



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



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Tese de Doutorado

**Fungos associados ao declínio da videira
no Nordeste do Brasil**

Kamila Câmara Correia

**Recife – PE
2014**

KAMILA CÂMARA CORREIA

**FUNGOS ASSOCIADOS AO DECLÍNIO DA VIDEIRA
NO NORDESTE DO BRASIL**

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 – 2014**

FUNGOS ASSOCIADOS AO DECLÍNIO DA VIDEIRA NO NORDESTE BRASILEIRO

KAMILA CÂMARA CORREIA

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

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

Prof. Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara (UFRPE) – Coorientador

Prof. Dr. Josep Armengol (UPV) – Coorientador

**RECIFE – PE
FEVEREIRO – 2014**

FUNGOS ASSOCIADOS AO DECLÍNIO DA VIDEIRA NO NORDESTE BRASILEIRO

KAMILA CÂMARA CORREIA

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 27/02/2014.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Sami Jorge Michereff (UFRPE)

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Rui Sales Junior (UFERSA)

Dr. Ailton Reis (CNPQ/EMBRAPA)

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

Profa. Dra. Sônia Maria Alves de Oliveira (UFRPE)

**RECIFE – PE
FEVEREIRO – 2014**

À minha mãe Josilete de Souza Câmara, ao meu pai Luiz Carlos Correia, à minha irmã Kaline Câmara Correia e à minha amada sobrinha Maria Alessandra por tudo o que passamos e vamos passar juntos. Com carinho e agradecimento.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força para superar todos os obstáculos.

À minha família pelo apoio e incentivo nas minhas escolhas.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores Sami Jorge Michereff e Marcos Paz Saraiva Câmara, pelas orientações, ensinamentos e confiança durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professos do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia - PPGF da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE e da Unidade de Patologia Vegetal da Universidade Politécnica de Valencia – UPV, pelos ensinamentos que me foram passados.

Aos funcionários do PPGF e da UPV, pelas contribuições nos momentos necessários.

Aos integrantes dos Laboratórios de Epidemiologia de Doenças de Plantas e Micologia pela amizade, companheirismos e ajuda.

Aos colegas da Área de Fitossanidade pelos momentos de diversão e, principalmente, pela ajuda nos momentos de muito trabalho.

Aos amigos que “estão longe”, por entenderem minha ausência e pela atenção nos momentos que preciso.

Aos amigos de Recife, pela presença em todos os momentos.

Finalmente, a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho, muito obrigada.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	vi
RESUMO GERAL	viii
GENERAL ABSTRACT	ix
CAPÍTULO I – Introdução Geral	10
Referências Bibliográficas	38
CAPÍTULO II – Fungal trunk pathogens associated with table grape decline in Northeastern Brazil	55
Summary	57
Introduction	57
Materials and methods	58
Results and discussion	60
Acknowledgements	62
Literature cited	63
CAPÍTULO III – Species of <i>Lasiodiplodia</i> responsible for table grape dieback in the main Brazilian exporting region	69
Abstract	71
Introduction	71
Materials and methods	73
Results	78
Discussion	81
Acknowledgements	85
References	85
CONCLUSÕES GERAIS	101

RESUMO GERAL

Durante os últimos anos, um declínio de plantas de videira produtoras de uva de mesa tem sido notado em viveiros, plantações jovens e parreirais da região Nordeste do Brasil. Nesta região, os sistemas de manejo para a produção são adaptados às condições ambientais específicas de uma viticultura tropical. Amostras de plantas de videira, com sintomas de declínio, foram obtidas em 2010 em viveiros, plantações jovens e parreirais localizados nos vales do São Francisco, Assú e Siriji, e foram submetidas ao isolamento de fungos. Patógenos do tronco da videira foram identificados por métodos morfológicos e moleculares. As espécies isoladas incluíram *Botryosphaeria mamane*, *Campylocarpon fasciculare*, *C. pseudofasciculare*, *Lasiodiplodia crassipora*, *L. parva*, *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae*, *Neofusicoccum parvum*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Pm . parasiticum* e *Phaeomoniella chlamydospora*. Todas são relatadas pela primeira vez em videira no Brasil, com exceção de *L. theobromae*. Além disso, *B. mamane*, *L. parva* e *L. pseudotheobromae* são relatados pela primeira vez em videira no mundo, e *C. fasciculare* é relatada pela primeira vez em videira no continente americano. Estes resultados mostram a grande diversidade de patógenos fúngicos do tronco encontrados em uvas de mesa na região Nordeste do Brasil. Numa segunda fase do estudo, foram identificadas e caracterizadas as espécies de *Lasiodiplodia* responsáveis pela morte descendente da videira no Vale do São Francisco, a principal região exportadora brasileira de uvas de mesa. Foram obtidos 112 isolados de *Lasiodiplodia* de 14 áreas de cultivo de videira, localizadas em Casa Nova, Juazeiro e Petrolina. Identificações dos fungos foram feitas usando uma combinação de morfologia com análise filogenética baseada nas sequências parciais dos genes fator de alongação 1- α (EF1- α) e espaço transcrito interno (ITS). Foram identificadas oito espécies de *Lasiodiplodia*: *L. brasiliense*, *L. crassipora*, *L. egyptiaca*, *L. euphorbicola*, *L. hormozganensis*, *L. jatrophiicola*, *L. pseudotheobromae* e *L. theobromae*. Apenas três dessas espécies já haviam sido relatadas em videira, enquanto todas as outras espécies são relatadas pela primeira vez em associação com esta hospedeira no Brasil e no mundo. *Lasiodiplodia theobromae* foi a espécie prevalente. Todas as espécies de *Lasiodiplodia* foram patogênicas em ramos verdes destacados de videira (cv. Isabel), com *L. brasiliense* sendo a mais virulenta.

Palavras-chave: Botryosphaeriaceae, *Campylocarpon*, *Lasiodiplodia*, *Phaeoacremonium*, *Phaeomoniella*, filogenia, *Vitis vinifera*.

