region. Using this
74 sequences, in México were identified *P. opuntiae* from *Opuntia* spp. (Ayala-Escobar *et al.*,
75 2006) and *C. gloeosporioides*, *A. alternata*, *F. lunatum* and *C. lunata* from *O. ficus-indica*
76 (Flores-Flores *et al.*, 2013).

77 The most popular locus for species identification and subgeneric phylogenetic inference in
78 sequence-based mycological research is the ITS region. Although it shows certain variability
79 even within species, its intraspecific variability is often limited (Nilsson *et al.*, 2008; Levente,
80 2012). The ITS region was proposed for a long time as a universal DNA barcode to facilitate
81 fungal identification (Seifert, 2009; Bellemain *et al.*, 2010; Schoch *et al.*, 2012). However,
82 many phylogenetically related species, especially, cryptic species or species included within
83 species complexes, differ in one or a few nucleotide the ITS level (Nilsson *et al.*, 2008). This
84 is evident in genus such as *Fusarium*, in which the ITS region is considered less informative

85 (Summerell *et al.*, 2003); in *Colletotrichum* can be effective only at the level of major clades,
86 but not resolve species in the genus (Cannon *et al.*, 2012); in *Lasiodiplodia* can be used to
87 delimit the within the Botryosphaeriaceae and also some species at the genus level, but in
88 species considered cryptic, the region ITS is limited (Hyde *et al.*, 2014).

89 Therefore, given the lack of studies on the etiology of the fungal species associated with
90 CBS in prickly pear cactus based in molecular data, the objectives of this work were to
91 characterize fungal species associated with the disease in *N. cochenillifera* based on
92 multilocus DNA sequence data and morphology analysis, as well as to evaluate the
93 pathogenicity and aggressiveness of the isolates.

94

95 **Materials and methods**

96

97 **Sampling and fungal isolation**

98

99 During 2014 and 2015, cladodes of *N. cochenillifera* showing circular to elliptical brown
100 and black spots were collected in 12 fields, located in three municipalities of Pernambuco
101 (Bom Conselho, Caruaru and São João). In each field, a total of 15 cladodes exhibiting a wide
102 variety of lesions in shape, size and consistency (wet/dry) were sampled for fungal isolations.
103 Small pieces (4–5 mm) taken from symptomatic and asymptomatic transition region tissue
104 were washed under running tap water, surface disinfected for 1 min in a 1.5% NaOCl
105 solution, washed twice with sterile distilled water and dried using sterilized paper towels. The
106 pieces were plated onto potato dextrose agar (PDA) (Acumedia) amended with 0.5 g L⁻¹
107 streptomycin sulfate (PDAS). Plates were incubated at 25°C in the dark for 5–7 days. Fungal
108 colonies emerging from plant tissue pieces were individually transferred to PDA plates and
109 incubated at 25°C in the dark, with observation after 3, 7 and 15 days. The isolates were

110 separated by genus, considering the colony and spore morphology (Barnet & Hunter, 1998).
111 The method used to obtain single fungal isolates depended on the predominant reproductive
112 structures in each isolate. If the isolate produced fruiting bodies with abundant spores, single-
113 spore culture was obtained using the procedure described by Goh (1999). If the isolate do not
114 produced spores or produced in small quantities, hyphal tip culture was obtained using the
115 procedure described by Tuite (1969). Pure cultures were stored in sterilized water in
116 cryogenic vials at 25°C in the dark and stock cultures were stored in PDA slants at 5°C in the
117 dark.

118

119 **DNA extraction, PCR amplification and sequencing**

120

121 Fifty isolates were grown on PDA for 4–7 days at 25°C with a 12-h photoperiod. Using a
122 sterile 10 µL pipette tip, aerial mycelium was scraped from the colony surface, placed at -
123 20°C for 15 min and ground to fine powder. The genomic DNA was extracted using the
124 CTAB method (Doyle & Doyle, 1987), with modifications. The mycelium powder was
125 suspended with 500 µl extraction buffer (50 mM TrisHCl pH7.2, 50 mM EDTA pH 8.0, 3%
126 SDS) in a 1.5-ml microcentrifuge tube and incubated at 65°C for 30 min, with intermittent
127 mixing of tube contents. The suspension was centrifuged at 13,500 rpm for 15 min. The
128 supernatant was collected in a 1.5 ml microcentrifuge tube, 300 µl of chloroform:isoamyl
129 alcohol (24:1, v/v) and 100 µl of CTAB (10% w/v cetyltrimethylammonium bromide, 100
130 mM TrisHCl pH 8.0, 0.5 M EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl) were added, and it was vortexed and
131 centrifuged at 13,500 rpm for 15 min at room temperature. The resulting supernatant, with
132 400 µl of isopropanol added, was incubated overnight in a freezer. The suspension was
133 centrifuged at 13,500 rpm for 10 min. The supernatant was mixed with 400 µl of 70% ethanol
134 and centrifuged at 13,500 rpm for 5 min. The resulting pellet was washed twice with 400 µl of

135 absolute ethanol and centrifuged at 13,500 rpm for 5 min. Then the pellet was dried at room
136 temperature and resuspended in 80 μ l TE (10Mm TrisHCl pH8.0, 0.5 M EDTA pH 8.0).
137 DNA quality was corroborated visually in 1% agarose gel by comparing band intensity with a
138 1 kb DNA ladder (Axygen Scientific Inc.) and concentrations were estimated with a NanoVue
139 spectrophotometer (GE Healthcare Life Sciences).

140 Six partial gene portions were proposed: rDNA ITS, translation elongation factor 1- α
141 (EF1- α), β -tubulin (TUB2), second largest subunit of RNA polymerase (RPB2),
142 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) and ApMAT. The primers used for each
143 genus were selected based on previous publications (Table 1).

144 Polymerase chain reactions (PCR) for all genes were prepared in a final volume of 50 μ l
145 containing 31.3 μ l of Milli Q distilled water, 5 μ l of 10X Taq buffer, 5 μ l of dNTP (100 mM
146 each), 1.7 μ l of each primer (10 pM), 4 μ l of MgCl₂ (50Mm), 0.3 μ l Platinum Taq DNA
147 polymerase (5 U μ l⁻¹) (Invitrogen, Carlsbad, USA), 1 μ l of DNA template. PCR reactions
148 were carried out in a thermal cycler (Biocycler MJ 96; Applied Biosystems). The cycling
149 parameters for ITS consisted of a denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles
150 at 94°C for 1 min, 57°C for 1min, 72°C for 1 min and a final cycle at 72°C for 10 min. For
151 688F and EF1-1251R, PCR conditions were an initial step of 94°C for 5 min, followed by 30
152 cycles at 94°C for 30 s, 50°C for 1min, 72°C for 1 min 30 s and a final cycle at 72°C for 10
153 min. The cycling parameters for EF1-728F and EF1-986R consisted of a denaturation step at
154 94°C for 8 min, followed by 40 cycles at 94°C for 20 s, 55°C for 30 s, 72°C for 90 s and a
155 final cycle at 72°C for 7 min. For EF1-526F and EF1-1567R, the conditions were an initial
156 step of 5 min at 94°C, 10 cycles of 30 s at 94°C, 55 s at 63°C or 66°C (decreasing 1°C per
157 cycle), 90 s at 72°C, plus 36 cycles of 30 s at 94°C, 55 s at 53°C or 56°C, 90 s at 72°C,
158 followed by 7 min at 72°C. The cycling parameters for TUB2 consisted of a denaturation step
159 at 94°C for 2 min, followed by 34 cycles at 94°C for 1 min, 57°C for 1min, 72°C for 1 min

160 and a final cycle at 72°C for 10 min. The cycling parameters for RPB2 consisted of a
161 denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 40 cycles at 94°C for 1 min, 57°C for 25 s,
162 72°C for 2 min and a final cycle at 72°C for 10 min. The cycling parameters for *gpd1* and
163 *gpd2* consisted of a denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 40 cycles at 94°C for 30
164 s, 57°C for 30 s, 72°C for 30 s and a final cycle at 72°C for 7 min. For *CgDL_F6* and
165 *CgMAT1_F2*, amplification reactions were performed as follows: 3 min at 94° C followed by
166 30 cycles with 45 s at 94° C, a touchdown annealing step for 45 s starting at 62° C and
167 decreasing 0.5°C per cycle until stabilizing at 57°C during the remaining 20 cycles, 1 min at
168 72° C and a final extension of 7 min at 72°C. The PCR amplifications products were
169 separated by electrophoresis in 1.0% agarose gels and visualized using SYBR® Green I
170 Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen) under UV light. The PCR products were purified using
171 the HiPurA™ PCR Product Purification Kit (Mo Bio Laboratories Inc.) following the
172 manufacturer's instructions. The ITS, EF1- α , TUB2, RPB2, GPDH and ApMAT regions
173 were forward and reverse sequenced with an ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied
174 Biosystems) at Macrogen Inc. (Korea).

175

176 **Phylogenetic analyses**

177

178 Sequences were assembled and quality analyzed using the Staden Package (Staden *et al.*,
179 1998). Manual adjustments were made when necessary. The consensus sequences were
180 compared with the NCBI sequence database using the BLAST algorithm as an approximate
181 identification and to find reference strains to use in the phylogenetic analysis. The alignment
182 was performed using Clustal W as implemented in MEGA v.7 (Kumar *et al.*, 2016) and the
183 online version of the MAFFT program (Katoh & Standley, 2013)

184 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>) with the sequences obtained in this study
185 and type species sequences downloaded from NCBI (Table 2).

186 Phylogenetic analyses were performed using Maximum Likelihood (ML) and Bayesian
187 Inference (BI). Both analyses were performed with the combined datasets as shown in the
188 Table 3. Considering the outgroup taxon, the alignments comprised for *Alternaria* 24 strains,
189 *Colletotrichum* 32 strains, *Fusarium* 72 strains, *Lasiodiplodia* 67 strains, *Neofusicoccum* 48
190 strains, *Neopestalotiopsis* 50 strains and *Nigrospora* 32 strains. The ML analysis was
191 performed using RAxML–HPC2 on XSEDE (Stamatakis, 2006) with bootstrap support of
192 1000 replicates (Felsenstein, 1985), implemented on the CIPRES Science Gateway portal
193 (Miller *et.al.*, 2010). The BI analysis was conducted using MrBayes on XSEDE 3.2.6
194 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) through the CIPRES. The best-fit models for Bayesian
195 analyses were selected with MrModeltest 2.3 (Nylander, 2004) using the Akaike Information
196 Criterion (AIC). The models used for phylogenetic inferences in the ML and BI are shown in
197 the Table 4. The phylogenetic relationships for the entire dataset were estimated by running
198 10⁶ generations, sampled every 1 000 generations. The first 25% of generations were
199 discarded as burn-in. The ML and BI revealed the same phylogenetic relationships and
200 reproducing nearly identical topologies.

201 Phylogenetic trees were viewed with TreeView v. 1.6.6 (Page, 1996). Sequences generated
202 in this study were deposited in GenBank (Table 2) and the alignment in TreeBase.
203 Representative isolates of different fungal species obtained in this study were deposited in the
204 Culture Collection of Phytopathogenic Fungi “Prof. Maria Menezes” (CMM) at the
205 Universidade Federal Rural de Pernambuco (Recife, Brazil).

206

207 **Pathogenicity and aggressiveness on detached cladode**

208

209 Detached cladodes of *N. cochenillifera* were used to investigate the pathogenicity and
210 aggressiveness of fungal isolates identified in the phylogenetic analyses. Adult cladodes were
211 collected at a production field in São João (Pernambuco), from which fungal species were not
212 detected after repeated sampling and isolation attempts. The cladodes were selected for
213 uniformity of size, thickness and absence of injuries. Prior to inoculation, the cladodes were
214 washed with running water, disinfested by immersion in 1% NaOCl solution for 3 min, rinsed
215 twice in distilled water and placed to dry on a laboratory bench.

216 The cladodes were wounded at six equidistant points by introducing a 4 mm diameter
217 sterilized cork borer through the shell surface to 2 mm depth. The wound was inoculated with
218 a mycelial plug (4 mm in diameter) removed from the margin of a 5-day-old PDA culture of
219 each isolate. Non-colonized PDA agar plugs were used as negative controls. Inoculated and
220 control cladodes were placed in plastic trays (50x30x20 cm) with four paper layers wetted
221 with distilled water (200 mL tray⁻¹) and were sealed with plastic bags to maintain the high
222 humidity. The trays were placed in an incubation room at 25°C in the dark. After 72 h, the
223 plastic bags and paper towels were removed from the trays and the cladodes were kept at the
224 same temperature for an additional 8 days. Following incubation, inoculated points in the
225 cladodes were visually observed to verify the presence of lesions. The presence of lesions
226 advancing beyond the original 4-mm diameter inoculation point was considered indicative of
227 pathogenicity. Isolate aggressiveness was evaluated by measuring the diameter of the lesions
228 (mm) in perpendicular directions with a digital calliper (Mitutoyo Co.) and calculating the
229 mean diameter of the lesion. The experiment was conducted twice, in a completely
230 randomized design with four replications per treatment (isolate) and two cladodes per
231 replicate. One-way analysis of variance (ANOVA) was conducted to determine the
232 significance of differences in aggressiveness of fungal species and means were compared by

233 Fisher's least significant difference (LSD) test at the 5 % significance level using Statistix v.
234 9.0 (Analytical Software).

235

236 **Results**

237

238 **DNA sequencing and phylogenetic analyses**

239

240 A total of 50 isolates were identified based on phylogenetic analysis using multilocus DNA
241 sequences. The ML and BI were performed with the combined datasets as shown in the Table
242 3, revealing the same phylogenetic relationships and reproducing nearly identical topologies.

243 A total of 20 fungal species were identified with six partial gene sequences. Thirteen
244 isolates were identified as *Alternaria*, all within the section *Alternata* in three well-supported
245 clades, two isolates (CMM 1371 and CMM 1373) as *A. tenuissima* (BI: 1/ ML:90); eight
246 isolates (CMM 1376, CMM 1377, CMM 1379, CMM 1380, CMM 1381, CMM 1382, CMM
247 0245 and CMM 1195) as *A. longipes* (BI: 1 / ML: 100) and three isolates (CMM 1383, CMM
248 1386 and CMM 1389) as *Alternaria* sp. (ex *Nimbya gomphrenae*) (BI: 1 / ML: 100) (Fig. 2).
249 Five isolates were identified as *Colletotrichum*, all within the *Gloeosporiodes* complex
250 (*Musae* clade) with supported clades, one isolate (CMM 2159) as *C. fructicola* and four
251 isolates as *C. siamense* (CMM 2118, CMM 2166, CMM 2207 and CMM 2228) (Fig. 3). Six
252 isolates were identified as *Fusarium*, one isolate as *F. verticilloides* (CMM 1356), two
253 isolates as *F. incarnatum* (CMM 1345 and CMM 1349) and three isolates as *F. lunatum*
254 (CMM 1284, CMM 1288 and CMM 1293), clustered in three different strongly supported
255 clades (BI: 1/ ML:100, BI: 0.97/ ML: 91, BI: 1/ ML:100 respectively) corresponding to the
256 Fujikuroi, Incarnatum-Equiseti and Dimerum complexes, respectively (Fig. 4). Five isolates
257 (CMM 1424, CMM 1425, CMM 1426, CMM 1427 and CMM 1428) were identified as

258 *Neofusicoccum batangarum* with supported clades BI:0.87:/ML: 64 (Fig. 5). Three isolates
259 were identified within the genus *Neopestalotiopsis*, one as *N. protearum* (CMM 1357), one as
260 *N. australis* (CMM 1359) and one as *Neopestalotiopsis* sp. (CMM 1363) (Fig. 6). Seven
261 isolates were identified as *Nigrospora*, three as *N. sphaerica* (CMM 0565, CMM 0859 and
262 CMM 0979), two as *N. oryzae* (CMM 1278 and CMM 1279) and two as *Nigrospora* sp.
263 (CMM 1214 and CMM 1217), with supported clades BI: 1/ML: 90, BI: 1/ML: 80 and BI:
264 98/ML: 0.86, respectively (Fig. 7). Eleven isolates were identified as *Lasiodiplodia*, one as *L.*
265 *euphorbicola* (CMM 2463), two as *L. theobromae* (CMM 2460 and CMM 2462), two as *L.*
266 *pseutheobromae* (CMM 2250 and CMM 2285), six as *L. iraniensis* (CMM 2331, CMM 2338,
267 CMM 2341, CMM 2432, CMM 2459 and CMM 2460) and one isolate (CMM 2475) did not
268 cluster with any known *Lasiodiplodia* species (Fig. 8).

269 Results of this study showed that *A. longipes* (16%), *L. iraniensis* (10%) and *N.*
270 *batangarum* (10%) were the most prevalent fungal species isolated from *N. cochenillifera*
271 com CBS symptoms in Pernambuco, followed by *C. siamense* (8 %) and *Alternaria* sp. (ex *N.*
272 *gomphrenae*), *F. lunatum* and *N. sphaerica* (6 %). Other 13 fungal species presented
273 frequencies between 2 and 4% (Fig. 9).

274

275 **Pathogenicity and aggressiveness on detached cladode**

276

277 All isolates were pathogenic to detached cladodes of *N. cochenillifera* with visible lesions 11
278 days after inoculation. The symptoms consisted of circular lesions that were necrotic and
279 initially brown, in some isolates turning dark brown to black with time. Isolates of *Fusarium*
280 showed abundant sporulation on the surface of lesions. Some isolates of *Lasiodiplodia* and
281 *Neofusicoccum* developed a gummy exudate, initially yellow and then from gray to black,
282 covering the lesion (Fig. 10). There were significant differences ($P \leq 0.05$) in diameter of

283 lesions produced by the different fungal species. The longest lesions were produced by *L.*
284 *iraniensis* and *F. lunatum* (14.5 mm and 14.3 mm, respectively), which were thus considered
285 to be the most aggressive species. The smallest lesions were produced by *F. verticillioides*
286 (3.8 mm), differing significantly from each other and was considered the least aggressive
287 species. The others species presented intermediate aggressiveness, with lesions varying from
288 6.3 mm to 9.9 mm (Fig. 11).

289

290 **Discussion**

291

292 The CBS was detected for the first time in *N. cochenillifera* fields of Pernambuco state
293 (northeastern Brazil) in 2001, and until recently its etiology was attributed exclusively to *A.*
294 *alternata* (= *A. tenuis* Nees) (Lima *et al.*, 2011; Barbosa *et al.*, 2012). Other previous studies
295 of the disease were made in the genus *Opuntia*, based on the morphology and sequence data
296 of the ITS region, reporting several species of different genera as pathogens. This work is the
297 first study of fungal species associated with CBS in *N. cochenillifera* worldwide that
298 combines a phylogenetic approach based on multilocus sequence with morphology and
299 pathology.

300 Twenty species were identified in this study associated with CBS in *N. cochenillifera*, of
301 the genus *Alternaria*: *A. longipes*, *A. tenuissima*, *Alternaria* sp. (ex *Nimbya gomphrenae*);
302 genus *Colletotrichum*: *C. fructicola* and *C. siamense*; genus *Fusarium*: *F. incarnatum*, *F.*
303 *lunatum* and *F. verticillioides*; genus *Lasiodiplodia*: *L. euphorbicola*, *L. iraniensis*, *L.*
304 *pseutheobromae*, *L. theobromae* and *Lasiodiplodia* sp.; genus *Neofusicoccum*: *N.*
305 *batangarum*; genus *Neopestalotiopsis*: *N. australis*, *N. protearum* and *Neopestalotiopsis* sp.;
306 and genus *Nigrospora*: *N. oryzae*, *N. sphaerica* and *Nigrospora* sp.

307 In this work, *A. longipes* was the most frequently isolated species. This species was noticed
308 in 18 plant species worldwide (Farr & Rossman, 2017), but this is the first report causing
309 disease in prickly pear cactus in Brazil and worldwide.

310 *Alternaria tenuissima* and *Alternaria* sp. (ex *N. gomphrenae*) were initially described in
311 two genera of ornamental plants, *Dianthus* and *Gomphrena*, respectively (Farr & Rossman,
312 2017). The first species was described in *O. ficus-indica* causing necrosis of cactus pear
313 cladodes in South Africa (Swart & Kriel, 2002). In this study, *A. tenuissima* and *Alternaria*
314 sp. showed an intermediate level of aggressiveness.

315 *Alternaria alternata* with a cosmopolitan distribution and a large number of hosts (Farr &
316 Rossman, 2017), was found in *O. ficus-indica* in Egypt (Ammar *et al.*, 2004) and Mexico
317 (Flores-Flores *et al.*, 2013). In Brazil, it was reported in *O. ficus-indica* (Souza *et al.*, 2010)
318 and in *N. cochenillifera* (Lima *et al.*, 2011; Barbosa *et al.*, 2012), but it was not detected in
319 this study.

320 *Colletotrichum fructicola* was reported as a pathogen in 28 plant species worldwide (Farr
321 & Rossman, 2017). In Brazil, was registered in *Annona* sp. (Costa *et al.*, 2017), *Malus*
322 *domestica* (Weir *et al.*, 2012), *Mangifera indica* (Lima *et al.*, 2013) and *Manihot esculenta*
323 (Bragança *et al.*, 2016). *Colletotrichum siamense* was reported as a pathogen in 44 plant
324 species worldwide (Farr & Rossman, 2017). In Brazil, was registered in *Coffea* sp. (Nuno
325 Silva *et al.*, 2012) and *Fragaria × ananassa* (Capobiango *et al.*, 2016). Therefore, *C. siamense*
326 and *C. fructicola*, were detected for the first time in Brazil and worldwide causing disease in
327 *N. cochenillifera*.

328 In previous studies, *C. gloeosporioides* was identified as a causal agent of CBS in *O. ficus-*
329 *indica* (Ammar *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2010; Flores-Flores *et al.*, 2013). In this study, *C.*
330 *gloeosporioides* was not found as a pathogen associated to CBS in *N. cochenillifera*.

331 Among the three species of *Fusarium* found in this study, only *F. lunatum* was described
332 in *O. ficus-indica* (Flores-Flores *et al.*, 2013). In this study, *F. lunatum* demonstrated high
333 aggressiveness in *N. cochenillifera*, resembling that observed in *O. ficus-indica* (Flores-Flores
334 *et al.*, 2013). *Fusarium verticillioides* has a large number of hosts, while *F. incarnatum* has a
335 narrower host range (Farr & Rossman, 2017), but neither species was previously recorded
336 reported as a pathogen in *N. cochenillifera*.

337 Other *Fusarium* species previously described causing diseases in *O-ficus indica*, as *F.*
338 *oxysporum* in Brazil (Souza *et al.*, 2010) and in Egypt (Ammar *et al.*, 2004), and *F.*
339 *sporotrichoides* in South Africa (Swart & Kriel 2002), were not detected in this study.

340 *Lasiodiplodia theobromae* with a cosmopolitan distribution, occurring in a large variety of
341 plant hosts (Farr & Rossman, 2017), was described causing CBS in *O. ficus-indica* in Brazil
342 (Souza *et al.*, 2010) and in Egypt (Ammar *et al.*, 2004).

343 This study is the first report worldwide of *L. iraniensis*, *L. pseudotheobromae* and *L.*
344 *euphorbicola* causing CBS in *N. cochenillifera*. These three species had already been
345 described in the semi-arid region of northeastern Brazil causing disease in *Anacardium* spp.
346 (Netto *et al.*, 2017), grapevine (Correia *et al.*, 2016), mango (Marques *et al.*, 2013) and
347 papaya (Netto *et al.*, 2013). *Lasiodiplodia iraniensis* was the second most frequently isolated
348 species and was the most aggressive. The high aggressiveness of this species was also
349 reported in *Anacardium* spp. (Netto *et al.*, 2017). *Lasiodiplodia euphorbicola* and *L.*
350 *pseudotheobromae* showed low frequency of isolation and intermediate aggressiveness.