GENERAL ABSTRACT

During the last years a decline of table grape plants has been noticed in nurseries, young plantations and vineyards of the Northeastern region of Brazil. In this region, the management systems for grapevine production are adapted to the specific environmental conditions of a tropical viticulture. Samples of table grape plants showing decline symptoms were obtained from grapevine nurseries, young plantations and vineyards located in the São Francisco, Assú and Siriji Valleys in 2010, and were subjected to fungal isolation. Grapevine trunk pathogens were identified using morphological and molecular methods. Species recovered included *Botryosphaeria mamane*, *Campylocarpon fasciculare*, *C. pseudofasciculare*, *Lasiodiplodia crassispora*, *L. parva*, *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae*, *Neofusicoccum parvum*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Pm. parasiticum* and *Phaeomoniella chlamydospora*. They are all reported for the first time on grapevine in Brazil, with the exception of *L. theobromae*. Moreover, *B. mamane*, *L. parva* and *L. pseudotheobromae* are reported for the first time on grapevine worldwide, and *C. fasciculare* is reported for the first time on grapevine in the American continent. These results show the high diversity of fungal trunk pathogens found in table grapes in Northeastern Brazil. In a second phase of the study, were identified and characterized the species of *Lasiodiplodia* responsible for table grape dieback in São Francisco Valley, the main Brazilian exporting region. One hundred and twelve *Lasiodiplodia* isolates were obtained from 14 vineyards, located in Casa Nova, Juazeiro and Petrolina. Fungal identifications were made using a combination of morphology together with a phylogenetic analysis based on partial sequences of translation elongation factor 1- α (EF1- α) and internal transcribed spacers (ITS) genes. Eight species of *Lasiodiplodia* were identified: *L. brasiliense*, *L. crassispora*, *L. egyptiaca*, *L. euphorbicola*, *L. hormozganensis*, *L. jatrophiicola*, *L. pseudotheobromae* and *L. theobromae*. Only three these species had previously been reported in grapevine, while all the other species are reported for the first time in association with this host in Brazil and worldwide. *Lasiodiplodia theobromae* was the prevalent species. All species of *Lasiodiplodia* were pathogenic on detached green shoots of grapevine (cv. Isabel), with *L. brasiliense* being the most virulent.

Key-words: Botryosphaeriaceae, *Campylocarpon*, *Lasiodiplodia*, *Phaeoacremonium*, *Phaeomoniella*, phylogeny, *Vitis vinifera*.

Capítulo I

Introdução Geral

FUNGOS ASSOCIADOS AO DECLÍNIO DA VIDEIRA NO NORDESTE DO BRASIL

INTRODUÇÃO GERAL

1. A videira

A videira (*Vitis* spp.) é cultivada em todo o mundo e o fruto é utilizado em uma ampla gama de produtos, incluindo frutas frescas, compotas, sucos, vinhos e passas. A videira pertence à família Vitaceae e ao gênero *Vitis* L., o qual consiste de dois subgêneros: *Euvitis* e *Muscadinia*. Os subgêneros são distintos por possuírem diferentes números de cromossomos (38 para *Euvitis* e 40 para *Muscadinia*) e características morfológicas. O subgênero *Muscadinia* possui apenas uma espécie cultivada (*V. rotundifolia* Michx.), de grande interesse por sua resistência à filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae* Fitch) e algumas doenças. A maior parte das videiras cultivadas pertence ao subgênero *Euvitis* que se divide em três grandes grupos geográficos: americano, asiático e europeu. O grupo americano é formado por espécies com pouca importância para viticultura, porém com grande potencial como porta-enxertos por sua resistência à filoxera. Neste grupo se destacam as espécies *V. rupestris* Scheele, *V. berlandieri* Planch., *V. riparia* Michx e *V. labrusca* L., sendo que esta última produz excelentes frutos para consumo *in natura* e para a produção de sucos. O grupo asiático possui outras espécies de pouca importância para viticultura atual. O grupo europeu possui apenas uma espécie: *V. vinifera* L. Essa espécie representa a maioria das videiras cultivadas para a produção de uva e vinho em nível mundial, por suas excelentes qualidades, mas é muito sensível à filoxera e várias doenças (CREASY; CREASY, 2009).

A espécie *V. vinifera* se destaca pela sua importância econômica e elevada diversidade morfológica e genética. A facilidade de propagação assexuada deu origem a um número estimado em 14.000 cultivares, com diferentes finalidades: uvas de mesa, passas, sucos e vinhos. Este número é ampliado anualmente como resultado de diversos programas de melhoramento em andamento em vários países. Apesar da variabilidade genética disponível, o número de cultivares utilizadas em escala comercial é relativamente pequeno (LEÃO, 2010).

A China é o principal país produtor de uva, com 9,1 milhões de toneladas produzidas em 2011. A Itália, que até recentemente era o principal produtor, agora ocupa a segunda posição (7,1 milhões de toneladas), seguida dos Estados Unidos da América (6,8 milhões de

toneladas). O Brasil ocupa a 11^a posição entre os países produtores de uva (FAO, 2014), com uma produção de 1,4 milhões de toneladas em 2013 (IBGE, 2014).

2. Importância da viticultura no Nordeste brasileiro

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, superado apenas pela China e pela Índia, com uma produção que supera os 759 milhões de toneladas. A base agrícola da cadeia produtiva das frutas no Brasil abrange 2,2 milhões de hectares, gerando 4 milhões de empregos diretos e um PIB agrícola de US\$ 11 bilhões (KIST et al., 2012). Nesse contexto, a viticultura é uma atividade de extrema importância para a sustentabilidade de milhares de pequenas propriedades e tem se tornado determinante no desenvolvimento de algumas regiões e na geração de empregos em grandes empreendimentos que produzem uvas de mesa e para processamento (POLL et al., 2013). A região Sul destaca-se como a maior produtora no Brasil, tendo participado com 66,5% da produção (940,5 mil toneladas), seguida da região Nordeste, com 19,8% da produção (280,6 mil toneladas) (IBGE, 2014). Muito embora a região Sul apresente-se como a maior produtora brasileira de uva, vale ressaltar que a uva produzida nessa região destina-se, principalmente, à produção de vinho, enquanto na região Nordeste predomina a produção de uvas de mesa. A produção brasileira de uva destinada ao consumo *in natura* representa cerca de 50% da produção nacional (SILVA; COELHO, 2010).

As uvas de mesa no Brasil podem ser divididas em dois grupos: um formado pelas uvas finas (*V. vinifera*), representado principalmente por cultivares como a Itália e suas mutações (Rubi, Benitaka e Brasil), Red Globe, Red Meire e as sem sementes (Centennial Seedless, Superior Seedless ou Festival, Thompson Seedless, Perlette, Catalunha e Crimson Seedless); e outro pelas uvas comuns ou rústicas (*Vitis labrusca* L.), cujas representantes principais são as cultivares Niagara Rosada e Isabel (PROTAS; CAMARGO, 2011).

A uva de mesa é uma das principais frutas frescas exportadas pelo Brasil. Em 2011, foram exportadas 59,4 mil toneladas de uvas de mesa, com faturamento de 136 milhões de dólares (FAO, 2014). A região Nordeste é responsável por 99% das exportações brasileiras de uvas finas de mesa, onde são cultivados cerca de 9.500 ha de videira. Nesta região, o Vale do São Francisco, localizado na região semiárida dos estados da Bahia e Pernambuco, é o principal pólo produtor de uvas finas de mesa, sendo responsável por 98% da produção (ARAÚJO; RAMALHO, 2009; LAZZAROTTO; FIORAVANÇO, 2013). O município de

Petrolina, no estado de Pernambuco, destacou-se como principal produtor de uva de mesa em 2012, com área cultivada de 4.650 ha e produção de 153,4 mil toneladas (IBGE, 2014).

É necessário ressaltar a importância que o mercado interno desempenha na dinâmica da viticultura do Vale do São Francisco, uma vez que além da função complementar ao mercado externo, inclusive, determinando a economia de escala que a atividade exportadora exige, estima-se que o mercado interno absorva cerca de 70% da produção regional (SILVA; COELHO, 2010).

Além do Vale do São Francisco, existem outros pequenos polos de produção de uvas de mesa no Nordeste brasileiro, com destaque para o localizado no Vale do Siriji, na região úmida do estado de Pernambuco, onde é cultivada videira há mais de 40 anos em pequenas propriedades e a produção de uvas comuns se destina ao mercado interno, não sendo exportada (TAVARES; LIMA, 2009). O município de São Vicente Férrer se destaca como principal produtor de uva no Vale do Siriji, com 500 hectares cultivados e produção de 9,5 mil toneladas em 2012 (IBGE, 2014).

A viticultura no Vale do São Francisco é realizada em regime de irrigação. Em virtude da adaptação e do comportamento fisiológico diferenciado das diversas cultivares às condições edafo-climáticas predominantes, os processos fisiológicos das plantas são acelerados, resultando que em cerca de um ano após o plantio pode ser colhida a primeira safra. Considerando que o ciclo produtivo da videira pode oscilar de 90 a 130 dias, dependendo da cultivar, podem ser obtidas até duas safras e meia por ano, mediante a adequação das técnicas de produção, como podas, modificação da irrigação e uso de reguladores de crescimento. Isso possibilita a produção de uvas durante todo o ano, bem como a obtenção de produtividades maiores que 30 t/ha/ano, superando as obtidas nas demais regiões produtoras brasileiras (CAMARGO; PROTAS; MELLO, 2008; SILVA; COELHO, 2010).

3. Doenças da videira no Nordeste brasileiro

As condições climáticas do Nordeste brasileiro aliadas às técnicas modernas de irrigação, manejo da copa, fertilizantes e agentes químicos reguladores de eventos fisiológicos permitiram que o Vale do São Francisco se destacasse nas últimas décadas como grande produtor e exportador de uvas finas de mesa. Entretanto, estas condições intensas de manejo propiciam e, em alguns casos, potencializam problemas fitossanitários que, se não

contornados, podem trazer sérios prejuízos econômicos e, a médio/longo prazo, diminuir a vida útil dos parreirais. Entre as doenças que afetam a videira nesta região destacam-se o míldio (*Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni), o oídio (*Uncinula necator* (Schwein.) Burril.), a ferrugem (*Phakopsora euvitis* Ono), a morte descendente (*Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl.), o cancro bacteriano (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye), o enrolamento das folhas (*Grapevine leafroll-associated virus 1-9* - GLRaV 1-9), a malformação infecciosa (*Grapevine fanleaf virus*) e os nematóides das galhas (*Meloidogyne* spp.) (BARBOSA et al., 2010).

Nos últimos anos, declínios severos de plantas têm sido relatados em viveiros, plantações jovens e campos de produção de uva de mesa no Nordeste brasileiro. Os sintomas observados incluem pobre crescimento inicial, reduzido vigor demonstrando amarelecimento de folhas, murcha e morte descendente, bem como diferentes sintomas na madeira, como necrose setorial em forma de V e estrias marrons e negras que aparecem como pontos negros necróticos em ramos e troncos seccionados longitudinalmente. Esses sintomas são similares àqueles descritos em outras regiões viticultoras mundiais, os quais têm sido associados com várias doenças de declínio (BERTSCH et al., 2013; BRUEZ et al., 2013; GARCÍA-JIMÉNEZ; RAPOSO; ARMENGOL, 2010; GRAMAJE; ARMENGOL, 2011; HALLEEN; FOURIE; CROUS, 2006; LARIGNON, 2012; LUQUE et al., 2009; MOHAMMADI et al., 2013; MOLLER; KASIMATIS, 1981; MOSTERT et al., 2006; MUGNAI; GRANITI; SURICO, 1999; ÚRBEZ-TORRES, 2011; ÚRBEZ-TORRES et al., 2014).