351 *Lasiodiplodia* sp. formed supported clade (BI: 0.90/ML:43). This species was described
352 only on the basis of molecular data due to failure in sporulation in culture. *Lasiodiplodia* sp.
353 was isolated with low frequency, representing 2% of the isolates and also with a low level of
354 aggressiveness.

355 *Neofusicoccum batangarum* was described by Begoude *et al.* (2010) in *Terminalia*
356 *catappa*, emphasizing that this species can behave as endophytic depending on the
357 environmental conditions. In this study, *N. batangarum* was among the most frequently
358 isolated (10%) and with an intermediate degree of aggressiveness, in agreement with what
359 was reported in *Anacardium* spp. in Brazil (Netto *et al.*, 2017). In the present study,
360 considering the members of the Botryosphaeriaceae family, *N. batangarum* is only surpassed
361 in aggressiveness by *L. iraniensis*.

362 The three species of *Neopestalotiopsis* showed a low frequency of isolation and a low-to-
363 intermediate level of aggressiveness. *Neopestalotiopsis* is a genus recently described
364 (Maharachchikumbura *et al.*, 2014). *Neopestalotiopsis australis* and *N. protearum* causing
365 leaf spots and tip dieback and are recorded in the *Proteaceae* family. The isolates
366 *Neopestalotiopsis* sp. (clade 22) present morphological similarities with *N. australis* but there
367 are geographical variation and a slight distinction in phylogeny, they are tentatively
368 maintained as *Neopestalotiopsis* sp. clade 22 (Maharachchikumbura *et al.*, 2014). However,
369 the clades containing *N. australis* and *Neopestalotiopsis* sp. in the present study were distant,
370 determining differences in the topology of the trees compared to what is shown by
371 Maharachchikumbura *et al.* (2014). According to this author, for future studies it may be
372 necessary to incorporate other genes, to obtain a better separation of species and to increase
373 the support of the clades of this genus.

374 There are many studies that demonstrate the importance of the genus *Nigrospora* as a plant
375 pathogen, seed pathogen and even as an endophytic. However, studies related to
376 characterization based on morphology and molecular data are scarce. In the present study,
377 three species were found, *N. oryzae*, *N. sphaerica* and *Nigrospora* sp. based on the ITS
378 region. Phylogenetic analysis reveals high clade support for the three species. *Nigrospora*
379 *oryzae* was described as endophytic in *Opuntia stricta* in Australia (Fisher *et al.*, 1994), while

380 *N. sphaerica* as endophytic (Bezerra *et al.*, 2012) and pathogenic (Souza *et al.*, 2010) in *O.*
381 *ficus-indica* in Brazil. This is the first report of this species associated with *N. cochenillifera*
382 worldwide. The *Nigrospora* species shows an intermediate level of aggressiveness.

383 In summary, this paper reports 20 fungal species associated with *N. cochenillifera* in
384 Brazil. *Alternaria alternata*, until recently considered the only causal agent of CBS in *N.*
385 *cochenillifera* in this country, was not found in this study. *Alternaria longipes*, although the
386 species most frequently observed on this host, is not the most aggressive species. All species
387 showed potential to cause CBS in *N. cochenillifera*, but *L. iraniensis* and *F. lunatum* showed
388 the highest aggressiveness to this host. These results indicate the great diversity of fungal
389 species involved in the development of CBS in *N. cochenillifera*, and are relevant as a basis
390 for future epidemiological studies and for the implementation of effective disease
391 management measures.

392

393 **Acknowledgments**

394

395 This study was financed by Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária (INTA,
396 Argentina) and by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES,
397 Brasil). The first author was partially supported by a doctor scholarship of the INTA. M. P. S.
398 Câmara, and S. J. Michereff also acknowledge the Conselho Nacional de Desenvolvimento
399 Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil) research fellowship.

400

401 **References**

402

403 Alves A, Crous PW, Correia A, Phillips AJL, 2008. Morphological and molecular data reveal
404 cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity* **28**, 1–13.

- 405 Ammar MI, Shltout AB, Kamhawy MA, 2004. Cladode and fruit rots of prickly pear (*Opuntia ficus-*
406 *indica* L. Mill.) in Egypt. *Egyptian Journal of Phytopathology* **32**, 119–28.
- 407 Ayala-Escobar V, Yáñez-Morales MJ, Braun U, Groenewald JZ, Crous PW, 2006.
408 *Pseudocercospora opuntiae* sp. nov., the causal organism of cactus leaf spot in Mexico.
409 *Fungal Diversity* **21**: 1–9.
- 410 Barbosa RS, Calvalcanti VAL, Lopes EB, Araújo E, 2012. Doenças da palma forrageira. In:
411 Lopes EB, ed. *Palma Forrageira: Cultivo, Uso Atual e Perspectivas de Utilização no*
412 *Semiárido Nordestino*. João Pessoa, Brazil: EMEPA/FAEPA, 81–98.
- 413 Barnett HB, Hunter BB, 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4th ed. St. Paul, USA:
414 APS Press.
- 415 Begoude BAD, Slippers B, Wingfield MJ, Roux J, 2010. Botryosphaeriaceae associated with
416 *Terminalia catappa* in Cameroon, South Africa and Madagascar. *Mycological Progress*
417 **9**, 101–123.
- 418 Bellemain E, Carlsen ET, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P and Kausserud, H, 2010.
419 ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential
420 PCR biases. *BMC Microbiology* **10**, 1–9.
- 421 Berbee ML, Pirseyedi M, Hubbard S, 1999. *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of
422 known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate
423 dehydrogenase gene sequences. *Mycologia* **91**, 964–77.
- 424 Bezerra JD, Santos MG, Svedese VM, Lima DM, Fernandes MJ, Paiva LM, Souza-Motta
425 CM, 2012. Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill.
426 (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. *World Journal of*
427 *Microbiology and Biotechnology* **28**, 1989–95.

- 428 Bragança CAD, Silva LL, Haddad F, Oliveira SAS, 2016. First report of *Colletotrichum*
429 *fruticola* causing anthracnose in cassava (*Manihot esculenta*) in Brazil. *Plant Disease*
430 **100**, 857–8.
- 431 Cannon PF, Damm U, Johnston PR, Weir B S, 2012. *Colletotrichum* current status and future
432 directions. *Studies in Mycology* **73**, 181–213.
- 433 Capobiango NP, Pinho DB, Zambolim L, Pereira OL, Lopes UP, 2016. Anthracnose on
434 strawberry fruits caused by *Colletotrichum siamense* in Brazil. *Plant Disease* **100**, 859.
- 435 Carbone I, Kohn LM, 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in
436 filamentous ascomycetes. *Mycologia* **91**, 553–6.
- 437 Conforto C, Lima NB, Garcete-Gómez JM, Câmara MPS, Michereff SJ, 2016. First report of
438 cladode brown spot in cactus prickly pear caused by *Neofusicoccum batangarum* in
439 Brazil. *Plant Disease* **100**, 1238.
- 440 Correia KC, Silva MA, Morais Junior MA, Armengol J, Phillips AJL, Camara MPS,
441 Michereff SJ, 2016. Phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species
442 associated with dieback of table grape in the main Brazilian exporting region. *Plant*
443 *Pathology* **65**, 92–103.
- 444 Costa JFO, Ramos-Sobrinho R, Chaves TP, Silva JRA, Pinho DB, Assunção IP, Lima GSA,
445 2017. First report of *Colletotrichum fruticola* causing anthracnose on *Annona* leaves in
446 Brazil. *Plant Disease* **101**, 386-7.
- 447 Crous PW, Verkley GJM, Groenewald JZ, Samson RA, 2009. *Fungal Biodiversity*. Utrecht,
448 The Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.
- 449 Dodge BO, 1938. A further study of the dry-rot disease of *Opuntia*. *Mycologia* **30**, 82-96.
- 450 Doyle JJ, Doyle JL, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf
451 tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**,11–5.

- 452 Farr DF, Rossman AY, 2017. Fungal database: Fungus-host distributions. [[http://nt.ars-](http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/fungushost/fungushost.cfm)
453 [grin.gov/fungaldatabases/fungushost/fungushost.cfm](http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/fungushost/fungushost.cfm)]. Accessed 18 January 2017.
- 454 Felsenstein J, 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the
455 bootstrap. *Evolution* **39**, 783–91.
- 456 Ferreira MA, Bispo SV, Rocha Filho RR, Urbano SA, Costa CTF, 2012. The use of cactus as forage
457 for dairy cows in semi-arid regions of Brazil. In: Konvalina P, ed. *Organic Farming and Food*
458 *Production*. Rijeka, Croatia: InTech, 169–89.
- 459 Fisher PJ, Sutton BC, Petrini, LE, Petrini O, 1994. Fungal endophytes from *Opuntia stricta*: a
460 first report. *Nova Hedwigia* **59**, 195–200.
- 461 Flores-Flores R, Velázquez-del Valle MG, León-Rodríguez R, Flores-Moctezuma HE,
462 Hernández-Lauzardo AN, 2013. Identification of fungal species associated with cladode
463 spot of prickly pear and their sensitivity to chitosan. *Journal of Phytopathology* **161**, 544-
464 52.
- 465 Gherbawy Y, Voigt K, 2010. *Molecular identification of fungi*. Berlin, Germany: Springer-
466 Verlag.
- 467 Glass NL, Donaldson G, 1995. Development of primer sets designed for use with PCR to
468 amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied & Environmental*
469 *Microbiology* **61**, 1323–30.
- 470 Goh TK, 1999. Single-spore isolation using a handmade glass needle. *Fungal Diversity* **2**, 47–
471 63.
- 472 Granata G, 2001. Doenças bióticas e abióticas. In: Barbera G, Inglese P, Pimienta-Barrios E,
473 eds. *Agroecologia, Cultivo e Usos da Palma Forrageira*. Rome, Italy: FAO/Sebrae, 112–
474 22.
- 475 Hyde KD, Nilsson RH, Alias SA, Ariyawansa HA, Blair JE, Cai L, De Cock A, Dissanayake
476 AJ, Glockling SL, Goonasekara ID, Gorczak M, Hahn M, Jayawardena RS, Al Van Kan
477 J, Laurence MH, Lévesque CA, Li X, Liu J-K, Maharachchikumbura SSN, Manamgoda

- 478 DS, Martin FN, Mckenzie EHC, Mctaggart AR, Mortimer PE, Nair PVR, Pawłowska J,
479 Rintoul TL, Shivas RG, Spies CFJ, Summerell BA, Taylor PWJ, Terhem RB, Udayanga
480 D, Vaghefi N, Walther G, Wilk M, Wrzosek M, Xu J-C, Yan J, Zhou N, 2014. One stop
481 shop: backbones trees for important pytopathogenic genera: I. *Fungal Diversity* **67**, 21–
482 125.
- 483 Katoh K, Standley DM, 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7:
484 improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 772–80.
- 485 Kumar S, Stecher G, Tamura K, 2016. Mega7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis
486 version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* **33**, 1870–4.
- 487 Levente K, 2012. Limits of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS)
488 sequences as species barcodes for fungi. *PNAS* **109**, E1811.
- 489 Lima GSA, Assunção IP, Martins RB, Santos HV, Michereff SJ, 2011. Development and
490 validation of a standard area diagram set for assessment of *Alternaria* spot on the
491 cladodes of the prickly pear cactus. *Journal of Plant Pathology* **93**, 691–5.
- 492 Lima NB, Batista MVDA, Morais Junior MA, Barbosa MA, Michereff SJ, Hyde KD, Câmara
493 MP, 2013. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in
494 northeastern Brazil. *Fungal Diversity* **61**, 75–88.
- 495 Liu YJ, Whelen S, Hall BD, 1999. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence
496 from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution* **16**, 1799–1808.
- 497 Lopes EB, Santos DCE, Vasconcelos MF, 2012. Cultivo da palma forrageira. In: Lopes EB,
498 ed. *Palma Forrageira: Cultivo, Uso Atual e Perspectivas de Utilização no Semiárido*
499 *Nordestino*. João Pessoa, Brazil: EMEPA/FAEPA, 21–60.
- 500 Maharachchikumbura SSN, Hyde KD, Groenewald JZ, Xu J, Crous PW, 2014.
501 *Pestalotiopsis* revisited. *Studies in Mycology* **79**, 121–86.

- 502 Marques WM, Lima NB, Morais Junior MA, Barbosa MAG, Souza BO, Michereff SJ,
503 Phillips AJL, Camara MPS, 2013. Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in
504 Brazil. *Fungal Diversity* **61**, 181–93.
- 505 Miller MA, Pfeifer W, Schwartz T, 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for
506 inference of large phylogenetic trees. In: 2010 Gateway Computing Environments
507 Workshop (GCE). [<http://ieeexplore.ieee.org/stamp/stamp.jsp?arnumber=5676129>].
508 Accessed 11 November 2016.
- 509 Netto MSB, Lima WG, Correia KC, da Silva CFB, Thon M, Martins RB, Miller RNG,
510 Michereff SJ, Câmara MPS, 2017. Analysis of phylogeny, distribution, and pathogenicity
511 of Botryosphaeriaceae species associated with gummosis of *Anacardium* in Brazil, with a
512 new species of *Lasiodiplodia*. *Fungal Biology*. Accepted for publication. DOI:
513 <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2016.07.006>.
- 514 Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, Larsson K-H, 2008. Intraspecific ITS
515 variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and
516 its implications for molecular species identification. *Evolutionary Bioinformatics* **4**, 193–
517 201.
- 518 Nuno Silva D, Talhinas P, Varzea VMP, Cai L, Salgueiro Paulo O, Batista D, 2012.
519 Application of the *Apn2/MAT* locus to improve the systematics of the *Colletotrichum*
520 *gloeosporioides* complex: an example from coffee (*Coffea spp.*) hosts. *Mycologia* **104**,
521 396–409.
- 522 Nylander JAA, 2004. *MrModeltest v2*. Program distributed by the author. Uppsala, Sweden:
523 Uppsala University, Evolutionary Biology Centre.
- 524 Page RDM, 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal
525 computers. *Computer Applications in the Biosciences* **12**, 357–8.
- 526 Rayner RW, 1970. *A Mycological Colour Chart*. Kew, UK: Commonwealth Mycological
527 Institute.

- 528 Rehner SA, 2001. Primers for Elongation Factor 1-alpha (EF1-alpha).
529 [<http://www.aftol.org/pdfs/EF1primer.pdf>]. Accessed 15 February 2015.
- 530 Rojas EI, Rehner SA, Samuels GJ, Van Bael SA, Herre EA, Cannon P, Chen R, Pang J,
531 Wang R, Zhang I, Peng IQ, Sha T, 2010 *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated
532 with *Theobroma cacao* and other plants in Panama: multilocus phylogenies distinguish
533 host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycologia* **102**, 1318–38.
- 534 Ronquist F, Huelsenbeck JP, 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed
535 models. *Bioinformatics* **19**, 1572–4.
- 536 Schoch C L, SeiferT, KA. Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, 2012.
537 Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode
538 marker for Fungi. *PNAS*, **109**, 6241–6.
- 539 Silva-Hughes AF, Wedge DE, Cantrell CL, Carvalho CR, Pan Z, Moraes RM, Madoxx VL,
540 Rosa LH, 2015. Diversity and antifungal activity of the endophytic fungi associated with
541 the native medicinal cactus *Opuntia humifusa* (Cactaceae) from the United States.
542 *Microbiological Research* **174**, 67–77.
- 543 Slippers B, Crous PW, Denman S, Coutinho TA, Wingfield BC, Wingfield MJ, 2004.
544 Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several
545 species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia* **96**, 83–101.
- 546 Souza AEF, Nascimento LC, Araújo E, Lopes EB, Souto FM, 2010. Ocorrência e
547 identificação dos agentes etiológicos de doenças em palma forrageira (*Opuntia ficus-*
548 *indica* Mill.) no semiárido paraibano. *Biotemas*, **23**, 11–20.
- 549 Staden R, Beal KF, Bonfield JK, 1998. The Staden package, 1998. In: Misener S, Krawetz
550 AS, eds. *Bioinformatics Methods and Protocols*. New York, USA: Academic Press,
551 115–30.

- 552 Stamatakis A, 2006. RAxML-VI-HPC: Maximum Likelihood-based phylogenetic analyses
553 with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* **22**, 2688–90.
- 554 Summerell BA, Salleh B, Leslie JF, 2003. A utilitarian approach to identifying *Fusarium* species.
555 *Plant Disease* **87**, 117–28.
- 556 Sung GH, Sung JM, Hywel-Jones NL, Spatafora JW, 2007. A multi-gene phylogeny of
557 *Clavicipitaceae* (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a
558 combinational bootstrap approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **44**, 1204–23.
- 559 Suryanarayanan T, Wittlinger SK, Faeth SH, 2005. Endophytic fungi associated with cacti in
560 Arizona. *Mycological Research* **109**, 635–9.
- 561 Swart WJ, Kriel WM, 2002. Pathogens associated with necrosis of cactus pear cladodes in
562 South Africa. *Plant Disease* **86**, 693.
- 563 Tuite J, 1969. *Plant Pathological Methods - Fungi and Bacteria*. Minneapolis, USA: Burgess
564 Publishing.
- 565 Weir BS, Johnston PR, Damm U, 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex.
566 *Studies in Mycology* **73**, 115-80.
- 567 White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal
568 ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White
569 TJ, eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York, USA:
570 Academic Press, 315–22.

1 **Table 1** Gene regions and primers used in this study

2

Genus	Gene region	Primers	Reference
<i>Alternaria</i>	EF1- α	EF1-728F and EF1-986R	Carbone and Kohn, 1999.
	RPB2	RPB2-5F2 and RPB2-7cR	Sung <i>et al.</i> , 2007; Liu <i>et al.</i> , 1999
	GPDH	gpd1 and gpd2	Berbee <i>et al.</i> , 1999
<i>Colletotrichum</i>	ITS	ITS-1and ITS-4	White <i>et al.</i> , 1990.
	β -tubulin	Bt2a and Bt2b	Glass and Donaldson, 1995.
	ApMAT (apn2mat/IGS)	CgDLF6 and CgMAT1_F2	Rojas <i>et al.</i> , 2010.
<i>Fusarium</i>	RPB2	RPB2-5F2 and RPB2-7cR	Sung <i>et al.</i> , 2007; Liu <i>et al.</i> , 1999
<i>Lasiodiplodia</i>	ITS	ITS-1and ITS-4	White <i>et al.</i> , 1990
	EF1- α	EF1-688F and EF1-1251R; EF1-728F and EF1-986R	Alves <i>et al.</i> , 2008; Carbone and Kohn, 1999
<i>Neofusicoccum</i>	ITS	ITS-1and ITS-4	White <i>et al.</i> , 1990
	EF1- α	EF1-688F and EF1-1251R; EF1-728F and EF1-986R	Alves <i>et al.</i> , 2008; Carbone and Kohn, 1999
<i>Neopestalotiopsis</i>	ITS	ITS-1and ITS-4	White <i>et al.</i> , 1990.
	β -tubulin	Bt2a and Bt2b	Glass and Donaldson, 1995
	EF1- α	EF1-526 F and EF1-1567R	Rehner, 2001
<i>Nigrospora</i>	ITS	ITS-1and ITS-4	White <i>et al.</i> , 1990

3

Table 2 Isolates subjected to DNA analysis in this study including details of culture collection, host, location and GenBank numbers accessions

Species	Culture Accession No. ^a	Host/ Substrate	Location	GenBank Accession No. ^b					
				ITS	EF1- α	RPB2	GPDH	TUB2	ApMat
<i>Alternaria alternantherae</i>	CBS 124392	<i>Solanum melongena</i>	China		KC584633	KC584374	KC584096		
<i>A. alternata</i>	CBS 916.96	<i>Arachis hypogaea</i>	India		KC584634	KC584375	AY278808		
<i>A. arborescens</i>	CBS 102605	<i>Lycopersicon esculentum</i>	USA		KC584636	KC584377	AY278810		
<i>A. daucifolii</i>	CBS 118812	<i>Daucus carota</i>	USA		KC584652	KC584393	KC584112		
<i>A. gaisen</i>	CBS 632.93	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Japan		KC584658	KC584399	KC584116		
<i>A. limoniasperae</i>	CBS 102595	<i>Citrus jambhiri</i>	USA		KC584666	KC584408	AY562411		
<i>A. longipes</i>	CBS 540.94	<i>Nicotiana tabacum</i>	USA		KC584667	KC584409	AY278811		
<i>A. longipes</i>	CMM 0245	<i>Nopalea cochenillifera</i>	Brazil		KY549582	KY549613	KY549602		
<i>A. longipes</i>	CMM 1195	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil		KY549583	KY549614	KY549603		
<i>A. longipes</i>	CMM 1376	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil		KY549586	KY549617	KY549606		
<i>A. longipes</i>	CMM 1377	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil		KY549587	KY549618	KY549607		
<i>A. longipes</i>	CMM 1379	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil		KY549588	KY549619	KY549608		
<i>A. longipes</i>	CMM 1380	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil		KY549589	KY549620	KY549609		
<i>A. longipes</i>	CMM 1381	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil		KY549581	KY549621	KY549610		
<i>A. longipes</i>	CMM 1382	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil		KY549590	KY549622	KY549611		
<i>A. tenuissima</i>	CBS 918.96	<i>Dianthus</i> sp.	UK		KC584693	KC584435	AY278809		
<i>A. tenuissima</i>	CMM 1371	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil		KY549584	KY549615	KY549604		
<i>A. tenuissima</i>	CMM 1373	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil		KY549585	KY549616	KY549605		
<i>Clathrospora heterospora</i>	CBS 175.52	<i>Juncus mertensianus</i>	USA		KC584703	KC584445	KC584151		
<i>Comoclathris magna</i>	CBS 174.52	<i>Anemone occidentalis</i>	USA		KC584704	DQ677964	KC584152		
<i>Alternaria gomphrenae</i>	CBS 108.27	<i>Gomphrena globosa</i>	-		KC584727	KC584468	KC584162		
<i>A. gomphrenae</i>	CMM 1383	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil		KY549591	KY549623	KY549600		
<i>A. gomphrenae</i>	CMM 1386	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil		KY549592	KY549624	KY549612		
<i>A. gomphrenae</i>	CMM 1389	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil		KY549593	KY549625	KY549601		
<i>Colletotrichum alatae</i>	ICMP 17919	<i>Dioscorea alata</i>	India	JX010190				JX010383	KC888932

Table 2 (continued)

Species	Culture Accession No. ^a	Host/ Substrate	Location	GenBank Accession No. ^b					
				ITS	EF1- α	RPB2	GPDH	TUB2	ApMat
<i>C. alienum</i>	ICMP 12071	<i>Malus domestica</i>	New Zealand	JX010251				JX010411	KC888927
<i>C. aotearoa</i>	ICMP 18537	<i>Coprosma</i> sp.	New Zealand	JX010205				JX010420	KC888930
<i>C. asianum</i>	ICMP 18580	<i>Coffea arabica</i>	Thailand	FJ972612				JX010406	FR718814
<i>C. clidemiae</i>	ICMP 18658	<i>Clidemia hirta</i>	USA, Hawaii	JX010265				JX010438	KC888929
<i>C. comunis</i>	MTCC 11696	<i>Citrus</i> sp.	Chandigarh	KC790977				KF452029	KC790720
<i>C. cordylinicola</i>	ICMP 18579	<i>Cordyline fruticosa</i>	Thailand	JX010226				JX010440	JQ899274
<i>C. dianesei</i>	CBS 133251	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	USA	JX145144				JX145195	JX145313
<i>C. endomangiferae</i>	CMM 3814	<i>Mangifera indica</i>	Brazil	KC702994				KM404170	KJ155453
<i>C. fruticola</i>	ICMP 18581	<i>C. arabica</i>	Thailand	JX010165				JX010405	JQ807838
<i>C. fruticola</i>	CMM 2159	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil	KX129709				KX129714	KX129719
<i>C. fructivorum</i>	CBS 133251	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	USA	JX145145				JX145196	JX145300
<i>C. gloeosporioides</i>	ICMP 17821	<i>Citrus sinensis</i>	Italy	JX010152				JX010445	JQ807843
<i>C. horii</i>	CMP 10492	<i>Diospyros kaki</i>	Japan	GQ329690				JX010450	JQ807840
<i>C. hymenocallidis</i>	ICMP 18642	<i>Hymenocallis americana</i>	China	JX010278				JX010410	JQ807842
<i>C. jasminisambac</i>	ICMP 19118	<i>Jasminum sambac</i>	Vietnam	HM131511				JX010415	JQ807841
<i>C. kahawae</i>	ICMP 17816	<i>C. arabica</i>	Kenya	JX010231				JX010444	JQ899282
<i>C. musae</i>	ICMP 19119	<i>Musa</i> sp.	USA	JX010146				HQ596280	KC888926
<i>C. nupharicola</i>	ICMP 18187	<i>Nuphar lutea</i> subsp. <i>polysepala</i>	USA	JX010187				JX010398	JX145319
<i>C. psidii</i>	ICMP 19120	<i>Psidium</i> sp.	Italy	JX010219				JX010443	KC888931
<i>C. queenslandicum</i>	ICMP 1778	<i>Carica papaya</i>	Australia	JX010276				JX010414	KC888928
<i>C. rhexiae</i>	CBS 133134	<i>Rhexia virginica</i>	USA	JX145128				JX145179	JX145290
<i>C. salsolae</i>	ICMP 19051	<i>Salsola tragus</i>	Hungary	JX010242				JX010403	KC888925
<i>C. siamense</i>	ICMP 18578	<i>C. arabica</i>	Thailand	JX010171				JX010404	JQ899289
<i>C. siamense</i>	CMM 2118	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil	KX129708				X129713	KX129708