4. Declínio da videira

Vários estudos sobre doenças e fungos patogênicos associados a declínios de porta-enxertos (AROCA et al., 2006; AROCA et al., 2010; FOURIE; HALLEEN, 2004a), plantas jovens (AGUSTÍ-BRISACH; ARMENGOL, 2013; AGUSTÍ-BRISACH et al., 2013; ALANIZ et al., 2007; GIMÉNEZ-JAIME et al., 2006; GRAMAJE; ARMENGOL, 2011; RUMBOS; RUMBOU, 2001; SOFIA et al., 2013) e plantas adultas (AMPONSAH et al., 2011; ARMENGOL et al., 2001; BASKARATHEVAN et al., 2012; GUBLER et al., 2004; MARTIN; COBOS, 2007; ÚRBEZ-TORRES et al., 2009; MOHAMMADI et al., 2013; PITT et al., 2010; QIU et al., 2011; ÚRBEZ-TORRES et al., 2014; YAN et al., 2013) de videira têm sido realizados em nível mundial. As principais doenças observadas em plantas de videira com declínio são: doença de Petri, esca, eutipiose, pé-preto e morte descendente. A maioria

dessas doenças causa grandes danos às plantas de videira, muitas vezes levando à redução drástica da produção e morte das plantas (BERTSCH et al., 2013; GARCÍA-JIMÉNEZ; RAPOSO; ARMENGOL, 2010; LARIGNON, 2012).

4.1. Doença de Petri

A doença de Petri recebe o nome do primeiro pesquisador (L. Petri) que descreveu os sintomas típicos da doença em 1912, embora seja citada com outros nomes na literatura, como “goma preta”, “declínio da videira jovem” e “esca jovem” (MORTON, 2000; MUNDY; MANNING, 2010). Essa doença se caracteriza pelo declínio de plantas jovens e causa importantes perdas econômicas em videiras destinadas à produção de vinho e de uva de mesa em todo o mundo, pois reduz a viabilidade e a produtividade, levando frequentemente à morte das plantas (DUBOS; LARIGNON, 1988; EDWARDS et al., 2007; MORTON, 2000). A doença afeta videiras muito jovens, desde a fase de viveiro e parreirais recém plantados. Quando a incidência e a severidade são elevadas, o arranque das mesmas é, normalmente, a única decisão a tomar, uma vez que os custos associados à manutenção dessas videiras doentes se revelam insustentáveis (PINTO, 2010).

Os sintomas da doença de Petri podem variar de ano para ano dependendo da idade das videiras e da intensidade de ataque. Os tipos de sintomas dependem de inúmeros fatores, dos quais se destacam a severidade da doença, a composição da comunidade fúngica presente em cada planta e as condições de estresse a que estas estão sujeitas, sobretudo nos primeiros anos após a plantação. Certos sintomas da doença podem facilmente ser confundidos com os causados por agentes de natureza biótica e abiótica, como falta de nutrientes, ataque de vírus, como o do enrolamento foliar, podas em que se deixa carga excessiva nos lançamentos (MUGNAI; GRANITI; SURICO, 1999). As videiras podem permanecer assintomáticas, ou seja, não demonstram sintomas, pois estes fungos são endófitos capazes de viver no hospedeiro sem que haja sintomas visíveis (SCHECK et al., 1998). A doença de Petri pode causar a apoplexia ou morte repentina, mas frequentemente ocorre um lento declínio da planta, com crescimento vegetativo reduzido, brotos com entrenós curtos, folhas de menor tamanho e cloróticas, com posterior murcha das folhas e morte dos ramos. Nos bagas podem aparecer pontuações negras e num estado mais avançado da doença ocorre o dessecamento dos bagas. Em plantas afetadas é comum encontrar um sistema radicular pobremente desenvolvido. Os sintomas internos podem ser observados quando são realizados cortes transversais nos troncos e ramos, observando-se pontuações negras e estrias castanhas ou

pretas nos tecidos do xilema. Nos porta-enxertos, na zona do enxerto ou na madeira (tronco), os vasos danificados podem emitir uma exsudação gomosa de cor negra (GARCÍA-JIMÉNEZ; RAPOSO; ARMENGOL, 2010; LARIGNON, 2012; MUGNAI; GRANITI; SURICO, 1999).

A doença de Petri é causada principalmente pelos fungos *Phaeoconiella* (*Pa.*) *chlamydospora* (Gams, Crous, M.J.Wingf. & Mugnai) Crous & Gams e várias espécies de *Phaeocremonium* (*Pm.*) W. Gams, Crous & M.J. Wingf. (DUBOS, 2002; LARIGNON, 2012; LARIGNON et al., 2009; MOSTERT et al., 2006; MUGNAI; GRANITI; SURICO, 1999).

O gênero *Phaeocremonium* foi descrito por Crous et al. (1996) e pertence ao filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Diaporthales e família Togniniaceae (MYCOBANK, 2014). O teleomorfo deste gênero é *Togninia* Berl. Morfologicamente, o gênero *Phaeocremonium* situa-se entre os gêneros *Acremonium* Link: Fr. e *Phialophora* Medlar. As colônias, em meio de cultura extrato de malte-ágar (EMA), são normalmente lisas, de densidade média, aspecto feltroso e por vezes lembrando lanoso. A cor varia entre tonalidades de castanho, amarelo pálido a bege ou rosa a rosa escuro. O micélio apresenta hifas ramificadas e septadas, isoladas ou agregadas. O centro da colônia é castanho, tornando-se castanho pálido a hialino nas margens. Pode ser liso, verrugoso ou ligeiramente verrugoso. Os clamidósporos podem estar ausentes ou presentes. Os conidióforos podem ser ramificados ou simples, aéreos ou submersos. São eretos, quase cilíndricos quando não ramificados, ligeiramente afunilados e ondulados. O comprimento é variável podendo ser de 2-4 μm com 1-7 septos; majoritariamente são castanhos claros, empalidecendo em direção à extremidade. Pequenas verrugas podem ser observadas na base; normalmente são monofialídicas na extremidade com uma ou duas fiálides adicionais. As células conidiogênicas são fiálides discretas ou integradas nos conidióforos, terminais ou laterais, na maioria monofialídicas, mas por vezes polifialídicas. Podem ser pouco verrugosas, ligeiramente verrugosas ou lisas, de cor castanha pálido a hialino. Podem-se observar três classes diferentes de fiálides. Os conídios apresentam-se agregados em estruturas redondas e viscosas, nos ápices das fiálides são hialinos, asseptados de parede lisa. Os conídios são na maioria cilíndricos, oblongos ou elipsóides, ocasionalmente reniformes ou mais alargados (6-4 μm de comprimento e 2-1 μm de largura). Os caracteres morfológicos mais úteis na diferenciação das espécies de *Phaeocremonium* são a morfologia dos conidióforos, o tipo e a forma das fiálides e o tamanho e o tipo dos conídios. Outros caracteres importantes são o crescimento micelial, a temperatura máxima de crescimento em meio de cultura extrato de malte-ágar (EMA), a produção ou não

de uma pigmentação amarela nos meios batata-dextrose-ágar (BDA) e farinha de aveia-ágar (FAA) (MOSTERT et al., 2006).

Inicialmente foram descritas seis espécies de *Phaeoacremonium*: *Pm. parasiticum* (Ajello, Georg & C.J.K. Wang) W. Gams, Crous & M.J. Wingf., considerada espécie tipo, *Pm. aleophilum* W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & L. Mugnai, *Pm. angustius* W. Gams, Crous & M.J. Wingf., *Pm. chlamydosporum* W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & Mugnai, *Pm. inflatipes* W. Gams, Crous, M.J. Wingf. e *Pm. rubrigenum* W. Gams, Crous, M.J. Wingf. Mais tarde, Dupont et al. (2000) descreveram *Pm. viticola* J. Dupont e Groenewald et al. (2001) descreveram *Pm. mortoniae* W. Gams & Crous. Posteriormente, foram descritas novas espécies de *Phaeoacremonium* (ESSAKHI et al., 2008; MOSTERT et al., 2006). No entanto, estudos culturais e morfológicos, associados com análises filogenéticas da região ITS e das sequências parciais dos genes da β -tubulina, actina ou calmodulina, permitiram a reclassificação e a criação de novas espécies dentro do gênero *Phaeoacremonium*, uma vez que a distinção entre espécies, apenas por critérios morfológicos, se revelou pouco consistente (ESSAKHI et al., 2008; GRAHAM; JOHNSTON; WEIR, 2009; MOSTERT et al., 2006). Uma metodologia polifásica para identificação das espécies do gênero *Phaeoacremonium* foi desenvolvida com a utilização de marcadores morfo-culturais e as sequências parciais do gene β -tubulina (MOSTERT et al., 2006). Com os resultados obtidos, foi construída uma base de dados para o gênero, que se encontra disponível no site da Centralbureau voor Schimmelcultures (CBS, Utrecht, Holanda) - <http://www.cbs.knaw.nl/phaeoacremonium/>.

Trinta e sete espécies de *Phaeoacremonium* são consideradas válidas (MYCOBANK, 2014), das quais 25 foram constatadas em videira, com destaque para *Pm. aleophilum*, a mais comum e amplamente distribuída (MARTÍN; MARTIN, 2013; MUNDY; MANNING, 2010). As espécies de *Phaeoacremonium* têm distribuição mundial e ampla gama de hospedeiros, incluindo plantas lenhosas, larvas de insetos e seres humanos (GUARRO et al., 2003; MOSTERT et al., 2006).

Estudos detalhados mostraram que *Pm. chlamydosporum* era morfológicamente e filogeneticamente diferente das outras espécies do mesmo gênero, passando a ser designado como *Phaeomoniella chlamydospora*, formando-se assim um novo gênero, *Phaeomoniella* Crous & W. Gams (Pa.) (CROUS; GAMS, 2000), que reside no filo Ascomycota, ordem Eurotiomycetes, classe Chaetothyriales e família Herpotrichiellaceae (MYCOBANK, 2014). Até o momento, o teleomorfo deste gênero não é conhecido (MARTÍN; MIERA; MARTÍN, 2013).

Morfologicamente, o gênero *Phaeomoniella* difere ligeiramente do gênero *Phaeoacremonium*. Em cultura, *Phaeomoniella* tem um crescimento semelhante às leveduras. Os conidióforos são proeminentes e escuros na parte basal, os conídios são subhialinos. O micélio consiste em hifas septadas e ramificadas, simples ou filamentoso; as hifas são verrugosas a tuberculadas, castanho-esverdeadas, tornando-se mais claras a hialinas em direção à região conidiogênica. Os clamidósporos estão presentes e formam microesclerotos em meio de cultura ágar-água (AA). Os conidióforos erguem-se de hifas aéreas ou submersas, eretos, simples, subcilíndricos, castanho-esverdeados, tornando-se mais claros em direção à extremidade, verrugosos a lisos e septados. As células conidiogênicas são terminais, monofialídicas, alongadas, ampuliformes a lageniformes ou subcilíndricas. Os conídios apresentam-se agregados em forma globosa e mucilaginosa nos ápices das células conidiogênicas. São pigmentados, asseptados, de paredes lisas, oblongos-elipsoidais a ovóides. As colônias em EMA apresentam coloração cinzenta-olivácea a preta-olivácea, com micélio aéreo disperso (CROUS; GAMS, 2000). Oito espécies de *Phaeomoniella* são consideradas válidas (MYCOBANK, 2014), sendo *Pa. chlamydospora* a mais comum em videira (LARIGNON, 2012; MUNDY; MANNING, 2010; MORTON, 2000; MARTÍN; MARTIN, 2013; ÚRBEZ-TORRES et al., 2014).

Além de *Phaeomoniella* e *Phaeoacremonium*, várias espécies de *Cadophora* Lagerberg & Melin têm sido envolvidas no declínio de videiras jovens (HALLEEN; MOSTERT; CROUS, 2007; OVERTON; STEWART; WENNER, 2005), com destaque para *Cadophora luteo-olivacea* (F.H. Beyma) Harrington & McNew, que é bastante comum em várias áreas de viticultura em todo o mundo (GRAMAJE; MOSTERT; ARMENGOL, 2011; LARIGNON, 2012; NAVARRETE et al., 2011). *Pleurostomophora richardsiae* (Nannf.) L. Mostert, W. Gams & Crous também tem sido associada com a doença de Petri (HALLEEN et al., 2007; LARIGNON, 2012; ROLSHAUSEN et al., 2010).