Table 2 (continued)

Species	Culture Accession No. ^a	Host/ Substrate	Location	GenBank Accession No. ^b					
				ITS	EF1- α	RPB2	GPDH	TUB2	ApMat
<i>C. siamense</i>	CMM 2166	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil	KX129710				KX129715	KX129720
<i>C. siamense</i>	CMM 2207	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil	KX129711				KX129716	KX129711
<i>C. siamense</i>	CMM 2228	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil	KX129712				KX129717	KX129722
<i>C. temperatum</i>	CBS 133122	<i>V. macrocarpon</i>	USA	JX145159				JX145211	JX145298
<i>C. theobromicola</i>	ICMP 18649	<i>Theobroma cacao</i>	Panama	JX010294				JX010447	KC790726
<i>C. tropicale</i>	ICMP 18653	<i>T. cacao</i>	Panama	JX010264				JX010407	KC790728
<i>C. xanthorrhoeae</i>	ICMP 17903	<i>Xanthorrhoea preissii</i>	Australia	JX010261				KC790913	KC790689
<i>F. ambrosium</i>	NRRL 20438	-	-					JX171584	
<i>F. anguioides</i>	NRRL 25385	-	-					JX171624	
<i>F. armeniacum</i>	NRRL 6227	-	-					JX171560	
<i>F. asiaticum</i>	NRRL 13818	-	-					JX171573	
<i>F. aywerte</i>	NRRL 25410	-	-					JX171626	
<i>F. babinda</i>	NRRL 25539	-	-					JX171632	
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL 22566	-	-					JX171613	
<i>F. beomiforme</i>	NRRL 25174	-	-					JX171619	
<i>F. burgessii</i>	RBG 5319	-	-					HQ646392	
<i>F. circinatum</i>	NRRL 25331	-	-					JX171623	
<i>F. cf. compactum</i>	NRRL 13829	-	-					JX171574	
<i>F. commune</i>	NRRL 28387	-	-					JX171638	
<i>F. concolor</i>	NRRL 13459	-	-					JX171569	
<i>F. culmorum</i>	NRRL 25475	-	-					JX171628	
<i>F. dimerum</i>	NRRL 20691	-	-					JX171592	
<i>F. equiseti</i>	NRRL 13402	-	-					JX171566	
<i>F. falciforme</i>	NRRL 43529	-	-					JX171653	
<i>F. flocciferum</i>	NRRL 25473	-	-					JX171627	
<i>F. foetens</i>	NRRL 38302	-	-					JX171652	
<i>F. fujikuroi</i>	NRRL 13566	-	-					JX171570	
<i>F. gaditjirri</i>	NRRL 45417	-	-					JX171654	

Table 2 (continued)

Species	Culture Accession No. ^a	Host/ Substrate	Location	GenBank Accession No. ^b					
				ITS	EF1- α	RPB2	GPDH	TUB2	ApMat
<i>F. graminearum</i>	NRRL 31084	-	-			JX171644			
<i>F. guttiforme</i>	NRRL 22945	-	-			JX171618			
<i>F. heterosporum</i>	NRRL 20693	-	-			JX171594			
<i>F. hostae</i>	NRRL 29889	-	-			JX171640			
<i>F. incarnatum</i>	NRRL 31160	-	-			GQ915494			
<i>F. incarnatum</i>	CMM 1345	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil			KY549629			
<i>F. incarnatum</i>	CMM 1349	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil			KY549630			
<i>F. inflexum</i>	NRRL 20433	-	-			JX171583			
<i>F. lacertarum</i>	NRRL 20423	-	-			JX171581			
<i>F. langsethiae</i>	NRRL 54940	-	-			JX171662			
<i>F. lateritium</i>	NRRL 13622	-	-			JX171571			
<i>F. longipes</i>	NRRL 13368	-	-			JX171562			
<i>F. lunatum</i>	NRRL 36168	-	-			JX171648			
<i>F. lunatum</i>	CMM 1284	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil			KY549626			
<i>F. lunatum</i>	CMM 1288	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil			KY549627			
<i>F. lunatum</i>	CMM 1293	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil			KY549628			
<i>F. lyarnte</i>	NRRL 54252	-	-			JX171661			
<i>F. mangiferae</i>	NRRL 25226	-	-			JX171622			
<i>F. miscanthi</i>	NRRL 26231	-	-			JX171634			
<i>F. nisikadoi</i>	NRRL 25179	-	-			JX171620			
<i>F. nurragi</i>	NRRL 36452	-	-			JX171650			
<i>Fusarium sp.</i>	NRRL 13444	-	-			JX171568			
<i>Fusarium sp.</i>	NRRL 28578	-	-			JX171639			
<i>Fusarium sp.</i>	NRRL 13338	-	-			JX171561			
<i>F. oxysporum</i>	NRRL 25387	-	-			JX171625			
<i>F. phaseoli</i>	NRRL 22276	-	-			JX171608			
<i>F. poae</i>	NRRL 13714	-	-			JX171572			
<i>F. proliferatum</i>	NRRL 22944	-	-			JX171617			

Table 2 (continued)

Species	Culture Accession No. ^a	Host/ Substrate	Location	GenBank Accession No. ^b					
				ITS	EF1- α	RPB2	GPDH	TUB2	ApMat
<i>F. pseudograminearum</i>	NRRL 28062	-	-			JX171637			
<i>F. redolens</i>	NRRL 22901	-	-			JX171616			
<i>F. sambucinum</i>	NRRL 22187	-	-			JX171606			
<i>F. sambucinum</i>	NRRL 20472	-	-			JX171586			
<i>F. solani</i>	NRRL 45880	-	-			JX171655			
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL 22436	-	-			JX171610			
<i>F. sporotrichioides</i>	NRRL 3299	-	-			JX171558			
<i>F. subglutinans</i>	NRRL 22016	-	-			JX171599			
<i>F. stilbioides</i>	NRRL 20429	-	-			JX171582			
<i>F. thapsinum</i>	NRRL 22045	-	-			JX171600			
<i>F. torulosum</i>	NRRL 22748	-	-			JX171615			
<i>F. tricinctum</i>	NRRL 25481	-	-			JX171629			
<i>F. venenatum</i>	NRRL 22196	-	-			JX171607			
<i>F. verticilloides</i>	NRRL 20956	-	-			JX171598			
<i>F. verticilloides</i>	CMM 1356	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil			KY549631			
<i>F. virguliforme</i>	NRRL 31041	-	-			JX171643			
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL 22632	-	-			JX171614			
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL 52700	-	-			JX171656			
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL 25486	-	-			JX171630			
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL 25184	-	-			JX171621			
<i>Fusarium</i> sp.	RBG 5116	-	-			HQ646395			
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL 25533	-	-			JX171631			
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL 54149	-	-			JX171660			
<i>Lasiodiplodia brasiliense</i>	CMM 4015	<i>M. indica</i>	Brazil	JX464063	JX464049				
<i>L. brasiliense</i>	CMM 4011	<i>Mangifera indica</i>	Brazil	JX464074	JX464037				
<i>L. caatinguensis</i>	CMM 1325	<i>Citrus sinensis</i>	Brazil	KT154760	KT008006				
<i>L. caatinguensis</i>	IBL 40	<i>Spondias purpurea</i>	Brazil	KT154762	KT154755				
<i>L. citricola</i>	CBS 124707	<i>Citrus</i> sp.	Iran	GU945354	GU945040				

Table 2 (continued)

Species	Culture Accession No. ^a	Host/ Substrate	Location	GenBank Accession No. ^b					
				ITS	EF1- α	RPB2	GPDH	TUB2	ApMat
<i>L. citricola</i>	CBS 124706	<i>Citrus</i> sp.	Iran	GU945353	GU94533				
<i>L. crassispora</i>	CBS 118741	<i>Santalum album</i>	Australia	DQ103550	EU673303				
<i>L. crassispora</i>	CBS 110492	<i>Unknown</i>	Unknown	EF622086	EF622066				
<i>L. egyptiaca</i>	CBS 130992	<i>M. indica</i>	Egypt	JN814397	JN814424				
<i>L. egyptiaca</i>	BOT-29	<i>M. indica</i>	Egypt	JN814401	JN814428				
<i>L. euphorbiicola</i>	CMM 3609	<i>Jatropha curcas</i>	Brazil	KF234543	KF226689				
<i>L. euphorbiicola</i>	CMM 3651	<i>J. curcas</i>	Brazil	KF234553	KF226711				
<i>L. euphorbiicola</i>	CMM 2463	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil	KY569624	KY569613				
<i>L. exigua</i>	CBS 137785	<i>Retama raetam</i>	Tunisia	KJ638317	KJ638336				
<i>L. exigua</i>	BL 184	<i>R. raetam</i>	Tunisia	KJ638318	KJ638337				
<i>L. gilanensis</i>	CBS 124704	<i>Unknown</i>	Iran	GU945351	GU945342				
<i>L. gilanensis</i>	CBS 124705	<i>Unknown</i>	Iran	GU945352	GU945341				
<i>L. gonubiensis</i>	CBS 115812	<i>Syzygium cordatum</i>	South Africa	AY639595	DQ103566				
<i>L. gonubiensis</i>	CBS 116355	<i>S. cordatum</i>	South Africa	AY639594	DQ103567				
<i>L. gravistriata</i>	CMM 4564	<i>Anacardium humile</i>	Brazil	KT250949	KT250950				
<i>L. gravistriata</i>	CMM 4565	<i>A. humile</i>	Brazil	KT250947	KT266812				
<i>L. hormozganensis</i>	CBS 124709	<i>Olea</i> sp.	Iran	GU945355	GU945343				
<i>L. hormozganensis</i>	CBS 124708	<i>M. indica</i>	Iran	GU945356	GU945344				
<i>L. iraniensis</i>	CBS 124710	<i>M. indica</i>	Iran	GU945346	GU945334				
<i>L. iraniensis</i>	CBS 124711	<i>Juglans</i> sp.	Iran	GU945347	GU945335				
<i>L. iraniensis</i>	CMM 2331	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil	KY569617	KY569616				
<i>L. iraniensis</i>	CMM 2338	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil	KY569618	KY569607				
<i>L. iraniensis</i>	CMM 2341	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil	KY569619	KY569608				
<i>L. iraniensis</i>	CMM 2432	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil	KY569620	KY569609				
<i>L. iraniensis</i>	CMM 2459	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil	KY569621	KY569610				
<i>L. macrospora</i>	CMM 3833	<i>J. curcas</i>	Brazil	KF234557	KF226718				

Table 2 (continued)

Species	Culture Accession No. ^a	Host/ Substrate	Location	GenBank Accession No. ^b					
				ITS	EF1- α	RPB2	GPDH	TUB2	ApMat
<i>L. mahajangana</i>	CBS 124925	<i>Terminalia catappa</i>	Madagascar	FJ900597	FJ900643				
<i>L. mahajangana</i>	CBS 124927	<i>T. catappa</i>	Madagascar	FJ900595	FJ900641				
<i>L. margaritacea</i>	CBS 122519	<i>Adansonia gibbosa</i>	Western Australia	EU144050	EU144065				
<i>L. margaritacea</i>	CBS 122065	<i>A. gibbosa</i>	Western Australia	EU144051	EU144066				
<i>L. mediterranea</i>	CBS 137783	<i>Quercus ilex</i>	Italy	KJ638312	KJ638331				
<i>L. mediterranea</i>	CBS 137784	<i>Vitis vinifera</i>	Italy	KJ638311	KJ638330				
<i>L. missouriana</i>	CBS 128311	<i>Vitis</i> sp.	USA	HQ288225	HQ288267				
<i>L. missouriana</i>	CBS 128312	<i>Vitis</i> sp.	USA	HQ288226	HQ288268				
<i>L. parva</i>	CBS 456.78	<i>Cassava field-soil</i>	Colombia	EF622083	EF622063				
<i>L. parva</i>	CBS 494.78	<i>Cassava field-soil</i>	Colombia	EF622084	EF622064				
<i>L. plurivora</i>	CBS 120832	<i>Prunus salicina</i>	South Africa	EF445362	EF445395				
<i>L. plurivora</i>	CBS 121103	<i>V. vinifera</i>	South Africa	AY343482	EF445396				
<i>L. pontae</i>	CMM 1277	<i>Spondias purpurea</i>	Brazil	KT151794	KT151791				
<i>L. pseudotheobromae</i>	CBS 116459	<i>Gmelina arborea</i>	Costa Rica	EF622077	EF622057				
<i>L. pseudotheobromae</i>	CBS 447.62	<i>Citrus aurantium</i>	Suriname	EF622081	EF622060				
<i>L. pseudotheobromae</i>	CMM 2250	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil	KY569615	KY569604				
<i>L. pseudotheobromae</i>	CMM 2285	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil	KY569616	KY569605				
<i>L. pyriformis</i>	CMW 25414	<i>Acacia mellifera</i>	Namibia	EU101307	EU101352				
<i>L. pyriformis</i>	CMW 25415	<i>A. mellifera</i>	Namibia	EU101308	EU101353				
<i>L. rubropurpurea</i>	CBS 118740	<i>Eucalyptus grandis</i>	Australia	DQ103553	EU673304				
<i>L. rubropurpurea</i>	WAC 12536	<i>E. grandis</i>	Australia	DQ103554	DQ103572				
<i>L. subglobosa</i>	CMM 3872	<i>J. curcas</i>	Brazil	KF234558	KF226721				
<i>L. subglobosa</i>	CMM 4046	<i>J. curcas</i>	Brazil	KF234560	KF226723				
<i>L. thailandica</i>	CPC 22755	<i>Phyllanthus acidus</i>	Thailand	KM00633	KM006464				
<i>L. thailandica</i>	CPC 22795	<i>M. indica</i>	Thailand	KJ19367	KJ193681				

Table 2 (continued)

Species	Culture Accession No. ^a	Host/ Substrate	Location	GenBank Accession No. ^b					
				ITS	EF1- α	RPB2	GPDH	TUB2	ApMat
<i>L. theobromae</i>	CBS 164.96	Fruit along coral reef coast	Papua New Guinea	AY640255	AY640258				
<i>L. theobromae</i>	CBS 111530	<i>Unknown</i>	Unknown	EF622074	EF622054				
<i>L. theobromae</i>	CMM 2460	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil	KY569622	KY569611				
<i>L. theobromae</i>	CMM 2462	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil	KY569623	KY569612				
<i>L. venezuelensis</i>	CBS 118739	<i>Acacia mangium</i>	Venezuela	DQ103547	DQ103568				
<i>L. venezuelensis</i>	WAC 12540	<i>A. mangium</i>	Venezuela	DQ103548	DQ103569				
<i>L. viticola</i>	CBS 128313	<i>Vitis</i> sp.	USA	HQ288227	HQ288269				
<i>L. viticola</i>	CBS 128315	<i>Vitis</i> sp.	USA	HQ288228	HQ288270				
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	CMM 2475	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil	KY569625	KY569614				
<i>Diplodia mutila</i>	CBS 136015	<i>Populus alba</i>	Portugal	KJ361838	KJ361830				
<i>D. seriata</i>	CBS 112555	<i>V. vinifera</i>	Portugal	AY259094	AY573220				
<i>Neofusicoccum andinum</i>	CBS 117453	<i>Eucalyptus</i> sp.	Venezuela	AY693976	AY693977				
<i>N. andinum</i>	CBS 117452	<i>Eucalyptus</i> sp	Venezuela	DQ306263	DQ306264				
<i>N. arbuti</i>	CBS 116131	<i>Arbutus menziesii</i>	USA	GU251152	GU251284				
<i>N. arbuti</i>	CBS 117090	<i>Arbutus menziesii</i>	USA	GU251154	GU251286				
<i>N. australe</i>	CMW 6837	<i>Acacia</i> sp.	Australia	AY339262	AY339270				
<i>N. australe</i>	CMW 6853	<i>Sequoiadendron</i>	Australia	AY339263	AY339271				
<i>N. batangarum</i>	CMW 28363	<i>T. catappa</i>	Africa	FJ900607	FJ900653				
<i>N. batangarum</i>	CMW 28315	<i>T. catappa</i>	Africa	FJ900608	FJ800654				
<i>N. batangarum</i>	CMM 1424	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil	KT873814	KU052217				
<i>N. batangarum</i>	CMM 1425	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil	KT878644	KU052218				
<i>N. batangarum</i>	CMM 1426	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil	KT878645	KU052219				
<i>N. batangarum</i>	CMM 1427	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil	KT878646	KU052220				
<i>N. batangarum</i>	CMM 1428	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil	KT878647	KU052221				
<i>N. brasiliense</i>	CMM 1269	<i>M. indica</i>	Brazil	JX513629	JX513609				
<i>N. brasiliense</i>	CMM 1285	<i>M. indica</i>	Brazil	JX513628	JX513608				

Table 2 (continued)

Species	Culture Accession No. ^a	Host/ Substrate	Location	GenBank Accession No. ^b					
				ITS	EF1- α	RPB2	GPDH	TUB2	ApMat
<i>N. cordaticola</i>	CMW 13992	<i>S.cordatum</i>	South Africa	EU821898	EU821868				
<i>N. cordaticola</i>	CMW 14056	<i>S. cordatum</i>	South Africa	EU821903	EU821873				
<i>N. eucalypticola</i>	CBS 115766	<i>E. rossii</i>	Australia	AY615143	AY615135				
<i>N. eucalypticola</i>	CMW 6539	<i>E. rossii</i>	Australia	AY615141	AY615133				
<i>N. eucalyptorum</i>	CMW 10126	<i>E. grandis</i>	South Africa	AF283687	AY236892				
<i>N. eucalyptorum</i>	CBS 115791	<i>E. grandis</i>	South Africa	AF 283686	AY236891				
<i>N. kwambonambiense</i>	CMW 14023	<i>S. cordatum</i>	South Africa	EU821900	EU821870				
<i>N. kwambonambiense</i>	CMW 14140	<i>S. cordatum</i>	South Africa	EU821949	EU821889				
<i>N. luteum</i>	CBS 110299	<i>V.vinifera</i>	Portugal	AY 259091	AY573217				
<i>N. luteum</i>	CBS 110497	<i>V.vinifera</i>	Portugal	EU673311	EU673277				
<i>N. macroclavatum</i>	WAC 12444	<i>Eucalyptus globulus</i>	Australia	DQ093196	DQ093217				
<i>N. macroclavatum</i>	WAC 12446	<i>E. globulus</i>	Australia	DQ093198	DQ093219				
<i>N. mangiferae</i>	CMW 7024	<i>M. indica</i>	Australia	AY615185	DQ093221				
<i>N. mangiferae</i>	CMW 7797	<i>M. indica</i>	Australia	AY 615186	DQ093220				
<i>N. mediterraneum</i>	CBS 121558	<i>V. vinifera</i>	USA	GU799463	GU799462				
<i>N. mediterraneum</i>	PD 312	<i>Eucalyptus</i> sp	Greece	GU251176	GU251308				
<i>N. nonquaesitum</i>	PD 484	<i>Umbellularia</i> sp.	USA	GU251163	GU251295				
<i>N. nonquaesitum</i>	PD 301	<i>V. corymbosum</i>	Chile	GU251185	GU251317				
<i>N. occulatum</i>	CBS 128008	<i>E. grandis</i> hybrid	Australia	EU7301030	EU339509				
<i>N. occulatum</i>	MUCC286	<i>E. pellita</i>	Australia	EU736947	EU339511				
<i>N. parvum</i>	ATCC 58191	<i>Populus nigra</i>	New Zealand	AY236943	AY236888				
<i>N. parvum</i>	CBS 110301	<i>V. vinifera</i>	Portugal	AY259098	AY573221				
<i>N. pennatisporum</i>	WAC 13153	<i>Allocasuarin fraseriana</i>	Australia	EF591925	EF591976				

Table 2 (continued)

Species	Culture Accession No. ^a	Host/ Substrate	Location	GenBank Accession No. ^b					
				ITS	EF1- α	RPB2	GPDH	TUB2	ApMat
<i>N. ribis</i>	CMW 7054	<i>R. rubrum</i>	USA	AF241177	AY236879				
<i>N. ribis</i>	CMW 7772	<i>Ribis</i> sp.	USA	AY236925	AY236877				
<i>N. umdonicola</i>	CMW 14058	<i>S. cordatum</i>	South Africa	EU821934	EU821874				
<i>N. umdonicola</i>	CMW 14060	<i>S. cordatum</i>	South Africa	EU821935	EU821875				
<i>N. viticlavatum</i>	STE-U 5044	<i>V. vinifera</i>	South Africa	AY343381	AY 343342				
<i>N. viticlavatum</i>	STE-U 5041	<i>V. vinifera</i>	South Africa	AY343380	AY343341				
<i>N. vitifusiforme</i>	STE-U 5050	<i>V. vinifera</i>	South Africa	AY343382	AY343344				
<i>N. vitifusiforme</i>	STE-U 5252	<i>V. vinifera</i>	South Africa	AY343383	AY343343				
<i>Botryosphaeria corticis</i>	CBS 119047	<i>V. corymbosum</i>	USA	DQ299245	EU017539				
<i>B. dothidea</i>	CBS 115476	<i>Prunus</i> sp.	Switzerland	AY236949	AY236898				
<i>Neopestalotiopsis aotearoa</i>	CBS 367.54	<i>Canvas</i>	New Zealand	KM199369	KM199526			KM199454	
<i>N. asiatica</i>	MFLUCC 12-0286	Unidentified tree	China	JX398983	JX399049			JX399018	
<i>N. australis</i>	CBS 114159	<i>Telopea</i> sp.	Australia	KM199348	KM199537			KM199432	
<i>N. australis</i>	CMM 1359	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil	KY549598	KY549595			KY549633	
<i>N. chrysea</i>	MFLUCC 12-0261	Dead leaves	China	JX398985	JX399051			JX399020	
<i>N. chrysea</i>	MFLUCC12-0262	Dead plant	China	JX398986	JX399052			JX399021	
<i>N. clavispora</i>	MFLUCC 12-0281	<i>Magnolia</i> sp.	China	JX398979	JX399045			JX399014	
<i>N. clavispora</i>	MFLUCC12-0280	<i>Magnolia</i> sp.	China	JX398978	JX399044			JX399013	
<i>N. cubana</i>	CBS 600.96	Leaf litter	Cuba	KM199347	KM199521			KM199438	
<i>N. ellipsozona</i>	MFLUCC 120283	Dead plant materials	China	JX398980	JX399047			JX399016	

Table 2 (continued)