As principais fontes de inóculo dos patógenos causadores da doença de Petri são os materiais de propagação vegetativa infectados, solos infestados e o inóculo aéreo (MOSTERT et al., 2006). As plantas-mãe de porta-enxertos e de garfos encontram-se frequentemente infectadas, dando origem a estacas portadoras de inóculo (FOURIE; HALLEEN, 2004a; GIMÉNEZ-JAIME et al., 2006; OLIVEIRA; REGO; NASCIMENTO, 2004; WHITEMAN et al., 2007). Os materiais de propagação são contaminados durante as várias operações realizadas nos viveiros, como hidratação, enxertia e calogênese (GRAMAJE; ARMENGOL, 2011; WAITE et al., 2013; WHITEMAN et al., 2002). A contaminação também pode ocorrer durante o processo de enraizamento em viveiro, através das raízes ou de feridas existentes no

porta-enxerto, ou resultantes da poda. No campo, os conídios de *Pa. chlamydospora*, quando transportados pelo vento, colonizam a videira através das feridas da poda. No entanto, o mesmo não é verificado no caso de *Pm. aleophilum*. Os esporos de *Pa. chlamydospora* podem ser detectados durante todo o ano, ao contrário dos de *Pm. aleophilum*, que apenas são detectados durante o período vegetativo da videira. As condições favoráveis à ocorrência de infecções por *Pa. chlamydospora* são temperaturas médias entre 7°C e 15°C e máximas entre 12°C e 18°C, acompanhadas de chuva que facilita a disseminação dos esporos e a contaminação das feridas de poda (LARIGNON; DUBOS, 2000).

4.2. Esca

A esca é uma das doenças mais antigas da videira, tendo sido observada na época do Império Romano na região do mar Mediterrâneo (DUBOS; LARIGNON, 1988). A doença afeta principalmente plantas adultas e tornou-se um fator limitante para muitas áreas de produção de uva ao redor do mundo. Mudanças nas práticas culturais, como reduzidos cuidados sanitários dos materiais de propagação, pouca proteção dos ferimentos das podas e a proibição ou restrição ao uso do arsenito de sódio, contribuíram grandemente para o aumento da importância dessa doença ao longo dos anos (CHIARAPPA, 2000; SURICO; MUGNAI; MARCHI, 2006).

A esca é uma doença complexa, onde os sintomas e a sua expressão ao longo do tempo são altamente variáveis (MUGNAI; GRANITI; SURICO, 1999; SURICO; MUGNAI; MARCHI, 2006). A esca pode apresentar sintomas externos sob duas formas, conforme sua evolução: crônica ou aguda. Na forma crônica ou lenta, as folhas mostram cloroses internervais ou descolorações, normalmente avermelhadas nas castas tintas e amarelas nas castas brancas, que posteriormente evoluem para necroses. Inicialmente as manchas surgem como pontuações amareladas. Os sintomas têm início nas folhas da base estendendo-se posteriormente às folhas restantes. As videiras afetadas por esta forma de esca continuam vivas nos anos seguintes, embora muitas vezes a produção não chegue ao final do ciclo. A produção reduz e os racimos podem dessecar prematuramente. Na forma aguda ou apoplética ocorre a morte repentina da planta, geralmente nos meses de verão e, às vezes, sem que as plantas tenham manifestado previamente nenhum tipo de sintoma. Nas duas formas a doença desenvolve internamente uma podridão seca e esponjosa da madeira nas zonas centrais do tronco e/ou braços. Esta podridão começa normalmente a partir de uma ferida de poda, com coloração creme ou amarelada, e aparece separada por uma linha negra de outra zona mais

exterior, de consistência dura, na qual aparecem pontos ou estrias necróticas (DUBOS; LARIGNON, 1988; GARCÍA-JIMÉNEZ; RAPOSO; ARMENGOL, 2010; MUGNAI; GRANITI; SURICO, 1999; LARIGNON, 2012).

A esca é causada por um complexo de fungos. A podridão esponjosa da madeira tem sido associada principalmente a *Fomitiporia mediterranea* Fischer, enquanto da linha negra e dos pontos e estrias necróticas têm sido isolado maioritariamente *Pa. chlamydospora* e diversas espécies de *Phaeoacremonium* (DUBOS, 2002; MUGNAI; GRANITI; SURICO, 1999; LARIGNON, 2012; LARIGNON et al., 2009). Embora os agentes causais sejam conhecidos, não se conhece com exatidão o processo de infecção ou os fatores que influenciam o desenvolvimento da doença (SURICO; MUGNAI; MARCHI, 2006). Assim, essa doença pode ser diferenciada entre esca jovem, quando são observados sintomas foliares e pequenas necroses na madeira, e esca propriamente dita, quando aparecem podridões esponjosas na madeira causadas por *F. mediterranea* ou outros basidiomicetos (SURICO; MUGNAI; MARCHI, 2006).

O gênero *Fomitiporia* Murril pertence ao filo Basidiomycota, classe Agaricomycetes, ordem Hymenochaetales e família Hymenochaetaceae (MYCOBANK, 2014), sendo *F. mediterranea* a espécie mais comum em videira (DUBOS, 2002; GARCÍA-JIMÉNEZ; RAPOSO; ARMENGOL, 2010; LARIGNON, 2012; SURICO; MUGNAI; MARCHI, 2006). Essa espécie possui um micélio branco que, ao envelhecer, se torna amarelo e cotonoso em meio batata-dextrose-ágar (BDA). Os basidiosporos são hialinos, lisos e globosos, de 6-7 x 5-6 µm (FISCHER, 2002).

A doença de Petri e a esca são consideradas estreitamente relacionadas entre si, sendo postulada uma seqüência no ataque dos fungos causadores: *Pa. chlamydospora* e/ou *Phaeoacremonium* spp. atuariam como pioneiros na degradação da madeira favorecendo a colonização posterior desta por *F. mediterranea* e outros basidiomicetos (LARIGNON; DUBOS, 1997; MUGNAI; GRANITI; SURICO, 1999).

4.3. Eutipiose

A eutipiose é uma doença que afeta principalmente plantas adultas. É conhecida como uma das doenças mais destrutivas de tecidos lenhosos de videiras e causa perdas importantes em nível mundial (CARTER, 1988; DUBOS, 2002; GARCÍA-JIMÉNEZ; RAPOSO; ARMENGOL, 2010; GARRIDO; SÔNEGO, 2004; LARIGNON, 2012).

A madeira atacada apresenta na secção transversal uma necrose setorial de cor marrom escura. Diferentemente da esca, a madeira afetada pela eutipiose continua tendo uma consistência dura. As plantas afetadas desenvolvem brotos débeis, com entrenós curtos, folhas menores e deformadas, cloróticas e com necroses, geralmente marginais. Os racimos, de aspecto normal até a floração, apresentam um forte corrimento (CARTER, 1988; DUBOS, 2002). Quando os braços e troncos são afetados, o sintoma característico é a necrose interna na madeira em forma de “V” (LUQUE et al., 2009).

A eutipiose é causada pelo fungo *Eutypa lata* (Pers:Fr.) Tul. & C. Tul (anamorfo *Libertella blepharis* A.L. Smith). O gênero *Eutypa* Tul. & C. Tul. pertence ao filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Xylariales e família Diatrypaceae (MYCOBANK, 2014), sendo *E. lata* a espécie-tipo e a mais comum em videira (DUBOS, 2002; GARCÍA-JIMÉNEZ; RAPOSO; ARMENGOL, 2010; LARIGNON, 2012 SURICO; MUGNAI; MARCHI, 2006), embora outros gêneros e espécies da família Diatrypaceae possam estar associados à doença (LARIGNON, 2012; LUQUE et al., 2012).

Em meio de cultura, *E. lata* apresenta micélio aéreo branco que ao envelhecer se torna acinzentado. Os ascósporos são amarelo-pálidos e ligeiramente curvados, com tamanho de 6,5-11 x 1,2-2 μm e são produzidos em ascas de 30-60 x 5-7,5 μm que possui um poro apical (CARTER, 1988).

Os ascosporos do fungo inicialmente infectam e colonizam os tecidos do xilema através de ferimentos e então se propagam para o câmbio e para o floema nos braços e tronco das videiras. Depois de um período de incubação de três anos ou mais, um cancro é formado ao redor do ferimento infectado e os sintomas aparecem nos tecidos jovens (CARTER, 1988; MOLLER; LEHOCZKY, 1980). Nas regiões de clima temperado, peritécios de *E. lata* alcançam a maturidade no início da primavera, e os ascosporos são disseminados com as gotas de chuva (>1 mm). No final do outono, os peritécios já estão quase exauridos, entretanto, ascosporos suficientes para infectar videiras podadas durante o inverno seguinte ainda estão disponíveis. Chuva é um requisito para liberação dos ascosporos e também é responsável pelo transporte e pela deposição destas estruturas sobre os vasos condutores, expostos pela poda. A suscetibilidade dos ferimentos diminui marcadamente durante as duas semanas seguintes a poda, e após quatro semanas os ferimentos estão cicatrizados e impróprios para infecção. Os ascosporos levam 11 a 12 horas para germinar em temperatura ótima de 20 a 25°C. A germinação ocorre dentro dos vasos condutores, onde o micélio se desenvolve. A doença avança lentamente nas videiras e nenhum sintoma é visto na primeira ou na segunda estação de crescimento depois da infecção. Na terceira ou quarta estação, um

cancro é usualmente visto e acompanhado pela manifestação dos sintomas na folhagem. Vários anos podem se passar antes do comprometimento do braço ou do tronco (CARTER, 1988; DUBOS, 2002; GARCÍA-JIMÉNEZ; RAPOSO; ARMENGOL, 2010; GARRIDO; SÔNEGO, 2004; LARIGNON, 2012; SURICO; MUGNAI; MARCHI, 2006). O fungo tem uma larga gama de hospedeiros, incluindo cerca 140 espécies de plantas (FARR; ROSSMAN, 2014). A incidência da eutipiose é maior em regiões com abundante pluviometria, superior a 600 mm anuais (DUBOS, 2002).

4.4. Pé-preto

O pé-preto da videira foi descrito pela primeira vez em 1961 (MALUTA; LARIGNON, 1991) e sua incidência vem aumentando significativamente na maioria das das regiões produtoras de uva de mesa e vinho do mundo, especialmente em viveiros e parreirais novos (AGUSTÍ-BRISACH; ARMENGOL, 2013; ALANIZ et al., 2007; HALLEEN; FOURIE; CROUS, 2006).

A infecção ocorre nas raízes e no colo da planta, onde aparecem zonas escuras e necrosadas. Os sintomas característicos de pé-preto incluem uma redução na biomassa de raízes e pêlos radiculares com lesões deprimidas e necróticas (ABREO et al., 2010; ALANIZ et al., 2007; HALLEEN; FOURIE; CROUS, 2006; REGO et al., 2000). Em alguns casos, o diâmetro do enxerto de videiras velhas é mais fino abaixo do segundo nível. Para compensar a perda de raízes funcionais, uma segunda coroa de raízes de crescimento horizontal é muitas vezes formada próxima à superfície do solo. A remoção da casca do porta-enxerto revela uma descoloração preta e necrose do tecido da madeira que se desenvolve a partir da base do porta-enxerto. A medula também é compactada e descolorida (AGUSTÍ-BRISACH; ARMENGOL, 2013; DUBOS, 2002; FOURIE; HALLEEN, 2001; HALLEEN; FOURIE; CROUS, 2006; LARIGNON, 1999). Em cortes longitudinais do porta-enxerto observa-se a necrose dos vasos desde a raiz até a parte superior. Em cortes transversais, as lesões necróticas são observadas desde o córtex até a medula (ALANIZ et al., 2007). Os sintomas externos da videira mostram vigor reduzido com troncos de pequeno porte, entrenós mais curtos, desigual maturidade da madeira, folhagem esparsa, e folhas pequenas com clorose e necrose. Os sintomas de campo de pé-preto são frequentemente indistinguíveis dos causados pela doença de Petri (ABREO et al., 2010; ALANIZ et al., 2007; HALLEEN; FOURIE; CROUS, 2006; REGO et al., 2000). Quando videiras jovens são infectadas, ocorre a morte rapidamente. No entanto, com a idade da videira, a infecção resulta em um declínio mais

gradual e a morte pode ocorrer somente após um ano (GUBLER et al., 2004). Os sintomas da doença em videiras adultas (cinco anos ou mais) são observados no início da estação de crescimento. Videiras afetadas apresentam pobre crescimento, não conseguem formar brotos após a dormência de inverno e morrem no meio do verão (HALLEEN; FOURIE; CROUS, 2006).