Species	Culture Accession No. ^a	Host/ Substrate	Location	GenBank Accession No. ^b					
				ITS	EF1- α	RPB2	GPDH	TUB2	ApMat
<i>N. ellipsospora</i>	MFLUCC12-0284	Dead plant materials	Thailand	JX398981	JX399046			JX399015	
<i>N. eucalypticola</i>	CBS 264.37	<i>E. globulus</i>	-	KM199376	KM199551			KM199431	
<i>N. foedans</i>	CGMCC 3.9123	Mangrove plant	China	JX398987	JX399053			JX399022	
<i>N. foedans</i>	CGMCC 3.9202	<i>Calliandra haematocephala</i>	China	JX398988	JX399054			JX399023	
<i>N. formicarum</i>	CBS 362.72	Dead Formicidae	Ghana	KM199358	KM199517			KM199455	
<i>N. honoluluana</i>	CBS 114495	<i>Telopea</i> sp.	USA	KM199364	KM199548			KM199457	
<i>N. honoluluana</i>	CBS 111535	<i>Telopea</i> sp.	USA	KM199363	KM199546			KM199461	
<i>N.javaensis</i>	CBS 257.31	<i>Cocos nucifera</i>	Indonesia	KM199357	KM199543			KM199437	
<i>N. magna</i>	MFLUCC 12-652	<i>Pteridium</i> sp.	France	KF582795	KF582791			KF582793	
<i>N. mesopotamica</i>	CBS 336.86	<i>Pinus brutia</i>	Iraq	KM199362	KM199555			KM199441	
<i>N. mesopotamica</i>	CBS 299.74	<i>Eucalyptus</i> sp.	Turkey	KM199361	KM199541			KM199435	
<i>N. natalensis</i>	CBS 138.41	<i>Acacia mollissima</i>	South Africa	KM199377	KM199552			KM199466	
<i>N. piceana</i>	CBS 394.48	<i>Picea</i> sp.	UK	KM199368	KM199527			KM199453	
<i>N. piceana</i>	CBS 225.30	<i>M. indica</i>	-	KM199371	KM199535			KM199451	
<i>N. protearum</i>	CBS 114178	<i>Leucospermum cuneiforme</i>	Zimbabwe	JN712498	KM199542			KM199463	
<i>N. protearum</i>	CMM 1357	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil	KY549597	KY549594			KY549632	
<i>N. rosae</i>	CBS 101.057	<i>Rosa</i> sp.	New Zealand	KM199359	KM199523			KM199429	
<i>N. rosae</i>	CBS 124745	<i>Paeonia suffruticosa</i>	USA	KM199360	KM199524			KM199430	
<i>N. samarangensis</i>	MFLUCC 12-0233	<i>Syzygium samarangense</i>	Thailand	JQ968609	JQ968611			JQ968610	
<i>N. saprophytica</i>	MFLUCC 12-0282	<i>Magnolia</i> sp.	China	JX398982	JX399048			JX399017	
<i>N. saprophytica</i>	CBS 115452	<i>Litsea rotundifolia</i>	Hong Kong	KM199345	KM199538			KM199433	
<i>N. steyaertii</i>	IMI 192475	<i>Eucalyptus viminalis</i>	Australia	KF582796	KF582792			KF582794	
<i>N. surinamensis</i>	CBS 450.74	Soil <i>Elaeis guineensis</i>	Suriname	KM199351	KM199518			KM199465	

Table 2 (continued)

Species	Culture Accession No. ^a	Host/ Substrate	Location	GenBank Accession No. ^b					
				ITS	EF1- α	RPB2	GPDH	TUB2	ApMat
<i>N. umbrinospora</i>	MFLUCC 12-0285	Unidentified plant	China	JX398984	JX399050			JX399019	
<i>N. zimbabwana</i>	CBS 111495	<i>Leucospermum cunciforme</i>	Zimbabwe	JX556231	KM199456			KM199545	
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. (Clade 4)	CBS 233.79	<i>Crotalaria juncea</i>	India	KM199373	KM199528			KM199464	
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. (Clade 10)	CBS 110.20	-	-	KM199342	KM199540			KM199442	
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. (Clade 15)	CBS 177.25	<i>Dalbergia</i> sp.	-	KM199370	KM199533			KM199445	
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. (Clade 15)	CBS 274.29	<i>C. nucifera</i>	Indonesia	KM199375	KM199534			KM199448	
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. (Clade 15)	CBS 322.76	<i>Camellia</i> sp.	France	KM199366	KM199536			KM199446	
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. (Clade 20)	CBS 164.42	Dune sand	France	KM199367	KM199520			KM199434	
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. (Clade 22)	CBS 119.75	<i>Achras sapota</i>	India	KM199356	KM199531			KM199439	
<i>Neopestalotiopsis</i> sp	CMM 1363	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil	KY549599	KY549596			KY549634	
<i>Neopestalotiopsis</i> sp (Clade 26)	CBS 323.76	<i>Erica gracilis</i>	France	KM199350	KM199550			KM199458	
<i>Neopestalotiopsis</i> sp (Clade 26)	CBS 361.61	<i>Cissus</i> sp.	Netherlands	KM199355	KM199549			KM199460	
<i>Pestalotiopsis trachicarpicola</i>	IFRDCC 2440	<i>Trachycarpus fortunei</i>	China	JQ845947	JQ845946			JQ845945	
<i>P. cocos</i>	CBS 272.29	<i>Cocos nucifera</i>	Indonesia	KM199378	KM199553			KM199467	
<i>P. indica</i>	CBS 459.78	<i>Hibiscus</i> sp.	India	KM199381	KM199560			KM199470	
<i>P. theae</i>	MFLUCC 12-0055	<i>C. sinensis</i>	Thailand	JQ683727	JQ683743			JQ683711	
<i>P. theae</i>	SC011	<i>Camellia sinensis</i>	Thailand	JQ683726	JQ683742			JQ683710	

Table 2 (continued)

Species	Culture Accession No. ^a	Host/ Substrate	Location	GenBank Accession No. ^b					
				ITS	EF1- α	RPB2	GPDH	TUB2	ApMat
<i>Camarops ustulinoides</i>	-			AY908991					
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	-	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Brazil	KC343180					
<i>Valsella melostoma</i>	-	<i>M. domestica</i>	USA	AF191184					
<i>Erysiphe friesii</i>	-	<i>Rhamnus japonica</i>	Japan	AB000939					
<i>Glomerella gloeosporioides</i>	-	-	-	DQ084498					
<i>G. cingulata</i>	-	<i>M. indica</i>	USA	GQ373209					
<i>Hypomyces chrysospermus</i>	-	-	-	HQ604858					
<i>Haloguignardia irritans</i>	-	<i>Cystoseira osmundacea</i>	USA	AY581943					
<i>Magnaporthe salvinii</i>	-	-		JF414838					
<i>Meliola centellae</i>	ATCC MYA-4885	<i>Centella asiatica</i>	Brazil	KC252606					
<i>Microascus cirrosus</i>	-	-	-	JQ906771					
<i>Polystigma amygdalinum</i>	-	<i>Prunus dulcis</i>	-	KC756360					
<i>P. amygdalinum</i>	-	<i>P. dulcis</i>	-	KC756362					
<i>Cercophora caudata</i>	CBS 606.72	-	-	AY999135					
<i>Chaetomium elatum</i>	-	-	-	HF548695					
<i>C. globosum</i>	-	-	-	AY429056					
<i>Gelasinospora tetrasperma</i>	CBS 178.33	-	-	AY681178					
<i>Lasiochaeria ovina</i>	CBS 725.69	-	-	GQ922528					
<i>Neurospora crassa</i>	ICMP 6360	-	-	AY681193					
<i>Sordaria fimicola</i>	-	<i>Holcus lanatus</i>	Spain	FN392318					
<i>Nigrospora oryzae</i>	-	-	China	JN198503					
<i>N. oryzae</i>	-	-	-	EU579801					
<i>N. oryzae</i>	CMM1278	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil	KY569631					
<i>N. oryzae</i>	CMM 1279	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil	KY569632					
<i>N. sphaerica</i>	-	<i>Cyphomyrmex wheeleri</i> nest	USA	HQ608030					
<i>N. sphaerica</i>	-	<i>Cyphomyrmex wheeleri</i> nest	USA	HQ608063					

Table 2 (continued)

Species	Culture Accession No. ^a	Host/ Substrate	Location	GenBank Accession No. ^b					
				ITS	EF1- α	RPB2	GPDH	TUB2	ApMat
<i>N. sphaerica</i>	CMM 0565	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil	KY569626					
<i>N. sphaerica</i>	CMM 0859	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil	KY569627					
<i>N. sphaerica</i>	CMM 0979	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil	KY569628					
<i>Nigrospora sp.</i>	CMM 1214	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil	KY569629					
<i>Nigrospora sp.</i>	CMM 1217	<i>N. cochenillifera</i>	Brazil	KY569630					
<i>Xylaria hypoxylon</i>	-	-	-	DQ491487					

^a ATCC: American Type Culture Collection, Virginia, USA; BL : B.T. Linaldeddu, Università degli Studi di Sassari, Sassari, Italy; BOT :A. M. Ismail, Plant Pathology Research Institute, Giza, Egypt; CBS: Culture collection of the Centraalbureau voor Schimmelcultures, Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands; CGMCC: China General Microbiological Culture Collection Center, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China; CMW: Tree Pathology Cooperative Program, Forestry and Agricultural Biotechnology Institute, University of Pretoria, South Africa; CMM: Culture Collection of Phytopathogenic Fung “Prof. Maria Menezes”, Recife, Brazil; ICMP: International Collection of Micro-organisms from Plants, Landcare Research, New Zealand; IFRDCC: International Fungal Research & Development Centre Culture Collection, China IMI: Culture collection of CABI Europe UK Centre, Egham, UK ; MFLUCC: Mae Fah Luang University Culture Collection, Chiang Rai, Thailand; NRRL: ARS Culture Collection National Center for Agricultural Utilization Research, University Street Peoria; STE-U: Culture collection of the Department of Plant Pathology, University of Stellenbosch, South Africa; WAC, Department of Agriculture, Western Australia Plant Pathogen Collection, South Perth, Western Australia.

^b ITS: partial rDNA-ITS region, EF1- α : translation elongation factor 1-alpha, RPB2: second largest subunit of RNA polymerase, GPDH: glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase , TUB2: partial β -tubulin (tub2) and APmat. ex-type or ex-epitype are emphasized in bold

1 **Table 3** Summary of locus, product and total characters after alignment

2

Genus	Gene regions and product size	Total characters after alignment including gaps
<i>Alternaria</i>	RPB2 (752 pb), EF1- α (219 pb) and GPDH (517 pb)	1488
<i>Colletotrichum</i>	BT (409 pb), ITS (505 pb) and ApMAT (680 pb)	1594
<i>Fusarium</i>	RPB2 (848 pb)	848
<i>Lasiodiplodia</i>	EF1- α (235 pb), ITS (493 pb)	728
<i>Neofusicoccum</i>	EF1- α (284 pb), ITS (502 pb)	786
<i>Neopestalotiopsis</i>	BT (383 pb), ITS (447 pb), EF1- α (377 pb)	1208
<i>Nigrospora</i>	ITS (454 pb)	454

3

4

1 **Table 4** Nucleotide substitution models used in phylogenetic analyses

2

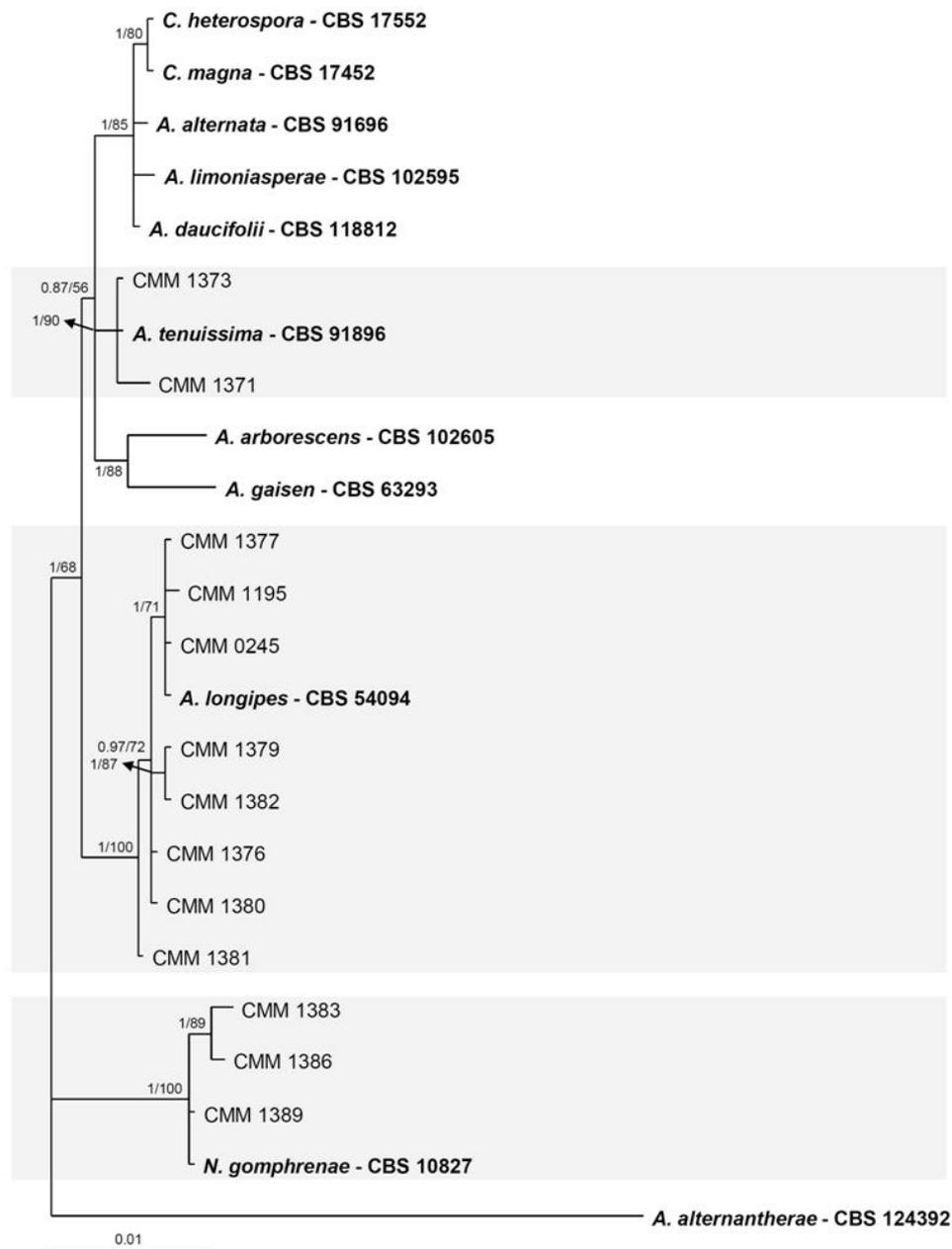
Phylogenetic analysis	Genus	Model
Maximum Likelihood	<i>Alternaria</i>	
	<i>Colletotrichum</i>	
	<i>Fusarium</i>	
	<i>Lasiodiplodia</i>	GTRGAMMA
	<i>Neofusicoccum</i>	
	<i>Neopestalotiopsis</i>	
	<i>Nigrospora</i>	
Bayesian Inference	<i>Alternaria</i>	GTR+I
	<i>Colletotrichum</i>	K80+G
	<i>Fusarium</i>	GTR+I+G
	<i>Lasiodiplodia</i>	GTR+I+G
	<i>Neofusicoccum</i>	HKY+I+G
	<i>Neopestalotiopsis</i>	GTR+I+G
	<i>Nigrospora</i>	SYM+G

3

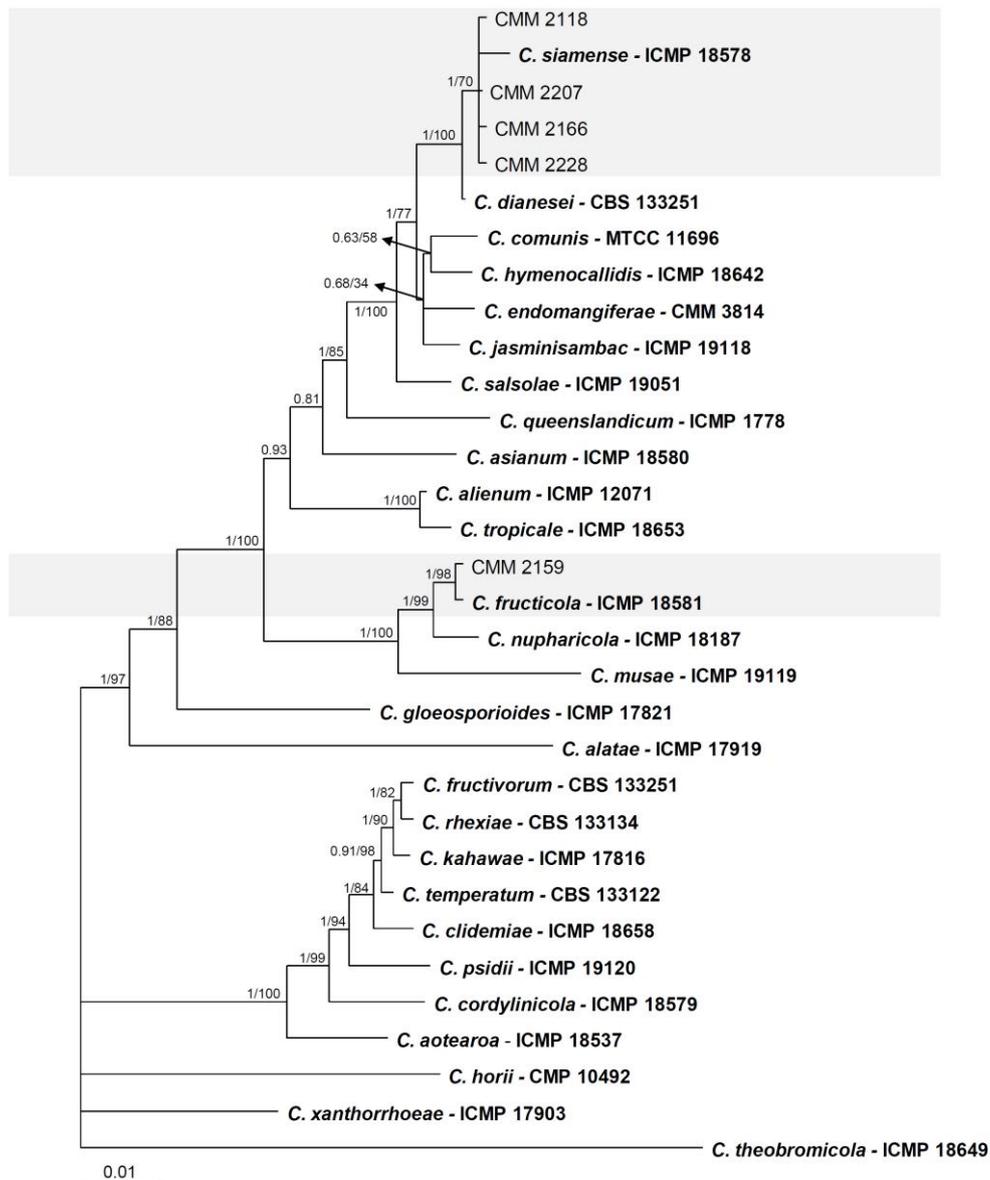


1

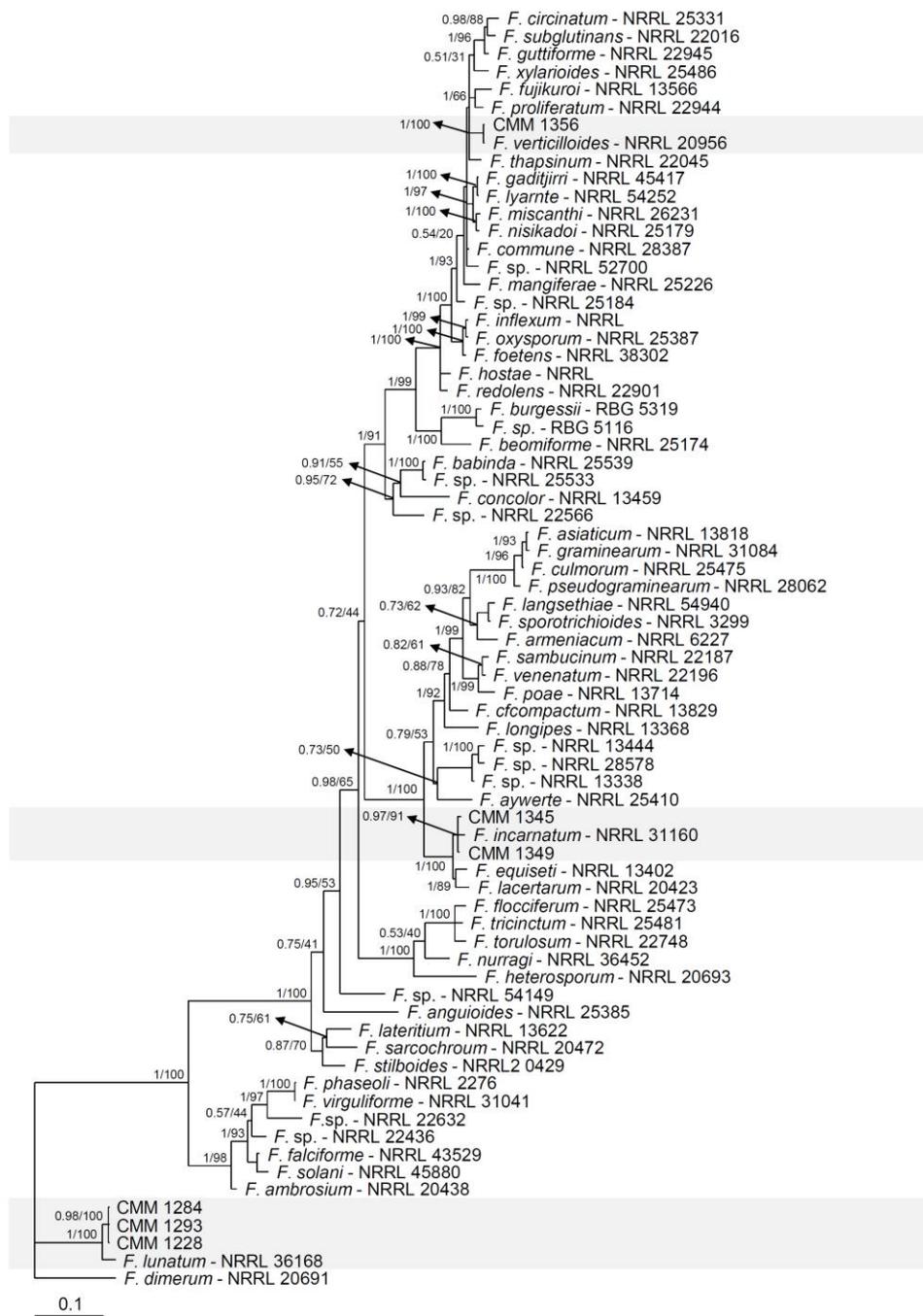
2 **Fig. 1** Symptoms of cladode brown spot in prickly pear cactus (*Nopalea cochenillifera*)



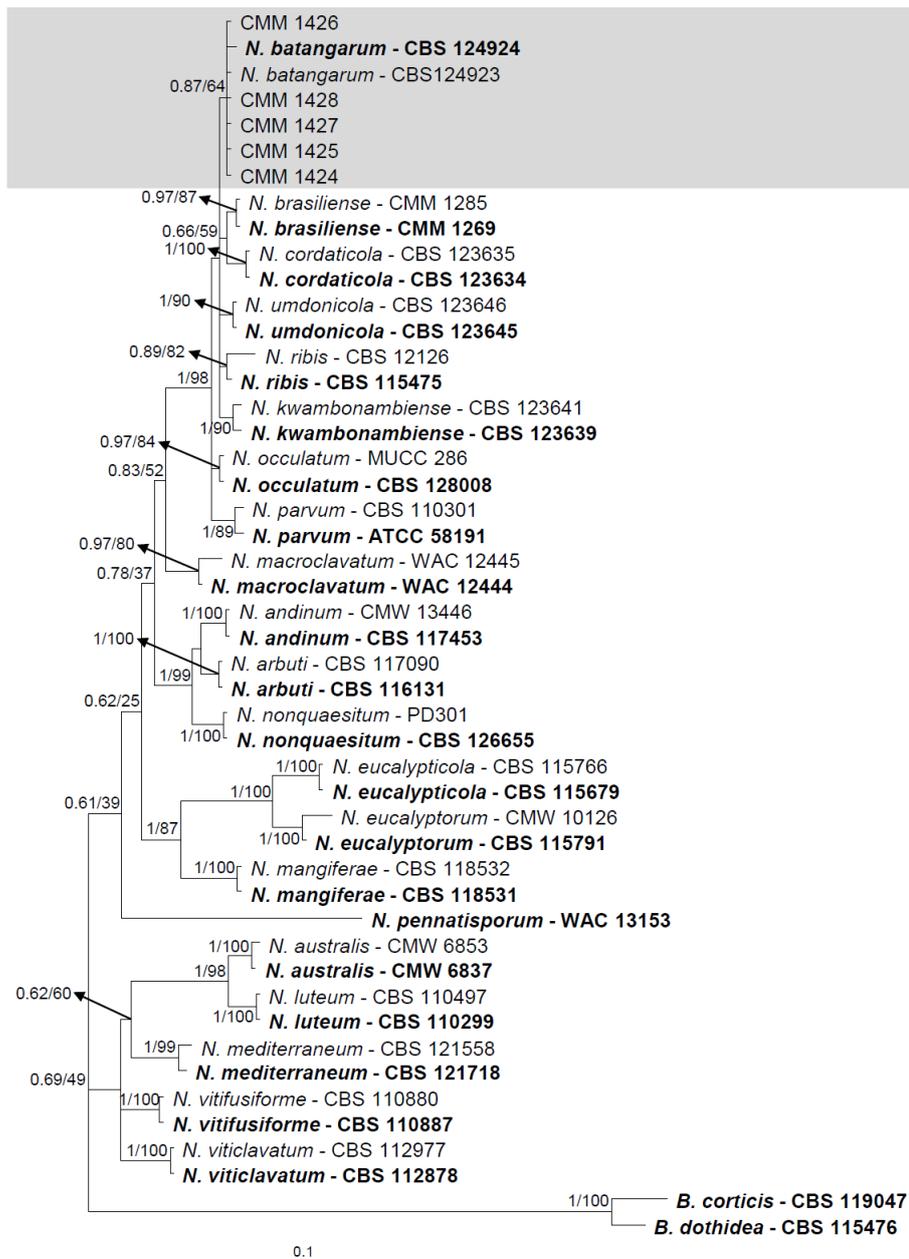
1
 2 **Fig. 2** Bayesian inference phylogenetic tree from *Alternaria* isolates using the combined
 3 partial sequence data of EF1- α , GPDH and RPB2. The tree shows the phylogenetic
 4 relationships of *Alternaria* species isolated from *Nopalea cochenillifera*. Bayesian posterior
 5 probability scores and ML Bootstrap support values are given at the nodes. Cultural accession
 6 numbers are listed. The tree is rooted to *A. alternantherae*. The scale bar indicates the number
 7 of expected changes for sites



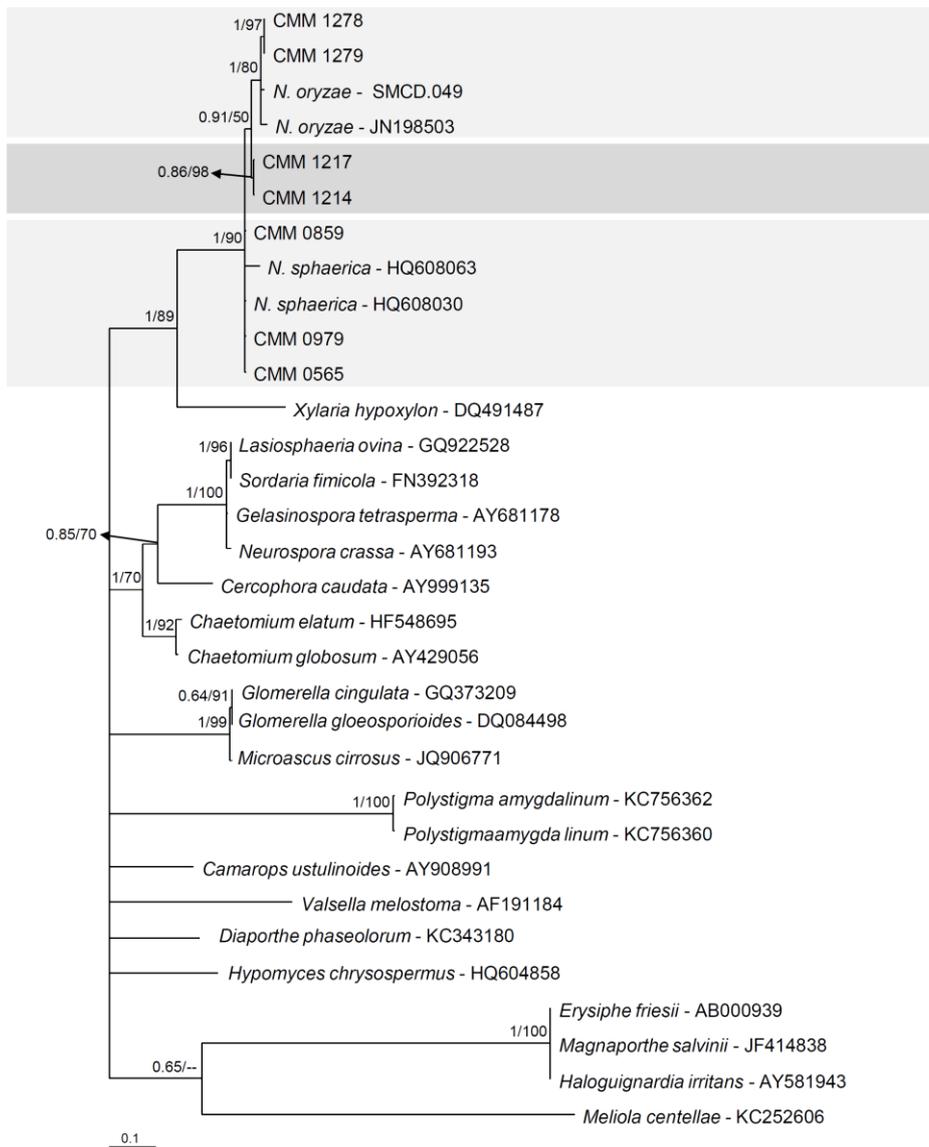
1
 2 **Fig. 3** Bayesian inference phylogenetic tree from *Colletotrichum* isolates using the combined
 3 partial sequence data of ITS, TUB2 and ApMAT. The tree shows the phylogenetic
 4 relationships of *Colletotrichum* species isolated from *Nopalea cochenillifera*. Bayesian
 5 posterior probability scores and ML Bootstrap support values are given at the nodes. Cultural
 6 accession numbers are listed. The tree is rooted to *C. xanthorrhoeae*. The scale bar indicates
 7 the number of expected changes for sites



1
 2 **Fig. 4** Bayesian inference phylogenetic tree from *Fusarium* isolates using the partial sequence
 3 data of RPB2. The tree shows the phylogenetic relationships of *Fusarium* species isolated
 4 from *Nopalea cochenillifera*. Bayesian posterior probability scores and ML Bootstrap support
 5 values are given at the nodes. Cultural accession numbers are listed. The tree is rooted to
 6 *Fusarium dimerum* and *Fusarium lunatum*. The scale bar indicates the number of expected
 7 changes for sites

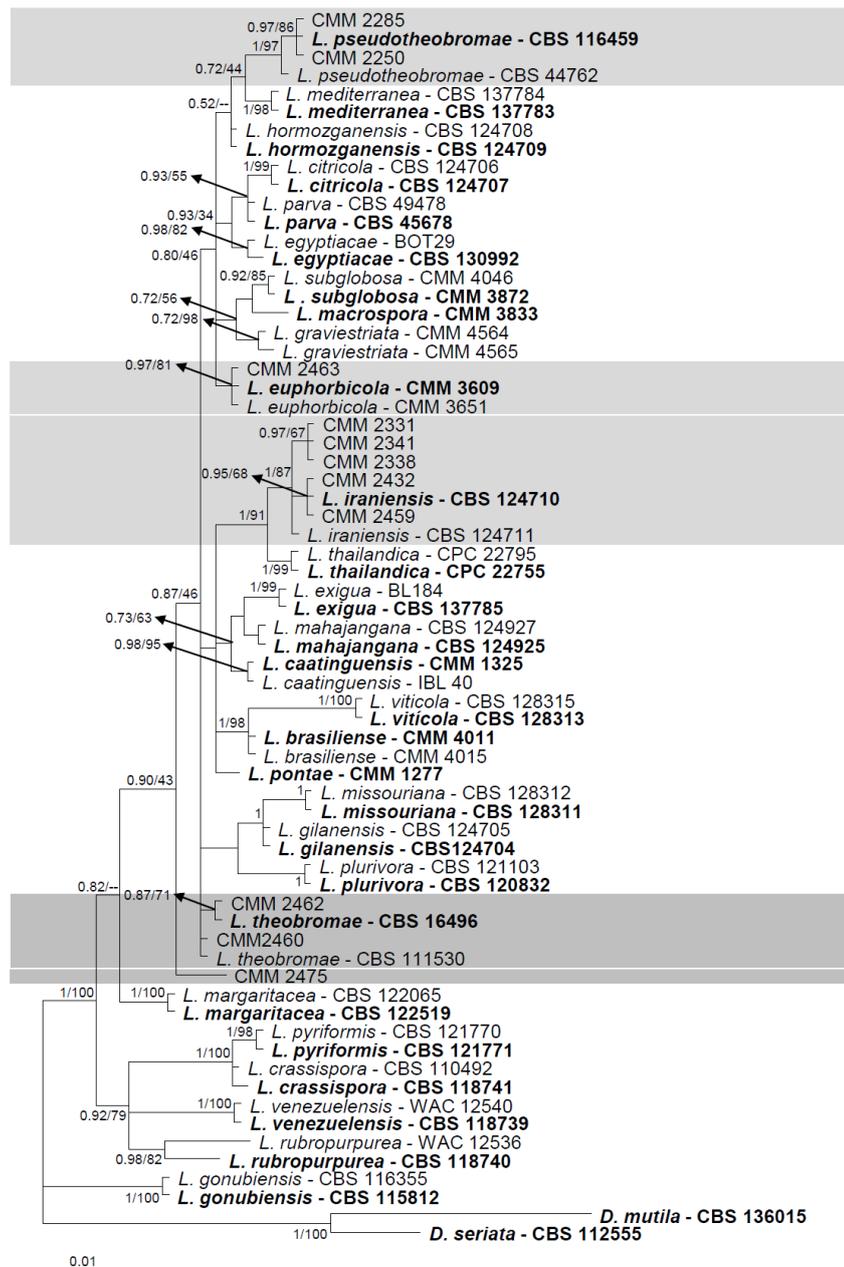


1
 2 **Fig. 5** Bayesian inference phylogenetic tree from *Neofusicoccum* isolates using the combined
 3 partial sequence data of ITS and EF1- α . The tree shows the phylogenetic relationships of
 4 *Neofusicoccum* species isolated from *Nopalea cochenillifera*. Bayesian posterior probability
 5 scores and ML Bootstrap support values are given at the nodes. Cultural accession numbers
 6 are listed. The tree is rooted to *Botryosphaeria corticis* and *Botryosphaeria dothidea*. The
 7 scale bar indicates the number of expected changes for sites

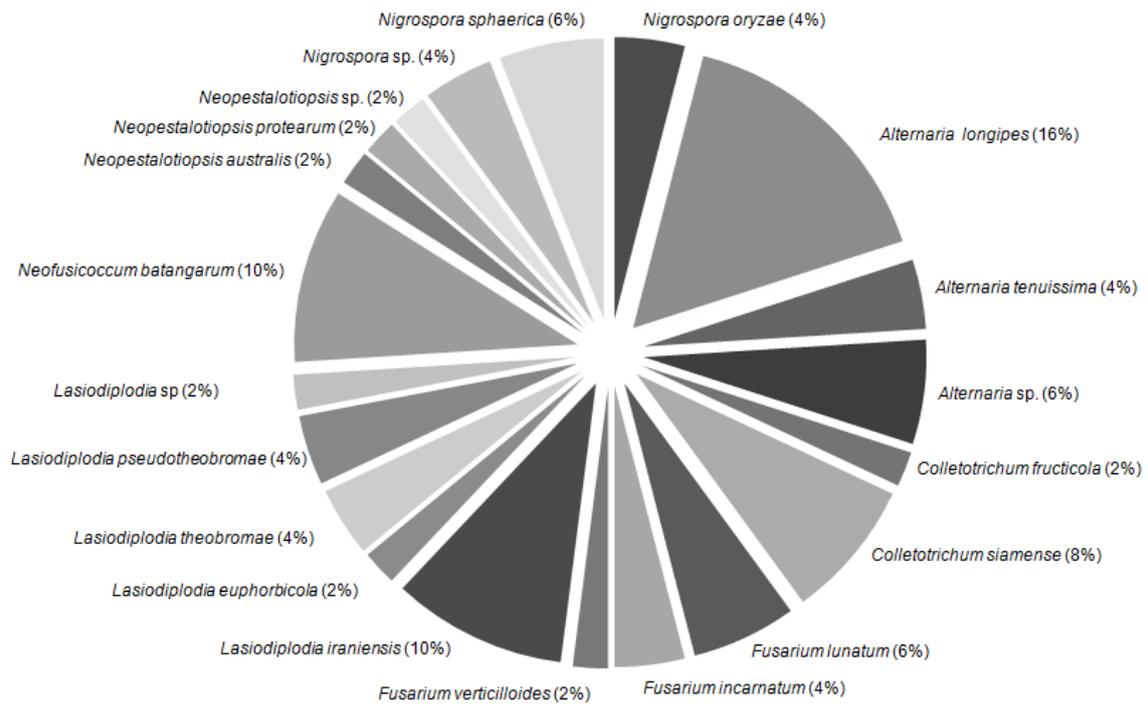


1

2 **Fig. 7** Bayesian inference phylogenetic tree from *Nigrospora* isolates using the partial
3 sequence data of ITS. The tree shows the phylogenetic relationships of *Nigrospora* species
4 isolated from *Nopalea cochenilifera*. Bayesian posterior probability scores and ML Bootstrap
5 support values are given at the nodes. Cultural accession numbers are listed. The tree is rooted
6 to *Erysiphe friesii*, *Magnaporthe salvinii*, *Haloguignardia irritans* and *Meliola centellae*. The
7 scale bar indicates the number of expected changes for sites



1
 2 **Fig. 8** Bayesian inference phylogenetic tree from *Lasiodiplodia* isolates using the combined
 3 partial sequence data of ITS and EF1. The tree shows the phylogenetic relationships of
 4 *Lasiodiplodia* species isolated from *Nopalea cochenillifera*. Bayesian posterior probability
 5 scores and ML Bootstrap support values are given at the nodes. Cultural accession numbers
 6 are listed. The tree is rooted to *Diplodia mutila* and *Diplodia seriata*. The scale bar indicates
 7 the number of expected changes for sites



1

2

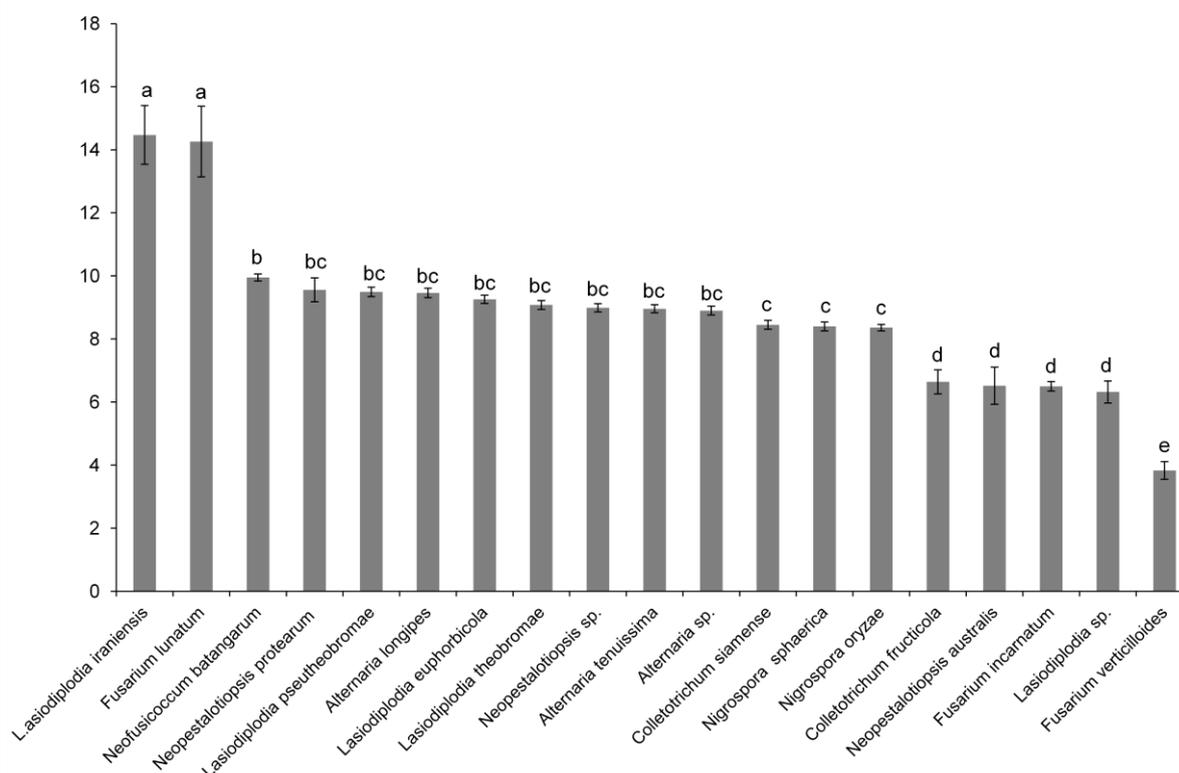
3 **Fig. 9** Frequency (%) of fungal species associated with cladode brown spot of *Nopalea*4 *cochenillifera* in Pernambuco state, northeastern Brazil (n=50)



1

2

3 **Fig. 10** Symptoms induced by fungal species associated with cladode brown spot *Nopalea*
4 *cochenillifera* in Pernambuco state (northeastern Brazil), 11 days after wounding and
5 inoculation of detached cladodes (cv. Miúda) with mycelium-colonized agar plugs.



1
 2 **Fig. 11** Mean lesion diameter (mm) caused by fungal species associated with cladode brown
 3 spot in *Nopalea cochenillifera* in Pernambuco state (northeastern Brazil), 11 days after
 4 wounding and inoculation of detached cladodes (cv. Miúda) with mycelium-colonized agar
 5 plugs. Bars above columns are the standard error of the mean. Columns with same letter do
 6 not differ significantly according to Fisher's LSD test ($P \leq 0.05$)

Capítulo III

**Efeito de ferimento, temperatura e umidade na
agressividade de espécies de Botryosphaeriaceae
em *Nopalea cochenillifera***

1 **Efeito de ferimento, temperatura e umidade na agressividade de espécies de**
2 **Botryosphaeriaceae em *Nopalea cochenillifera***

3

4 **Cynthia Conforto • Nelson Bernardi Lima • Fábio Júnior Araújo Silva • Sami Jorge**
5 **Michereff**

6

7 Accepted: / Published online:

8

9 C. Conforto

10 Instituto de Patologia Vegetal, CIAP-INTA, Córdoba, X5020, Argentina.

11

12 N. B. Lima • F. J. A. Silva • S. J. Michereff (✉)

13 Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife,
14 PE, Brazil.

15 E-mail: sami.michereff@ufrpe.br

16 **Resumo** *Nopalea cochenillifera* é uma importante fonte de alimentação animal nas regiões
17 áridas e semiáridas do Nordeste do Brasil. A mancha marrom dos cladódios, causada por
18 espécies da família Botryosphaeriaceae, é uma doença limitante à cultura na região. Nesse
19 estudo foi investigado o efeito de ferimento, temperatura e umidade na agressividade de
20 quatro espécies de Botryosphaeriaceae associadas à mancha marrom: *Lasiodiplodia*
21 *iraniensis*, *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae* e *Neofusicoccum batangarum*. Nenhuma
22 espécie induziu sintomas nos cladódios sem ferimento, mas em cladódios feridos todas as
23 espécies induziram sintomas. Todas as espécies expressaram a maior agressividade quando
24 inoculadas imediatamente após a realização do ferimento, reduzindo a agressividade com a
25 elevação da idade do ferimento. *Neofusicoccum batangarum* foi a espécie mais sensível à
26 idade do ferimento. Todas as espécies de Botryosphaeriaceae induziram sintomas em
27 cladódios na temperatura de 10 °C e somente *L. pseudotheobromae* não induziu sintomas a 40
28 °C. Houve diferença entre as espécies em relação à temperatura ótima para expressão da
29 máxima agressividade, que variou entre 22,2 °C (*L. pseudotheobromae*) a 30,4 °C (*L.*
30 *theobromae*). Todas as espécies induziram sintomas na ausência de umidade relativa elevada,
31 mas o período ótimo de duração da umidade variou entre 12,7 h (*N. batangarum*) e 16,0 h (*L.*
32 *theobromae*). *Neofusicoccum batangarum* e *L. iraniensis* foram as espécies mais sensíveis ao
33 atraso no início da umidade relativa elevada. Houve diferença entre as espécies em relação
34 aos níveis de agressividade em todos os efeitos avaliados. Na maioria dos experimentos, *L.*
35 *iraniensis* foi a espécie mais agressiva.

36

37 **Palavras-chave** *Nopalea cochenillifera* · Doença do cladódio · *Lasiodiplodia* ·
38 *Neofusicoccum* · Epidemiologia comparativa

39

40 **Abstract** *Nopalea cochenillifera* is an important source of animal feed in the arid and semi-
41 arid regions of northeastern Brazil. The cladode brown spot, caused by species of the
42 Botryosphaeriaceae family, is a limiting disease to the culture in the region. This study
43 investigated the effect of wound, temperature and humidity in the aggressiveness of four
44 species of Botryosphaeriaceae associated with the brown spot: *Lasiodiplodia iraniensis*, *L.*
45 *pseudotheobromae*, *L. theobromae* and *Neofusicoccum batangarum*. No species induced
46 symptoms in the cladodes without wound, but in wounded cladodes all species induced
47 symptoms. All species expressed the highest aggressiveness when inoculated immediately
48 after the wound, reducing the aggressiveness with the elevation of the age of the wound.
49 *Neofusicoccum batangarum* was the species most sensitive to the age of the wound. All
50 species of Botryosphaeriaceae induced symptoms in cladodes at 10 ° C and only *L.*
51 *pseudotheobromae* did not induce symptoms at 40 ° C. There was a difference between the
52 species in relation to the optimum temperature for the expression of maximum
53 aggressiveness, which varied between 22.2 °C (*L. pseudotheobromae*) and 30.4 °C (*L.*
54 *theobromae*). All species induced symptoms in the absence of high relative humidity, but the
55 optimal duration of moisture ranged from 12.7 h (*N. batangarum*) to 16.0 h (*L. theobromae*).
56 *Neofusicoccum batangarum* and *L. iraniensis* were the species most sensitive to delayed onset
57 of high relative humidity. There was a difference between the species in relation to the levels
58 of aggression in all evaluated effects. In most experiments, *L. iraniensis* was the most
59 aggressive species.

60

61 **Keywords** Prickly pear cactus · Cladode disease · *Lasiodiplodia* · *Neofusicoccum* ·
62 Comparative epidemiology

63

64 **Introdução**

65

66 A palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) é uma importante cultura das regiões áridas e
67 semiáridas, com grande diversidade de usos e aplicações, que revelam sua versatilidade. É
68 utilizada no consumo humano, medicina, indústria de cosméticos, fabricação de adesivos,
69 fibras para artesanato, fabricação de papel, corantes, mucilagens, ornamentação, biomassa
70 com fins energéticos, na conservação de solos e na alimentação animal (Barbera 2001; Santos
71 et al. 2012).

72 No Brasil, a região semiárida representa 11,4% do território nacional e 60% da região
73 Nordeste. As condições climáticas são caracterizadas por períodos secos, com precipitações
74 que variam entre os 400 e 800 mm, concentradas no verão e irregularmente distribuídas
75 (Oliveira et al. 2010). Neste contexto, a palma forrageira, dotada de características
76 morfológicas e mecanismos fisiológicos especiais típicos das plantas CAM, torna-se uma das
77 plantas mais adaptadas às condições ecológicas das zonas áridas e semiáridas do mundo,
78 transformando-se numa forrageira estratégica, minimizando a escassez de alimentação animal
79 na estação seca (Barbera 2001; Rebman e Pinkava 2001). A maior área implantada de palma
80 forrageira encontra-se no Nordeste semiárido, com aproximadamente 600.000 ha,
81 concentrados nos estados de Pernambuco, Alagoas, Bahia, Sergipe, Rio Grande do Norte,
82 Ceará e Paraíba (Lopes et al. 2012).

83 A criação extensiva de gado bovino, ovino e caprino é uma das principais atividades
84 econômicas na região Nordeste do Brasil, onde a palma forrageira constitui um importante
85 recurso visando á subsistência da produção (Oliveira et al. 2010). Duas espécies de palma
86 forrageira são plantadas no Nordeste brasileiro: *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill., com as
87 variedades Gigante e Redonda, e *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm. Dyck., com a variedade
88 Miúda ou Doce (Ferreira et al. 2012; Lopes et al. 2012). A palma miúda é a mais nutritiva,

89 palatável e com elevada resistência à cochonilha-do-carmim (*Dactylopius opuntiae*
90 Cockerell), um inseto-praga que está dizimando cultivos de outros tipos de palma forrageira
91 na região semiárida, motivo pelo qual nos últimos anos tem sido registrada uma grande
92 expansão das áreas cultivadas com essa cactácea (Lopes et al. 2012).

93 Apesar da rusticidade e elevada adaptabilidade a diferentes ambientes, o cultivo de *N.*
94 *cochenillifera* é limitado pela ocorrência de doenças, principalmente de origem fúngica
95 (Barbosa et al. 2012). Entre as doenças que causam manchas nos cladódios, uma das mais
96 importantes no Nordeste brasileiro é a mancha marrom. Os sintomas se caracterizam por
97 manchas de coloração inicialmente marrom e depois preta nos cladódios, nas formas
98 circulares ou elípticas, medindo 1,0-3,0 cm de diâmetro. As lesões podem se estender de uma
99 face à outra do cladódio, exibindo perfurações devido à queda do tecido infectado. As
100 manchas podem coalescer, formando grandes áreas necrosadas e causando a queda dos
101 cladódios (Souza et al. 2010; Lima et al. 2011; Barbosa et al. 2012). As medidas de controle
102 se baseiam na remoção e destruição dos cladódios afetados (Souza et al. 2010; Barbosa et al.
103 2012). Não existem fungicidas registrados no Brasil para o controle das doenças da palma
104 forrageira (MAPA 2017). Como as opções de controle são muito reduzidas, há necessidade do
105 desenvolvimento de novas estratégias de manejo da doença.

106 A etiologia da mancha marrom tem sido controversa em nível mundial, mas
107 recentemente um estudo filogenético revelou que, dentre outros agentes, cinco espécies de
108 Botryosphaeriaceae causavam a doença em *N. cochenillifera*: *Lasiodiplodia iraniensis*
109 Abdollahz., Zare & A.J.L. Phillips, *L. theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl.), *L.*
110 *pseudotheobromae* A.J.L. Phillips, A. Alves & Crous, *L. euphorbicola* A.R. Machado & O.L.
111 Pereira e *Neofusicoccum batangarum* Begoude, Jol. Roux & Slippers (Conforto et al. 2017).

112 O nível de desenvolvimento de uma doença de planta resulta da intensidade da
113 interação entre patógeno e hospedeiro, influenciada por fatores como agressividade do

114 patógeno e adequação do tecido hospedeiro e do ambiente (Agrios 2005). A agressividade de
115 um patógeno pode ser definida como um componente quantitativo da patogenicidade, ou seja,
116 a quantidade de doença induzida por um isolado de um patógeno em um hospedeiro
117 suscetível. As espécies de um patógeno e os indivíduos dentro de uma espécie podem variar
118 na agressividade, sendo importante estabelecer os fatores que podem afetar a agressividade
119 dos isolados e/ou das espécies e se existe variabilidade na agressividade frente a diferentes
120 condições do tecido hospedeiro e do ambiente (Agrios 2005; Shew e Shew 2017).

121 Inexistem estudos sobre o efeito de fatores do hospedeiro, do patógeno e do ambiente
122 na agressividade dos agentes associados à mancha marrom da palma forrageira. Com a
123 recente identificação de várias espécies de Botryosphaeriaceae associadas à mancha marrom
124 de *N. cochenillifera*, é importante investigar os fatores que podem afetar a agressividade das
125 espécies mais prevalentes, tendo em vista as possíveis implicações no desenvolvimento de
126 estratégias de manejo da doença. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi comparar a
127 agressividade de quatro espécies de Botryosphaeriaceae prevalentes em campos de produção
128 de *N. cochenillifera* no Nordeste brasileiro em relação à presença e idade de ferimento,
129 temperatura, duração e tempo de início de umidade relativa elevada, quando inoculadas em
130 cladódios destacados.

131

132 **Materiais e métodos**

133

134 Isolados fúngicos

135

136 Em todos os experimentos foram utilizados oito isolados de Botryosphaeriaceae, pertencentes
137 a quatro espécies (*L. iraniensis*, *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae* e *N. batangarum*), e
138 dois isolados de cada espécie. Os isolados foram obtidos de cladódios de *N. cochenillifera*

139 coletados em três municípios no Estado de Pernambuco (Tabela 1) e identificados por
140 inferência filogenética baseada na sequência completa da região ITS e na sequência parcial do
141 gene EF1- α por Conforto et al. (2017). Os isolados foram depositados na Coleção de Culturas
142 de Fungos Fitopatogênicos “Prof. Maria Menezes” (CMM) na Universidade Federal Rural de
143 Pernambuco (Recife, Pernambuco, Brasil). Culturas estoque foram mantidas em tubos de
144 ensaio com meio batata-dextrose-ágar (BDA; Acumedia, Lansing, EUA) inclinado a 5 °C no
145 escuro. Antes dos experimentos, os isolados foram cultivados em placas de Petri com BDA e
146 incubados a 28 °C no escuro por 4 dias.

147

148 Cladódios

149

150 Cladódios adultos de *N. cochenillifera* (var. Miúda) foram coletados em um campo de
151 produção em São João (Pernambuco), dos quais espécies de Botryosphaeriaceae não foram
152 detectadas após repetidas amostragens e tentativas de isolamento. Os cladódios foram
153 selecionados pela uniformidade do tamanho, espessura e ausência de injúrias. Antes da
154 inoculação, os cladódios foram lavados com água corrente, desinfestados pela imersão em
155 solução de NaOCl 1% por 3 min, enxaguados duas vezes em água destilada e colocados para
156 secar em uma bancada do laboratório.

157

158 Efeito do ferimento

159

160 Nesse experimento foram utilizados cladódios feridos e não feridos. Para obtenção de
161 cladódios feridos, estes foram submetidos à perfuração em 10 pontos equidistantes pela
162 introdução de três pinos esterilizados através da superfície da casca a uma profundidade de 2
163 mm e largura de 0,8 mm. Imediatamente após o ferimento, um disco de BDA (5 mm de

164 diâmetro) contendo micélio foi removido da margem da colônia de cada isolado de
165 Botryosphaeriaceae e transferido para o ponto perfurado na epiderme do cladódio. Em
166 cladódios não feridos o disco de micélio foi colocado na região central de cada quadrante.
167 Cladódios com discos de BDA não colonizados pelo fungo foram utilizados como
168 testemunha. Imediatamente após a inoculação, os cladódios foram colocados em bandejas
169 plásticas (50x30x20 cm) com o fundo coberto por quatro folhas de papel toalha umedecidas
170 com água esterilizada (200 ml/bandeja) e cobertas com sacos plásticos para manter a umidade
171 relativa elevada ($\cong 100\%$). Para evitar o contato dos cladódios com a água, uma tampa de
172 placa de Petri esterilizada foi utilizada. As bandejas foram colocadas em sala de incubação a
173 28 °C no escuro. Após 72 h, os sacos plásticos e os papéis toalhas foram removidos das
174 bandejas e os cladódios foram mantidos na mesma temperatura por um período adicional de
175 oito dias. Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado em arranjo
176 fatorial 8x2, com quatro repetições por combinação isolado/situação de ferimento e dois
177 cladódios por repetição. A agressividade dos isolados foi avaliada aos 11 dias após a
178 inoculação pela mensuração do diâmetro das lesões (mm) em direções perpendiculares com
179 um paquímetro digital (Mitutoyo Co., Tóquio, Japão) e cálculo do diâmetro médio da lesão. O
180 experimento foi replicado.

181

182 Efeito da idade do ferimento

183

184 Cladódios foram feridos e inoculados com um disco de BDA com micélio (5 mm de
185 diâmetro) de cada isolado de Botryosphaeriaceae conforme descrito anteriormente. A
186 inoculação foi realizada imediatamente após o ferimento e as 24, 48 e 72 h depois. Cladódios
187 com discos de BDA não colonizados pelo fungo foram utilizados como testemunha. As
188 condições de incubação e avaliação da agressividade foram as mesmas descritas para o

189 experimento de efeito do ferimento. Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente
190 casualizado em arranjo fatorial 8x4, com quatro repetições por combinação isolado/idade de
191 ferimento e dois cladódios por repetição. O experimento foi replicado.

192

193 Efeito da temperatura

194

195 Cladódios foram feridos e inoculados com um disco de BDA com micélio (5 mm de
196 diâmetro) de cada isolado de Botryosphaeriaceae imediatamente após o ferimento. Cladódios
197 com discos de BDA não colonizados pelo fungo foram utilizados como testemunha. As
198 bandejas com os cladódios inoculados foram colocadas em câmaras de incubação nas
199 temperaturas de 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 °C. As outras condições de incubação e a avaliação
200 da agressividade foram as mesmas descritas para o experimento de efeito do ferimento. Foi
201 utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado em arranjo fatorial 8x7,
202 com quatro repetições por combinação isolado/temperatura e dois cladódios por repetição. O
203 experimento foi replicado.

204

205 Efeito da duração da umidade

206

207 Cladódios foram feridos e inoculados com um disco de BDA com micélio (5 mm de
208 diâmetro) de cada isolado de Botryosphaeriaceae imediatamente após o ferimento. Cladódios
209 com discos de BDA não colonizados pelo fungo foram utilizados como testemunha. Os
210 cladódios foram submetidos a cinco períodos de duração da câmara úmida: 0, 12, 24, 48 e 72
211 h. As outras condições de incubação e a avaliação da agressividade foram as mesmas descritas
212 para o experimento de efeito do ferimento. Foi utilizado um delineamento experimental

213 inteiramente casualizado em arranjo fatorial 8x5, com quatro repetições por combinação
214 isolado/período de câmara úmida e dois cladódios por repetição. O experimento foi replicado.

215

216 Efeito do início da umidade

217

218 Cladódios foram feridos e inoculados com um disco de BDA com micélio (5 mm de
219 diâmetro) de cada isolado de Botryosphaeriaceae imediatamente após o ferimento. Cladódios
220 com discos de BDA não colonizados pelo fungo foram utilizados como testemunha. Os
221 cladódios foram submetidos à câmara úmida imediatamente e após 12, 24, 48 e 72 h da
222 inoculação. As outras condições de incubação e a avaliação da agressividade foram as
223 mesmas descritas para o experimento de efeito do ferimento. Foi utilizado um delineamento
224 experimental inteiramente casualizado em arranjo fatorial 8x5, com quatro repetições por
225 combinação isolado/tempo de início da câmara úmida e dois cladódios por repetição. O
226 experimento foi replicado.

227

228 Análises estatísticas

229

230 Os dados das duas replicações independentes, para cada experimento, foram agrupados após a
231 realização da análise de homogeneidade das variâncias usando o teste de Levene e nenhuma
232 heterogeneidade ser detectada ($P>0,05$). Os dados obtidos para cada espécie foram
233 submetidos ao teste t e em todos os experimentos os isolados da mesma espécie de
234 Botryosphaeriaceae não diferiram significativamente ($P>0,05$) em relação às variáveis
235 analisadas. Portanto, somente as médias das espécies de Botryosphaeriaceae foram
236 consideradas em todas as análises estatísticas. No experimento de efeito de ferimento, os
237 valores de tamanhos de lesões induzidos pelas espécies de Botryosphaeriaceae sem e com

238 ferimento foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste da diferença
239 mínima significativa (LSD) de Fisher ($P=0,05$). Nos demais experimentos, os dados foram
240 submetidos às análises de regressão linear e não-linear para relacionar idade do ferimento,
241 temperatura, duração da umidade e início da umidade aos tamanhos das lesões induzidos
242 pelas espécies de Botryosphaeriaceae. A escolha do modelo para cada experimento foi
243 determinado pelo coeficiente de determinação (R^2), distribuição dos resíduos e quadrado
244 médio dos erros. As significâncias das regressões foram verificadas pelo teste F ($P\leq 0,05$) e de
245 seus parâmetros pelo teste t ($P\leq 0,05$). Os valores das variáveis estimadas pelos modelos de
246 regressão em cada experimento foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo
247 teste LSD de Fisher ($P=0,05$). Os testes de Levene e t, as análises de variância e as
248 comparações de medias foram realizadas com auxílio do programa Statistix 9.0 (Analytical
249 Software, Tallahassee, EUA). As análises de regressão foram realizadas com auxílio do
250 programa TableCurve™ 2D 5.01 (Systat Software Inc., Chicago, EUA).

251

252 **Resultados**

253

254 Os dois isolados de cada espécie de Botryosphaeriaceae não diferiram significativamente
255 entre si ($P>0,05$) em relação à agressividade em cladódios de *N. cochenillifera*, induzindo
256 níveis similares de severidade da doença (tamanho de lesão) em todos os experimentos.
257 Nenhum sintoma foi constatado nos cladódios testemunhas nos experimentos realizados.

258

259 Efeito do ferimento

260

261 Nenhuma espécie de Botryosphaeriaceae induziu sintomas nos cladódios de *N. cochenillifera*
262 sem ferimento, mas em cladódios feridos todas as espécies induziram sintomas. Houve

263 diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre as espécies em relação aos níveis de agressividade na
264 presença de ferimento. *Lasiodiplodia iraniensis* foi a espécie mais agressiva, diferindo
265 significativamente das demais, enquanto *L. pseudotheobromae* foi a menos agressiva. As
266 outras espécies apresentaram comportamento intermediário em relação à agressividade na
267 presença de ferimento (Fig. 1).

268

269 Efeito da idade do ferimento

270

271 A idade do ferimento nos cladódios influenciou significativamente no nível de agressividade
272 das espécies de Botryosphaeriaceae. Todas as espécies expressaram a maior agressividade
273 quando inoculadas imediatamente após a realização do ferimento (0 hora), reduzindo a
274 agressividade com a elevação da idade do ferimento. *Neofusicoccum batangarum* foi a
275 espécie mais sensível à idade do ferimento, pois não induziu sintomas em ferimentos com 72
276 h, enquanto as demais espécies induziram sintomas em todas as idades de ferimento avaliadas
277 (Fig. 2).

278 O modelo de regressão não-linear logístico dose-resposta com três parâmetros [$y =$
279 $a/(1+(x/b)^c)$] proporcionou excelente ajuste aos dados de tamanho das lesões em função da
280 idade do ferimento para todas as espécies de Botryosphaeriaceae ($R^2 \leq 0,9731$) (Tabela 2).
281 Neste modelo, y representa o tamanho da lesão em determinada idade do ferimento (x). O
282 parâmetro a representa o valor de y antes da transição, ou seja, antes de y começar a diminuir,
283 o que pode ser interpretado como o tamanho máximo da lesão na menor idade do ferimento.
284 O parâmetro b representa o valor de x no centro da transição, ou seja, valor de x que vai
285 reduzir em 50% o valor de y , o que pode ser interpretado como a idade do ferimento em que o
286 tamanho máximo da lesão é reduzido pela metade (Tabela 2).

287 Houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre as espécies de Botryosphaeriaceae em
288 relação aos níveis de agressividade, indicado pelo tamanho da lesão na menor idade do
289 ferimento (0 hora). A maior agressividade foi evidenciada por *L. iraniensis*, enquanto as
290 demais espécies não diferiram entre si em agressividade (Tabela 2). As espécies também
291 diferiram significativamente ($P \leq 0,05$) quanto à idade do ferimento em que o tamanho máximo
292 da lesão foi reduzido pela metade. A maior sensibilidade à idade do ferimento foi apresentada
293 por *L. iraniensis*, pois com ferimento de 22,5 h houve redução do tamanho máximo da lesão
294 pela metade, enquanto *L. pseudotheobromae* foi a menos sensível, necessitando de 39,9 h para
295 a mesma redução. As outras espécies apresentaram comportamento intermediário em relação
296 à influência da idade do ferimento (Tabela 2).

297

298 Efeito da temperatura

299

300 As espécies de Botryosphaeriaceae induziram sintomas nos cladódios *N. cochenillifera* nas
301 temperaturas entre 10 e 40 °C, com exceção de *L. pseudotheobromae* que não induziu
302 sintomas na temperatura mais elevada. *Lasiodiplodia theobromae* expressou maior
303 agressividade quando a temperatura se elevou de 25 °C para 30 °C, enquanto para as demais
304 espécies a elevação da temperatura de 20 °C para 25 °C propiciou maior agressividade (Fig.
305 3).

306 O modelo de regressão não-linear Lorentzian [$y = a/(1+((x-b)/c)^2)$] proporcionou
307 excelente ajuste aos dados de tamanho das lesões em função da temperatura para todas as
308 espécies de Botryosphaeriaceae ($R^2 \leq 0,9666$) (Tabela 3). Neste modelo, y representa o
309 tamanho da lesão em determinada temperatura (x), enquanto a , b e c são parâmetros da
310 regressão. Com o cálculo das derivadas desses parâmetros é possível estimar o pico máximo
311 de x em função de y , sendo interpretado como a temperatura ótima para o tamanho máximo da

312 lesão e o pico máximo de y em função de x , sendo interpretado como o tamanho máximo da
313 lesão (Tabela 3).

314 Houve diferença significativa ($P>0,05$) entre as espécies de Botryosphaeriaceae em
315 relação à temperatura ótima para expressão da máxima agressividade. *Lasiodiplodia*
316 *theobromae* necessitou da temperatura mais elevada para expressar a máxima agressividade
317 (30,4 °C), enquanto *L. pseudotheobromae* e *N. batangarum* expressaram a máxima
318 agressividade nas menores temperaturas (22,2 °C e 23,4 °C, respectivamente), sem diferirem
319 entre si e diferindo de *L. iraniensis* (25,3 °C) (Tabela 3).

320 As espécies de Botryosphaeriaceae também diferiram significativamente ($P\leq 0,05$) em
321 relação aos níveis de agressividade, indicados pelos tamanhos das lesões na temperatura
322 ótima. As maiores agressividades nessas temperaturas foram evidenciadas por *N. batangarum*
323 e *L. iraniensis*, que não diferiram entre si. Por outro lado, *L. pseudotheobromae* e *L.*
324 *theobromae* foram menos agressivas, sem diferirem entre si e diferindo das demais espécies
325 (Tabela 3).

326

327 Efeito duração da umidade

328

329 Todas as espécies de Botryosphaeriaceae induziram sintomas nos cladódios de *N.*
330 *cochenillifera* na ausência de umidade relativa elevada. O tempo de duração da umidade
331 influenciou na agressividade das espécies de Botryosphaeriaceae. Todas as espécies
332 expressaram a maior agressividade quando os cladódios inoculados foram mantidos em
333 umidade elevada por aproximadamente 12 h, havendo uma redução na agressividade com o
334 aumento do período de manutenção em umidade elevada (Fig. 4).

335 O modelo de regressão Lorentzian proporcionou excelente ajuste aos dados de
336 tamanho das lesões em função da duração da umidade relativa elevada para todas as espécies

337 de Botryosphaeriaceae ($R^2 \leq 0,9823$) (Tabela 4). O cálculo das derivadas dos parâmetros desse
338 modelo permitiu a estimativa da duração da umidade ótima, bem como os tamanhos máximos
339 das lesões na umidade ótima e na ausência de umidade (Tabela 4).

340 As espécies de Botryosphaeriaceae diferiram significativamente ($P > 0,05$) em relação
341 ao período ótimo de duração da umidade elevada para expressão da máxima agressividade. Os
342 menores períodos de duração de umidade elevada para expressarem a máxima agressividade
343 foram exigidos por *N. batangarum* (12,7 h) e *L. pseudotheobromae* (13,7 h), que não
344 diferiram entre si. Por outro lado, *L. theobromae* necessitou do maior período de duração da
345 umidade elevada (16,0 h), diferindo das demais espécies (Tabela 4).

346 Houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre as espécies de Botryosphaeriaceae em
347 relação aos níveis de agressividade no período ótimo de umidade elevada e na ausência de
348 umidade. No período ótimo de umidade, *Lasiodiplodia iraniensis* foi a mais agressiva,
349 seguida de *N. batangarum*, que diferiram entre si e das demais. Nessa condição de umidade,
350 as menores agressividades foram apresentadas por *L. pseudotheobromae* e *L. theobromae*,
351 sem diferirem entre si e diferindo das demais (Tabela 4). Na ausência de umidade elevada (0
352 h), *L. iraniensis* foi a mais agressiva seguida de *N. batangarum*, enquanto *L. theobromae* e *L.*
353 *pseudotheobromae* as menos agressivas (Tabela 4).

354

355 Efeito do início da umidade

356

357 A agressividade das espécies de Botryosphaeriaceae foi influenciada pelo intervalo de tempo
358 entre a inoculação e o início da umidade relativa elevada. As espécies expressaram a maior
359 agressividade quando submetidas à umidade relativa elevada imediatamente após a
360 inoculação (0 h) e reduziram a agressividade com o aumento do intervalo de tempo para início
361 da umidade elevada. Todas as espécies induziram sintomas com o início da umidade após 72

362 h da inoculação. *Lasiodiplodia iraniensis* e *N. batangarum* foram mais sensíveis ao atraso no
363 início da umidade relativa elevada, reduzindo drasticamente os níveis de agressividade com o
364 início da umidade às 12 ou 24 h após a inoculação (Fig. 5).

365 O modelo de regressão linear [$y = a + bx^{0,5}$] propiciou excelente ajuste aos dados de
366 tamanho das lesões em função do tempo de início da umidade relativa elevada para todas as
367 espécies de Botryosphaeriaceae ($R^2 \leq 0,9679$) (Tabela 5). Neste modelo, y representa o
368 tamanho da lesão em determinado tempo de início da umidade (x). O parâmetro a representa o
369 valor de y no período sem umidade elevada (0 h), sendo interpretado como o tamanho
370 máximo da lesão no menor tempo de início da umidade. O parâmetro b representa a taxa de
371 redução do valor de y em função da elevação de x , sendo interpretado como a taxa de redução
372 do tamanho da lesão em função do atraso do início da umidade elevada (Tabela 5).

373 As espécies de Botryosphaeriaceae diferiram significativamente ($P \leq 0,05$) em relação à
374 taxa de redução do tamanho da lesão em função da demora no início da umidade elevada após
375 a inoculação. *Lasiodiplodia iraniensis* e *N. batangarum* apresentaram as maiores taxas de
376 redução da agressividade devido ao atraso no início da umidade elevada, com reduções de 1,5
377 mm/h e 1,2 mm/h nos tamanhos das lesões, respectivamente, diferindo das outras duas
378 espécies. Por outro lado, *L. theobromae* e *L. pseudotheobromae* apresentaram as menores
379 taxas de redução da agressividade devido ao atraso no início da umidade elevada, sem
380 diferirem entre si (Tabela 5). Embora todas as espécies de Botryosphaeriaceae tenham
381 evidenciado maior agressividade quando submetidas à umidade relativa elevada
382 imediatamente após a inoculação, houve diferença significativa entre estas quanto aos níveis
383 de agressividade apresentados. Nessa condição, *L. iraniensis* foi espécie mais agressiva,
384 seguida de *N. batangarum*, que diferiram entre si e das demais. Por outro lado, *L. theobromae*
385 e *L. pseudotheobromae* foram as menos agressivas, sem diferirem entre si.

386

387 **Discussão**

388

389 Este é o primeiro estudo em que os efeitos de fermento, temperatura e umidade foram
390 determinados em relação à agressividade de espécies de Botryosphaeriaceae em cladódios de
391 *N. cochenillifera*.

392 Existem três vias principais de penetração dos patógenos de plantas em seus
393 hospedeiros: a via direta pela superfície intacta da planta; por aberturas naturais, como
394 estômatos e lenticelas; e por ferimentos. Ferimentos fornecem locais para entrada de
395 microrganismos nos tecidos, aceleram a taxa de respiração, a transpiração e a permeabilidade
396 das membranas, com a consequente perda de água e compostos celulares solúveis em água,
397 eletrólitos e íons, que favorecem o processo infeccioso (Agrios 2005). As espécies da família
398 da Botryosphaeriaceae são patógenos que penetram seus hospedeiros por ferimentos e
399 aberturas naturais como estômatos e lenticelas (Michailides 1991; Kim et al. 1999;
400 Sammonds et al. 2016), mas ferimentos são considerados os sítios primários de infecção
401 (Amponsah et al. 2014; Sammonds et al. 2016). Os resultados obtidos confirmam essa última
402 observação, pois as espécies de Botryosphaeriaceae foram capazes de induzir sintomas em
403 cladódios de *N. cochenillifera* somente na presença de fermento, indicando que o patógeno
404 não tem habilidade para penetrar o hospedeiro diretamente. A capacidade de algumas espécies
405 de Botryosphaeriaceae induzirem lesões em tecidos sem fermento pode estar associada a
406 mecanismos particulares de patogênese, uma vez que tem sido constatada a capacidade
407 diferencial de espécies para produzir metabólitos fitotóxicos e outros compostos bioativos
408 envolvidos na patogênese (Manawasinghe et al. 2016).

409 Uma possível explicação para a necessidade de fermento na penetração de cladódios de *N.*
410 *cochenillifera* por espécies de Botryosphaeriaceae pode estar associada às características morfológicas
411 do cladódio. Anatomicamente esse órgão é formado por pele, casca, tecido vascular constituído de
412 feixes colaterais separados por tecido parenquimatoso, e medula, que é o principal tecido suculento. A

413 pele consiste de uma camada de células epidérmicas e de 6 a 7 camadas de células hipodérmicas com
414 paredes primárias grossas, que parecem com um tecido laminar de colênquima. Tanto a epiderme
415 quanto a hipoderme propiciam uma integridade muito efetiva, pois as células grossas da hipoderme
416 são muito fortes e atuam, portanto, como a primeira linha de defesa contra microrganismos. Além
417 destas características, as cactáceas têm um número menor de estômatos por milímetro quadrado (10-
418 30) que outras espécies vegetais (100-300), o que pode influenciar negativamente na penetração de
419 microrganismos por aberturas naturais (Hills 2001).

420 Embora ferimentos sejam os sítios primários de infecção para Botryosphaeriaceae, a
421 sua suscetibilidade e o subsequente desenvolvimento da lesão pode variar dependendo da
422 idade do ferimento (Amponsah et al. 2014). A idade do ferimento nos cladódios influenciou
423 significativamente o nível de agressividade das espécies de Botryosphaeriaceae, mas todas as
424 espécies expressaram a maior agressividade quando inoculadas imediatamente após a
425 realização do ferimento e reduziram a agressividade com o aumento da idade do ferimento.

426 A maior disponibilidade de água liberada na forma de exsudados logo após a
427 realização do ferimento pode ter exercido grande influência, pois o processo de infecção e/ou
428 aumento da suscetibilidade do hospedeiro são estimulados pela alta umidade (Agrios 2005). O
429 processo de cicatrização do tecido lesionado pode também ter influenciado na severidade da
430 doença, pois durante a cicatrização dos tecidos ocorre a produção de suberina e lignina, bem
431 como sua deposição nas paredes celulares do lado injuriado para formar a periderme da lesão,
432 o que pode constituir um mecanismo estrutural de resistência ao processo infeccioso (Droby
433 et al. 2011). Ferimentos frescos também aceleram a perda de água e a taxa de respiração em
434 virtude da elevada atividade metabólica das células feridas (Adaskaveg et al. 2002). A menor
435 intensidade das lesões observada em ferimentos mais velhos pode também ser atribuída ao
436 acúmulo de fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (PR), em resposta à injúria
437 mecânica, que podem inibir as ações de agentes patogênicos (Adaskaveg et al. 2002).

438 Quando inoculadas em cladódios de *N. cochenillifera*, *L. iraniensis* foi a espécie mais
439 afetada na agressividade pelo aumento da idade do fermento, enquanto *L. pseudotheobromae*
440 foi a espécie menos afetada. Esses resultados confirmam o observado em estudos com outros
441 hospedeiros em que o tempo de permanência dos fermentos suscetíveis à infecção e o nível
442 de colonização podem variar entre as espécies de Botryosphaeriaceae (Úrbez-Torres e Gubler
443 2011; Amponsah et al. 2014).

444 Todas as espécies de Botryosphaeriaceae causaram doença em cladódios de *N.*
445 *cochenillifera* a 10 °C, concordando com estudos prévios em outros hospedeiros
446 (Abdollahzadeh et al. 2010; Begoude et al. 2010; Correia et al. 2016; Netto et al. 2017),
447 enquanto *L. pseudotheobromae* não induziu sintomas a 40 °C. Ficaram evidentes as diferenças
448 entre as espécies quanto às necessidades de temperaturas ótimas para as infecções dos
449 cladódios, pois para *L. theobromae* a temperatura ótima foi de 30,4 °C, enquanto para as
450 outras espécies as temperaturas foram $\leq 25,3$ °C. *Lasiodiplodia theobromae* é a espécie de
451 Botryosphaeriaceae mais amplamente distribuída no Nordeste brasileiro, principalmente em
452 condições semiáridas, causando doenças em diversas espécies de plantas (Marques et al.
453 2013; Netto et al. 2014, 2017; Correia et al. 2016; Coutinho et al. 2017). Um estudo recente
454 mostrou que temperaturas superiores a 25 °C favorecem a produção de proteínas relacionadas
455 com a patogênese de *L. theobromae*, indicando a possibilidade de indução da agressividade
456 para essa espécie pela elevação da temperatura (Félix et al. 2016).

457 A indução de sintomas da mancha marrom pelas espécies de Botryosphaeriaceae na
458 ausência de umidade relativa elevada indica que a água livre não foi necessária, pelo menos
459 na forma de condensação na superfície do cladódio, para a penetração do hospedeiro. A
460 ocorrência de infecções na ausência de umidade elevada pode ser um indicativo que a
461 umidade associada com os exsudados liberados pelo cladódio após o fermento tenha sido
462 suficiente para iniciar os processos envolvidos na patogênese. Associado a isso, a adaptação

463 das espécies de Botryosphaeriaceae às condições de baixa umidade relativa prevalentes na
464 região onde a palma forrageira é cultivada ($\leq 75\%$) e as condições de estresse associadas aos
465 baixos níveis de umidade tenham aumentado a suscetibilidade ao patógeno e favorecer o
466 desenvolvimento da doença, como verificado em outras espécies de plantas (Pusey 1989;
467 Desprez-Loustau et al. 2006; van Niekerk et al. 2011; Qiu et al. 2016).

468 Todas as espécies de Botryosphaeriaceae expressaram maior agressividade quando os
469 cladódios inoculados foram mantidos em umidade elevada por aproximadamente 12 h e o
470 aumento desse período não resultou em incremento na agressividade. Como a umidade
471 influencia o início e o desenvolvimento da doença, sendo indispensável para a penetração e a
472 colonização inicial do hospedeiro (Agrios 2005), esses resultados podem indicar que o
473 processo de penetração e colonização pelas espécies de Botryosphaeriaceae ocorreu
474 rapidamente após atingirem o sítio de infecção.

475 As espécies de Botryosphaeriaceae diferiram quanto às necessidades de umidade
476 relativa elevada para terem sucesso nas infecções dos cladódios de *N. cochenillifera*, que pode
477 ser decorrente da diferença nas espécies em relação às condições ótimas para infecção e
478 capacidade de colonização do hospedeiro. Como exemplo, *N. batangarum* necessitou o menor
479 período de duração da umidade elevada (12,7 h) para expressar a máxima agressividade (17,2
480 mm), mas *L. iraniensis* expressou um nível de agressividade mais elevado (22,9 mm) e
481 necessitou para isso um período maior de alta umidade (14,2 h).

482 O fato de todas as espécies de Botryosphaeriaceae induzirem sintomas nos cladódios
483 de *N. cochenillifera* depois um período 72 h sem umidade elevada após da inoculação indica a
484 grande capacidade adaptativa destas espécies em condições subótimas (Milgroom 2015). A
485 redução da agressividade das espécies de Botryosphaeriaceae o aumento do intervalo de
486 tempo entre a inoculação e o início da umidade elevada indica que o dessecamento no sítio de
487 inoculação pode ser um fator importante na eficiência da infecção. Portanto, espécies que

488 apresentam maior capacidade de suportar o período de dessecação antes da presença de
489 umidade, como verificada para *L. theobromae* e *L. pseudotheobromae*, têm um potencial
490 adaptativo maior sob condições subótimas de umidade, refletindo em maior habilidade
491 competitiva no sítio de infecção. Além disso, foi constatada uma relação proporcional entre a
492 taxa de redução da lesão devido ao atraso início da umidade e o tamanho máximo da lesão,
493 pois espécies com maiores níveis de agressividade apresentam maiores taxas de redução da
494 lesão em função do atraso no início da umidade elevada.

495 O nível de agressividade do patógeno é um fator que afeta o desenvolvimento de uma
496 epidemia de doença de planta, pois patógenos mais agressivos são capazes de infectar o
497 hospedeiro rapidamente, garantindo uma produção mais rápida de grandes quantidades de
498 inóculo e doença, diferente de patógenos de menor agressividade (Agrios 2005; Milgroom
499 2015). Em todos os experimentos realizados nesse estudo foram constatadas diferenças de
500 agressividade entre as espécies de Botryosphaeriaceae inoculadas em cladódios de *N.*
501 *cochenillifera*, assemelhando-se ao registrado recentemente em outros hospedeiros (Marques
502 et al. 2013; Netto et al. 2014, 2017; Correia et al. 2016; Manawasinghe et al. 2016;
503 Mayorquin et al. 2016; Olmo et al. 2016).

504 Na maioria dos experimentos desse estudo, *L. iraniensis* foi a espécie mais agressiva e
505 *L. pseudotheobromae* a menos agressiva. Esses resultados assemelham-se aos obtidos com a
506 inoculação de espécies de Botryosphaeriaceae em ramos de cajueiro, embora *N. batangaraum*
507 também tenha apresentado elevada agressividade (Netto et al. 2017). A agressividade mais
508 elevada pode estar associada à maior velocidade de penetração e capacidade de colonização
509 dos tecidos do hospedeiro, sendo estas frequentemente relacionadas a mecanismos mais
510 eficientes de patogênese (Milgroom 2015), no entanto, o comportamento diferencial na
511 agressividade entre as espécies de Botryosphaeriaceae permanece inexplicado (Úrbez-Torres
512 2011).

513 A menor agressividade de *L. pseudotheobromae* em cladódios de *N. cochenillifera*
514 comparada a outras espécies de Botryosphaeriaceae assemelha-se ao constatado em ramos de
515 cajueiro (Coutinho et al. 2017; Netto et al. 2017) e videira (Correia et al. 2016), bem como em
516 frutos de mamão (Netto et al. 2014) e manga (Marques et al. 2013) em estudos realizados no
517 Brasil. Em contraste, *L. pseudotheobromae* foi a espécie mais agressiva em manga na
518 Austrália (Sakalidis et al. 2011), em *Terminalia catappa* (Combretaceae) em Camarões
519 (Begoude et al. 2010) e em eucalipto na China (Chen et al., 2011). Discrepâncias na
520 agressividade entre as espécies de Botryosphaeriaceae podem estar relacionadas com as
521 diferenças na origem e agressividade dos isolados, no tipo de tecido inoculado, nos períodos
522 de incubação, no tipo de inóculo utilizado, na idade do hospedeiro ou na diferença de
523 suscetibilidade da cultivar, entre outros fatores (Úrbez-Torres 2011).

524 Em conclusão, fatores como presença e idade do ferimento, temperatura, duração e
525 tempo de início da umidade elevada afetam a agressividade de *L. iraniensis*, *L.*
526 *pseudotheobromae*, *L. theobromae* e *N. batangarum* em cladódios de *N. cochenillifera*. O
527 conjunto dos resultados indica que não existem explicações simples para os efeitos dessas
528 variáveis na agressividade das espécies de Botryosphaeriaceae em *N. cochenillifera*, uma vez
529 que diferentes fatores podem ocorrer simultaneamente e o estudo dessas interações pode
530 propiciar informações importantes para redução dos danos causados por espécies de
531 Botryosphaeriaceae em *N. cochenillifera*.

532

533 **Agradecimentos**

534

535 Esta pesquisa foi financiada pelo Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária (INTA,
536 Argentina) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES,
537 Brasil). O primeiro autor foi parcialmente suportado por uma bolsa de estudo de doutorado do

538 INTA. S. J. Michereff é beneficiário de uma bolsa de pesquisa do Conselho Nacional de
539 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil).

540

541 **Referências**

542

543 Abdollahzadeh, J., Javadi, A., Mohammadi, E. G., Zare R., & Phillips, A. J. L. (2010).
544 Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia*,
545 25, 1–10.

546 Adaskaveg, J. E., Förster, H., & Sommer, N. F. (2002). Principles of postharvest pathology
547 and management of decays of edible horticultural crops. In A. Kader (Ed.), *Postharvest*
548 *technology of horticultural crops* (pp. 163–195). Davis: University of California
549 Agriculture and Natural Resources.

550 Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology*. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press.

551 Amponsah, N. T., Jones, E. E., Ridgway, H. J., Jaspers, M. V. (2014). Factors affecting
552 *Neofusicoccum luteum* infection and disease progression in grapevines. *Australasian*
553 *Plant Pathology*, 43, 547–556.

554 Barbera, G. (2001). História e importância econômica e agroecológica. In: G. Barbera, P.
555 Inglese, & E. Pimienta-Barrios, (Eds.), *Agroecologia, cultivo e usos da palma*
556 *fornageira* (pp. 1–11). Roma/Brasília: FAO/Sebrae.

557 Barbosa, R. S., Calvalcanti, V. A. L., Lopes, E. B., & Araújo, E. (2012). Doenças da palma
558 forrageira. In: E. B. Lopes (Ed.), *Palma forrageira: cultivo, uso atual e perspectivas de*
559 *utilização no semiárido nordestino* (pp. 81–98). João Pessoa: EMEPA/FAEPA.

560 Begoude, B. A. D, Slippers B., Wingfield, M. J., & Roux, J. (2010). Botryosphaeriaceae
561 associated with *Terminalia catappa* in Cameroon, South Africa and Madagascar.
562 *Mycological Progress*, 9, 101–123.

- 563 Chen, S. F., Pavlic, D., Roux, J., Slippers, B., Xie, Y. J., Wingfield, M. J., & Zhou, X. D.
564 (2011). Characterization of Botryosphaeriaceae from plantation-grown *Eucalyptus*
565 species in South China. *Plant Pathology*, *60*, 739–751.
- 566 Conforto, C., Lima, N. B., Silva, F. J. A., Michereff, S. J. (2017). Etiology and
567 characterization of fungal species associated with cladode brown spot in Prickly Pear
568 Cactus in Brazil with a description of new species of *Lasiodiplodia*. *Plant Pathology*,
569 em preparação.
- 570 Correia, K. C., Silva M. A., Morais Junior, M. A., Armengol, J., Phillips, A. J. L., Camara, M.
571 P. S., & Michereff S. J. (2016). Phylogeny, distribution and pathogenicity of
572 *Lasiodiplodia* species associated with dieback of table grape in the main Brazilian
573 exporting region. *Plant Pathology*, *65*, 92–103.
- 574 Coutinho, I. B. L., Freire, F. C. O., Lima, C. S., Lima, J. S., Gonçalves, F. J. T., Machado, A.
575 R., Silva, A. M. S., & Cardoso, J. E. (2017). Diversity of genus *Lasiodiplodia*
576 associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. *Plant Pathology*,
577 *66*, 90–104.
- 578 Desprez-Loustau, M. L., Marçais, B., Nageleisen, L. M., Piou, D., & Vannini, A. (2006).
579 Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. *Annals of Forest Science*,
580 *63*, 597–612.
- 581 Droby, S., Wisniewski, M., & Benkeblia, N. (2011). Postharvest pathology of tropical and
582 subtropical fruit and strategies for decay control. In E. M. Yahia (Ed.), *Postharvest*
583 *biology and technology of tropical and subtropical fruits: fundamental issues* (pp. 194–
584 223) Cambridge: Woodhead Publishing.
- 585 Félix, C., Duarte, A. S., Vitorino, R., Guerreiro, A. C., Domingues, P., Correia, A. C., Alves,
586 A., & Esteves, A. C. (2016). Temperature modulates the secretome of the
587 phytopathogenic fungus *Lasiodiplodia theobromae*. *Frontiers in Plant Science*, *7*, 1096.

- 588 Ferreira, M. A., Bispo, S. V., Rocha Filho, R. R., Urbano S. A., & Costa, C. T. F. (2012). The
589 use of cactus as forage for dairy cows in semi-arid regions of Brazil. In: Konvalina, P.
590 (Ed.), *Organic farming and food production* (pp. 169–189). Rijeka: InTech.
- 591 Hills, F. S. (2001). Anatomia e morfologia. In: G Barbera, P. Inglese, E. Pimienta-Barrios
592 (Eds.). *Agroecologia, cultivo e usos da palma forrageira* (pp. 28–35) Roma/Brasília:
593 FAO/Sebrae.
- 594 Kim, K. W., Park, E. W., & Ahn, K. K. (1999). Pre-penetration behaviour of *Botryosphaeria*
595 *dothidea* on apple fruits. *Plant Pathology Journal*, 15, 223–227.
- 596 Lima, G. S. A., Assunção, I. P., Martins, R. B., Santos, H. V., & Michereff, S. J. (2011).
597 Development and validation of a standard area diagram set for assessment of
598 *Alternaria* spot on the cladodes of the prickly pear cactus. *Journal of Plant Pathology*,
599 93, 691–695.
- 600 Lopes, E. B., Santos, D. C. E., & Vasconcelos, M. F. (2012). Cultivo da palma forrageira. In:
601 E. B. LOPES, (Ed.). *Palma forrageira: cultivo, uso atual e perspectivas de utilização*
602 *no semiárido nordestino* (pp. 21–60) João Pessoa: EMEPA/FAEPA.
- 603 Manawasinghe, I. S., Phillips, A. J. L., Hyde, K.D., Chethana, K. W. T., Zhang, W., Zhao, W.
604 S., Yan, J. Y., & Li, X. H. (2016). Mycosphere Essays 14: Assessing the aggressiveness
605 of plant pathogenic Botryosphaeriaceae. *Mycosphere*, (special issue), Doi
606 10.5943/mycosphere/si/1b/7
- 607 MAPA. (2017). Agrofit - Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Resource database.
608 http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Accessed on 15
609 January 2017.
- 610 Marques, W. M., Lima, N. B., Morais Junior, M. A., Barbosa, M. A. G., Souza, B. O,
611 Michereff, S. J., Phillips, A. J. L., & Câmara, M. P. S. (2013). Species of *Lasiodiplodia*
612 associated with mango in Brazil. *Fungal Diversity*, 61, 181–193.

- 613 Mayorquin, J. S., Wang, D. H., Twizeyimana, M., & Eskalen, A. (2016). Identification,
614 distribution, and pathogenicity of Diatrypaceae and Botryosphaeriaceae associated with
615 citrus branch canker in the southern California desert. *Plant Disease*, *100*, 2402–2413.
- 616 Michailides, T. J. (1991). Pathogenicity distribution and infection courts of *Botryosphaeria*
617 *dothidea* on pistachio. *Phytopathology*, *81*, 566–573.
- 618 Milgroom, M. G. (2015). *Population biology of plant pathogens: genetics, ecology and*
619 *evolution*. St. Paul: APS Press.
- 620 Netto, M. S. B., Assunção, I. P., Lima, G. S. A., Marques, M. W., Lima, W. G., Monteiro, J.
621 H. A., Balbino, V. Q., Michereff, S. J., Phillips, A. J. L., & Câmara, M. P. S. (2014).
622 Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. *Fungal*
623 *Diversity*, *67*, 127–141.
- 624 Netto, M. S. B., Lima, W. G., Correia, K. C., Da Silva, C. F. B., Thon, M., Martins, R. B.,
625 Miller, R. N. G., Michereff, S. J., & Câmara, M. P. S. (2017)
626 Analysis of phylogeny, distribution and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species
627 associated with gummosis of Anacardium in Brazil with a new species of *Lasiodiplodia*.
628 *Fungal Biology*, aceito para publicação.
- 629 Oliveira, F. T., Souto, J. S., Silva, R. P., Andrade Filho, F. C., & Pereira Júnior, E. B. (2010).
630 Palma forrageira: adaptação e importância para os ecossistemas áridos e semiáridos.
631 *Revista Verde*, *4*, 27–37.
- 632 Olmo, D., Armengol, J., León, M., & Gramaje, D. (2016). Characterization and pathogenicity
633 of Botryosphaeriaceae species isolated from almond trees on the island of Mallorca
634 (Spain). *Plant Disease*, *100*, 2483–2491.
- 635 Pusey, P. L. (1989). Influence of water stress on susceptibility of nonwounded peach bark to
636 *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Disease*, *73*, 1000–1003.

- 637 Qiu, Y., Steel, C., Ash, G. J., & Savocchia, S. (2016). Effects of temperature and water stress
638 on the virulence of Botryosphaeriaceae spp. causing dieback of grapevines and their
639 predicted distribution using CLIMEX in Australia. *Acta Horticulturae*, 1115, 171–181.
- 640 Rebman, J. P., & Pinkava, D. J. (2001) *Opuntia* cacti of North America an overview.
641 *Entomologist*, 4, 474–483.
- 642 Sakalidis, M. L., Ray, J. D., Lanoiselet, V., Hardy, G. E. Stj., & Burgess, T. I. (2011).
643 Pathogenic Botryosphaeriaceae associated with *Mangifera indica* in the Kimberley
644 Region of Western Australia. *European Journal of Plant Pathology*, 130, 379–391.
- 645 Sammonds, J., Jaspers, M. V., Jones, E. E. (2016). Pre-infection processes of
646 *Botryosphaeriaceae* spp.: adhesion of conidia to different substrata. *Plant Pathology*,
647 65, 1142–1152.
- 648 Santos, D. C. E., Araújo, L. F., Lopes, E. B., & Vasconcelos, M. F. (2012). Usos e aplicações
649 da palma forrageira. In: E. B. Lopes (Ed.), *Palma forrageira: cultivo, uso atual e*
650 *perspectivas de utilização no semiárido nordestino* (pp 99–150). João Pessoa:
651 EMEPA/FAEPA.
- 652 Shew, H. D., & Shew, B. B. (2017). What is plant pathology? In: Ownley, B. H., & Trigiano,
653 R. N. (Eds.), *Plant pathology: concepts and laboratory exercises*. 3rd ed. (pp. 3–21)
654 Boca Raton: CRC Press.
- 655 Souza, A. E. F., Nascimento, L. C., Araújo, E., Lopes, E. B., & Souto, F. M. (2010).
656 Ocorrência e identificação dos agentes etiológicos de doenças em palma forrageira
657 (*Opuntia ficus-indica* Mill.) no semiárido paraibano. *Biotemas*, 3, 11–20.
- 658 Úrbez-Torres, J. R. (2011). The status of *Botryosphaeriaceae* species infecting grapevines.
659 *Phytopathologia Mediterranea*, 50, S5–S45.

- 660 Úrbez-Torres, J. R., & Gubler, W. D. (2011). Susceptibility of grapevine pruning wounds to
661 infection by *Lasiopodia theobromae* and *Neofusicoccum parvum*. *Plant Pathology*, *60*,
662 261–270.
- 663 van Niekerk, J., Strever, A., Du Toit, G., Halleen, F., & Fourie, P. (2011). Influence of water
664 stress on Botryosphaeriaceae disease expression in grapevines. *Phytopathologia*
665 *Mediterranea*, *50*, 151–165.

666 **Tabela 1** Isolados de quatro espécies de Botryosphaeriaceae obtidos de cladódios de *Nopalea*
 667 *cochenillifera* (cv. Miúda) com sintomas de mancha marrom coletados em três municípios do
 668 Estado de Pernambuco e utilizados no estudo
 669

Isolado ¹	Espécie	Município	No. Acesso GenBank	
			ITS	EF1- α
CMM 2331	<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	São João	KY569606	KY569606
CMM 2432	<i>L. iraniensis</i>	São João	KY569609	KY569609
CMM 2250	<i>L. pseudotheobromae</i>	São João	KY569604	KY569604
CMM 2285	<i>L. pseudotheobromae</i>	São João	KY569605	KY569605
CMM 2460	<i>L. theobromae</i>	São João	KY569611	KY569611
CMM 2462	<i>L. theobromae</i>	Bom Conselho	KY569612	KY569612
CMM 1426	<i>Neofusicoccum batangarum</i>	Caruaru	KU052219	KT878646
CMM 1427	<i>N. batangarum</i>	Bom Conselho	KU052220	KT878645

670

671 ¹ CMM = Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos "Prof. Maria Menezes" da Universidade Federal Rural
 672 de Pernambuco (Recife, Pernambuco, Brasil)

673 **Tabela 2** Efeito da idade do fermento na agressividade (diâmetro da lesão) de quatro
 674 espécies de Botryosphaeriaceae inoculadas em cladódios de *Nopalea cochenillifera* (var.
 675 Miúda)
 676

Espécie	Idade do fermento que reduz pela metade o tamanho da lesão ¹ (h)	Diâmetro máximo da lesão ² (mm)
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	22,5 c ³	18,9 a
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	39,9 a	10,2 b
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	32,7 b	10,7 b
<i>Neofusicoccum batangarum</i>	34,6 b	12,2 b

677
 678 ^{1,2} Valores estimados pelo ajuste do modelo de regressão não-linear logístico dose-resposta com três parâmetros:
 679 $y = a/(1+(x/b)^c)$, em que y = diâmetro da lesão (mm); a , b e c são parâmetros da regressão; x = idade do fermento
 680 (*Lasiodiplodia iraniensis*: $y=18,9314/(1+(x/22,4632)^{2,4146}$, $R^2=0,9812$, $P>F=0,0273$; *L. pseudotheobromae*:
 681 $y=9,9956/(1+(x/39,8513)^{3,1289}$, $R^2=0,9836$, $P>F=0,0164$; *L. theobromae*: $y=10,7580/(1+(x/32,7329)^{4,9964}$,
 682 $R^2=0,9927$, $P>F=0,0073$; *Neofusicoccum batangarum*: $y=12,2174/(1+(x/34,5721)^{3,0097}$, $R^2=0,9731$;
 683 $P>F=0,0269$)
 684 ³ Dados são a média de 20 repetições por espécie, considerando 10 repetições por isolado e duas replicações do
 685 experimento. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste LSD
 686 de Fisher ($P=0,05$)

687 **Tabela 3** Efeito da temperatura na agressividade (diâmetro da lesão) de quatro espécies de
 688 Botryosphaeriaceae inoculadas em cladódios de *Nopalea cochenillifera* (var. Miúda)
 689

Espécie	Temperatura ótima ¹ (°C)	Diâmetro máximo da lesão ² (mm)
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	25,3 b ³	14,8 a
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	22,2 c	10,9 b
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	30,4 a	12,1 b
<i>Neofusicoccum batangarum</i>	23,4 c	15,7 a

690
 691 ^{1,2} Valores estimados pelo ajuste do modelo de regressão não-linear Lorentzian: $y = a/(1+((x-b)/c)^2)$, em que y =
 692 diâmetro da lesão; a, b e c são parâmetros da regressão; x = temperatura (*Lasiodiplodia iraniensis*:
 693 $y=7,5746/(1+((x-7,2589)/25,3196)^2$, $R^2=0,9834$, $P>F=0,0036$; *L. pseudotheobromae*: $y= 7,5621/(1+((x-$
 694 $7,1636)/22,1551)^2$, $R^2=0,9666$, $P>F=0,0103$; *L. theobromae*: $y=7,9489/(1+((x-7,6275)/30,4010)^2$, $R^2=0,9689$,
 695 $P>F=0,01395$; *Neofusicoccum batangarum*: $y=7,0522/(1+((x-8,9883)/23,3667)^2$, $R^2=0,9867$; $P>F=0,0026$)
 696 ³ Dados são a média de 20 repetições por espécie, considerando 10 repetições por isolado e duas replicações do
 697 experimento. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste LSD
 698 de Fisher ($P=0,05$)
 699

700 **Tabela 4** Efeito da duração da umidade relativa elevada ($\cong 100\%$) na agressividade (diâmetro
 701 da lesão) de quatro espécies de Botryosphaeriaceae inoculadas em cladódios de *Nopalea*
 702 *cochenillifera* (var. Miúda)

703

Espécie	Duração ótima da umidade ¹ (h)	Diâmetro máximo da lesão ² (mm)	
		Umidade ótima	Sem umidade
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	14,2 b ³	22,9 a	11,3 a
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	13,7 bc	12,5 c	9,0 c
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	16,0 a	10,1 c	8,4 c
<i>Neofusicoccum batangarum</i>	12,7 c	17,2 b	10,3 b

704

705 ^{1,2} Valores estimados pelo ajuste do modelo de regressão não-linear Lorentzian: $y = a/(1+((x-b)/c)^2)$, em que $y =$
 706 diâmetro da lesão; a , b e c são parâmetros da regressão; $x =$ duração da umidade (*Lasiodiplodia iraniensis*:
 707 $y=9,3124/(1+((x-18,4937)/15,2031)^2$, $R^2=0,9995$, $P>F=0,0008$; *L. pseudotheobromae*: $y=-7,8726/(1+((x-$
 708 $4,8496)/13,7398)^2$, $R^2=0,9984$, $P>F=0,0025$; *L. theobromae*: $y=7,5343/(1+((x-2,9612)/15,9849)^2$, $R^2=0,9864$,
 709 $P>F=0,0203$; *Neofusicoccum batangarum*: $y=9,2933/(1+((x-8,1215)/12,7176)^2$, $R^2=0,9823$; $P>F=0,0203$)

710 ³ Dados são a média de 20 repetições por espécie, considerando 10 repetições por isolado e duas replicações do
 711 experimento. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste LSD
 712 de Fisher ($P=0,05$)

713 **Tabela 5** Efeito do início da umidade relativa elevada ($\cong 100\%$) na agressividade (diâmetro da
 714 lesão) de quatro espécies de Botryosphaeriaceae inoculadas em cladódios de *Nopalea*
 715 *cochenillifera* (var. Miúda)

716

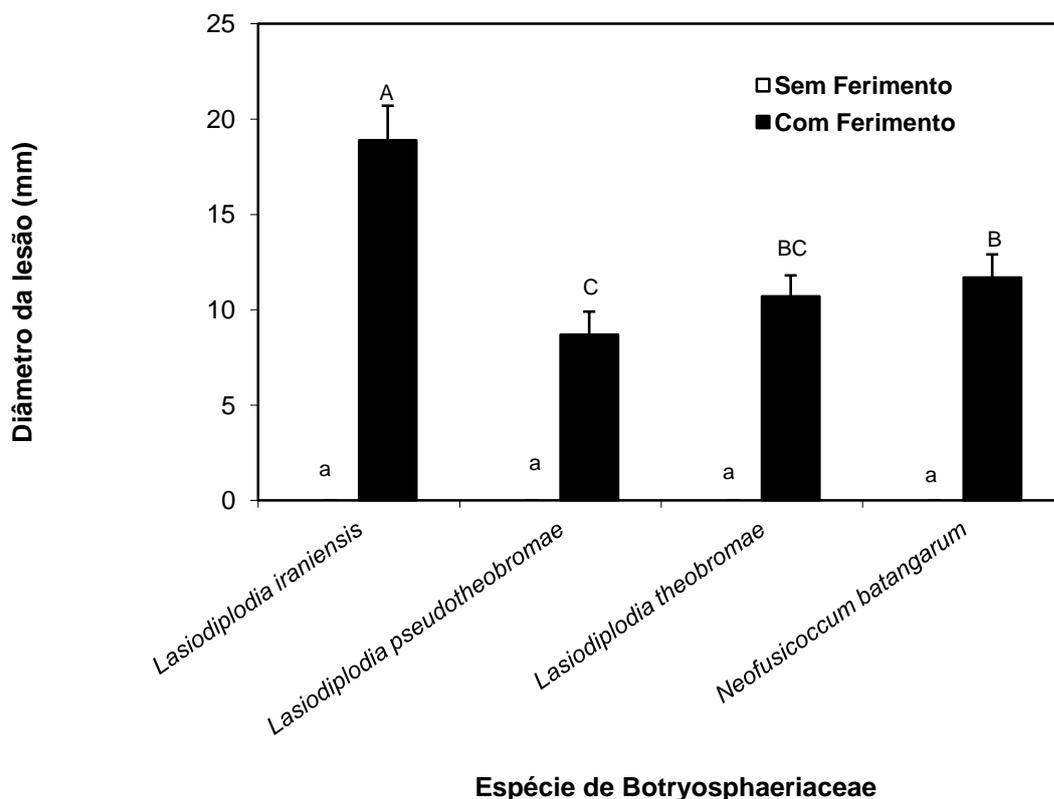
Espécie	Taxa de redução do tamanho da lesão ¹ (mm/h)	Diâmetro máximo da lesão ² (mm)
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	1,5 a ³	23,4 a
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	0,6 b	13,2 c
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	0,4 b	11,9 c
<i>Neofusicoccum batangarum</i>	1,2 a	19,3 b

717

718 ^{1,2} Valores estimados pelo ajuste do modelo de regressão linear: $y = a + bx^{0,5}$, em que y = diâmetro da lesão; a e b
 719 são parâmetros da regressão; x = tempo para início da umidade (*Lasiodiplodia iraniensis*: $y = 23,3890 - 1,5496x^{0,5}$,
 720 $R^2 = 0,9953$, $P > F = 0,0002$; *L. pseudotheobromae*: $y = 13,1843 - 0,5729x^{0,5}$, $R^2 = 0,9751$, $P > F = 0,0017$; *L.*
 721 *theobromae*: $y = 11,8559 - 0,4492x^{0,5}$, $R^2 = 0,9679$, $P > F = 0,0015$; *Neofusicoccum batangarum*: $y = 19,3533 -$
 722 $1,2183x^{0,5}$, $R^2 = 0,9893$, $P > F = 0,0005$)

723 ³ Dados são a média de 20 repetições por espécie, considerando 10 repetições por isolado e duas replicações do
 724 experimento. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste LSD
 725 de Fisher ($P = 0,05$)

726

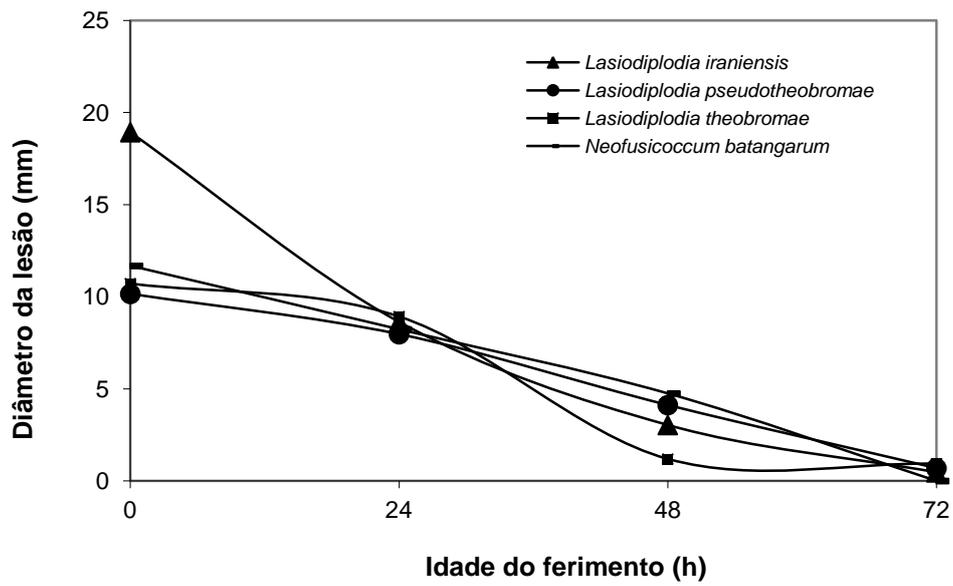


727

728

729 **Fig. 1** Efeito do ferimento na agressividade (diâmetro da lesão) de quatro espécies de
 730 Botryosphaeriaceae inoculadas em cladódios de *Nopalea cochenillifera* (var. Miúda). Barras
 731 acima das colunas representam os erros padrões das médias. Colunas (médias) com a mesma
 732 letra minúscula na inoculação sem ferimento e maiúscula na inoculação com ferimento não
 733 diferem significativamente entre si pelo teste LSD de Fisher ($P=0,05$)

734



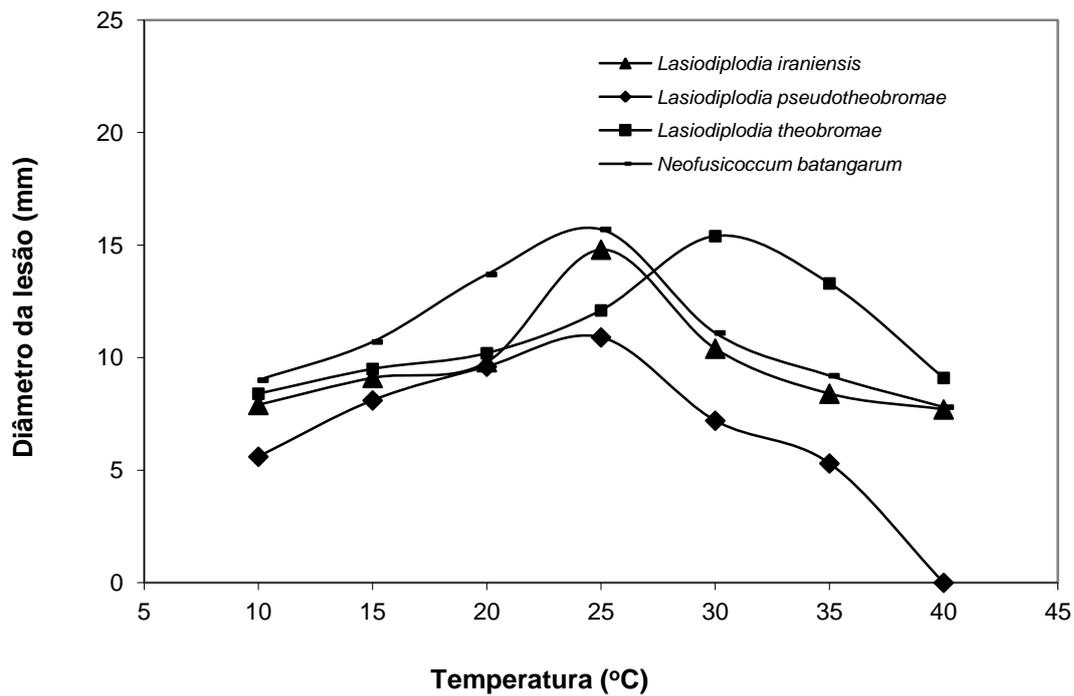
735

736

737 **Fig. 2** Efeito da idade do ferimento na agressividade (diâmetro da lesão) de quatro espécies de

738 Botryosphaeriaceae inoculadas em cladódios de *Nopalea cochenillifera* (var. Miúda)

739

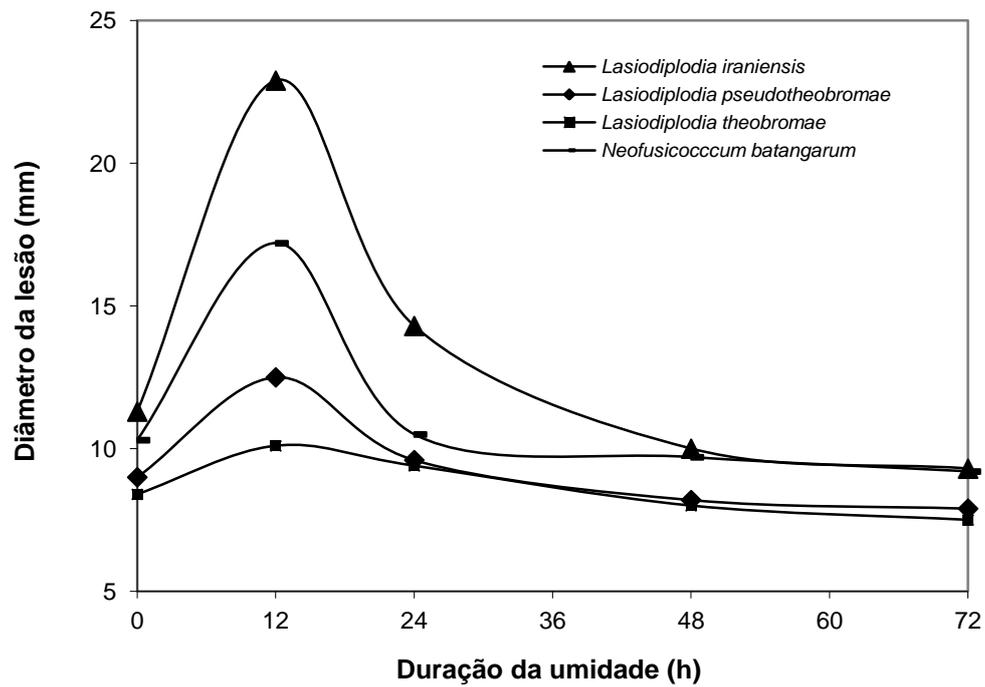


740

741

742 **Fig. 3** Efeito da temperatura na agressividade (diâmetro da lesão) de quatro espécies de
743 Botryosphaeriaceae inoculadas em cladódios de *Nopalea cochenillifera* (var. Miúda)

744

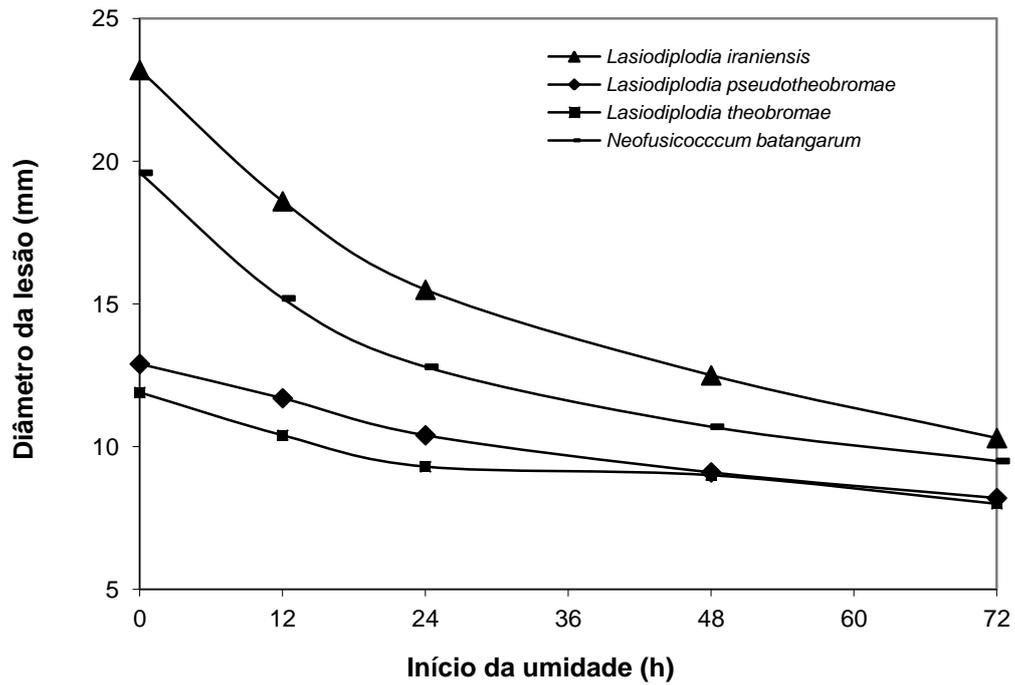


745

746

747 **Fig. 4** Efeito da duração da umidade relativa elevada ($\cong 100\%$) na agressividade (diâmetro da
748 lesão) de quatro espécies de Botryosphaeriaceae inoculadas em cladódios de *Nopalea*
749 *cochenillifera* (var. Miúda)

750



751

752

753 **Fig. 5** Efeito do início da umidade relativa elevada ($\cong 100\%$) na agressividade (diâmetro da
754 lesão) de quatro espécies de Botryosphaeriaceae inoculadas em cladódios de *Nopalea*
755 *cochenillifera* (var. Miúda)

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

1. Uma grande diversidade de espécies fúngicas está associada à mancha marrom da palma forrageira miúda (*Nopalea cochenillifera*) em Pernambuco;
2. *Alternaria alternata*, até recentemente considerada a única espécie fúngica associada à mancha marrom da palma forrageira miúda no Brasil, não está associada à doença em Pernambuco;
3. Todas as espécies fúngicas registradas em associação a com mancha marrom em Pernambuco são reportadas pela primeira vez no mundo no gênero *Nopalea*;
4. Todas as espécies fúngicas registradas demonstraram potencial para causar a mancha marrom em palma forrageira miúda, mas *Lasiodiplodia iraniensis* e *Fusarium lunatum* se destacam das demais pela elevada agressividade;
5. A presença de ferimento é essencial para que ocorra a infecção pelas espécies de Botryosphaeriaceae e o desenvolvimento de sintomas de mancha marrom nos cladódios de palma forrageira miúda;
6. A elevação da idade do ferimento nos cladódios de palma forrageira miúda reduz a agressividade espécies de Botryosphaeriaceae e essas diferem em relação ao nível de sensibilidade à idade do ferimento;
7. As espécies de Botryosphaeriaceae são patogênicas em cladódios de palma forrageira miúda em uma grande amplitude de temperaturas, mas diferem em relação à temperatura ótima para expressão da máxima agressividade;
8. Umidade relativa elevada não é essencial para que ocorra a infecção pelas espécies de Botryosphaeriaceae, mas essas diferem em relação ao período ótimo de duração da umidade.