Os agentes causais do pé-preto incluem os gêneros *Cylindrocarpon*, *Campylocarpon*, *Ilyonectria* e *Cylindrocladiella* (AGUSTÍ-BRISACH; ARMENGOL, 2013; CABRAL et al., 2012a, 2012b; CHAVERRI et al., 2011; CROUS; PHILLIPS; WINGFIELD, 1993; HALLEEN et al., 2004; HALLEEN; FOURIE; CROUS, 2006; LOMBARD et al., 2012; SCHROERS et al., 2008).

Os isolados do gênero *Cylindrocarpon* associados ao pé-preto apresentam grande variabilidade morfológica, as colônias são de diferentes cores (branca, bege, laranja e marrom) e textura, o micélio pode ser ralo ou cottonoso. Os conidióforos possuem microconídios e macroconídios. Os microconídios são subcilíndricos ou ovóides e aseptados. Os macroconídios são predominantes, podendo ser retos ou ligeiramente curvados, com as extremidades arredondadas e com um a três septos (HALLEEN et al., 2004; HALLEEN; FOURIE; CROUS, 2006). Também podem formar clamidosporos, originados no micélio ou nos macroconídios. Os clamidosporos são de coloração hialina a marrom, globosos e podem estar isolados ou agrupados (ALANIZ et al., 2007; SCHROERS et al., 2008). Inicialmente, duas espécies de *Cylindrocarpon* foram associadas com o pé-preto da videira: *C. destructans* (Zinssm.) Scholten e *C. obtusisporium* (Cooke & Harkn.) Wollenw. (SCHECK; VASQUEZ; GUBLER, 1998). Em 2004 foi descrita uma nova espécie associada ao pé-preto da videira: *C. macrodidymum* Schroers, Halleen & Crous (HALLEEN et al., 2004). Posteriormente, os isolados de *C. destructans* obtidos de videiras foram reclassificados com o nome de *C. liriodendri* J.D. MacDon. & E.E. Butler (HALLEEN; FOURIE; CROUS, 2006), com base em análises filogenéticas da região ITS e das sequências parciais dos genes da β -tubulina. No entanto, foi mantido o nome *C. destructans* para isolados procedentes de outros hospedeiros. Em 2008, uma nova espécie associada com o pé-preto da videira, *C. pauciseptatum* Schroers & Crous, foi descrita na Eslovênia e Nova Zelândia (SCHROERS et al., 2008).

Em 2004 foi descrito um novo gênero, *Campylocarpon* Halleen, Schroers & Crous, com morfologia semelhante a *Cylindrocarpon* e associado com o pé-preto da videira (HALLEEN et al., 2004). Análises filogenéticas revelaram que esses gêneros não eram filogeneticamente relacionados, apesar das semelhanças morfológicas (HALLEEN et al., 2004; SCHROERS et al., 2008). Duas espécies de *Campylocarpon* foram incluídas como

agentes causais do pé-preto: *Campylocarpon fasciculare* Schroers, Halleen & Crous e *Campylocarpon pseudofasciculare* Halleen, Schroers & Crous (HALLEEN et al., 2004).

Os gêneros *Cylindrocarpon* e *Campylocarpon* pertencem ao grupo dos fungos mitospóricos. Taxonomicamente esses gêneros se localizam dentro do filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales e Família Nectriaceae. Suas formas sexuais ou teleomorfas eram atribuídas, até pouco tempo, ao gênero *Neonectria*. No entanto, recentemente foi revisada a correlação entre *Cylindrocarpon/Neonectria* em estudos morfológicos e moleculares (CHAVERRI et al., 2011) e os isolados oriundos de diversos hospedeiros foram reclassificados em cinco gêneros, alguns deles sendo novos. Como resultado, *C. macrodidymum* e *C. liriodendri* passaram a fazer parte do gênero *Ilyonectria*, sendo designados como *I. macrodidyma* (Halleen, Schroers & Crous) P. Chaverri & Salgado e *Ilyonectria liriodendri* (Halleen, Rego & Crous) Chaverri & Salgado, respectivamente (CHAVERRI et al., 2011). Em 2012, novas espécies de *Ilyonectria* foram descritas com base em análises multigênicas suportadas por características morfológicas, sendo várias associadas com o pé-preto da videira: *Ilyonectria europaea* A. Cabral, Rego & Crous, *I. lusitanica* A. Cabral, Rego & Crous, *I. pseudodestructans* A. Cabral, Rego & Crous, *I. robusta* (A.A. Hildebr.) A. Cabral, Rego & Crous, *I. alcacerensis* A. Cabral, Oliveira & Crous, *I. estremocensis* A. Cabral, Nascimento & Crous, *I. novozelandica* A. Cabral & Crous, e *I. torresensis* A. Cabral, Rego & Crous (CABRAL et al., 2012a, 2012b).

Finalmente, outro gênero, *Cylindrocladiella* Boesew., que também é morfológicamente similar a *Cylindrocarpon*, tem sido associado com o pé-preto da videira, com destaque para as espécies *Cylindrocladiella parva* (P.J. Anderson) Boesew. e *Cyl. peruviana* (Bat., J.L. Bezerra & M.P. Herrera) Boesew. (AGUSTÍ-BRISACH et al., 2012; JONES et al., 2012; VAN COLLER et al., 2005).

Espécies de *Campylocarpon*, *Cylindrocarpon*, *Cylindrocladiella* e *Ilyonectria* são geralmente consideradas como patógenos e/ou saprófitos de uma ampla gama de hospedeiras angiospermas e gimnospermas e substratos em regiões temperadas, subtropicais e tropicais em todo o mundo (CHAVERRI et al., 2011; LOMBARD et al., 2012; VICTOR et al., 1998).

Resultados de estudos realizados em viveiros comerciais de videira sugerem que as novas plantas são infectadas durante o processo de propagação em viveiros e que até mesmo o material de plantio utilizado no processo de propagação pode ser infectado com estes patógenos. O solo de viveiros comerciais e de campos de produção constitui outra importante fonte de inóculo. Durante o processo de propagação da videira, no momento do plantio, as extremidades basais susceptíveis (especialmente na área da medula) da maioria das estacas

são parcial ou totalmente expostas, e as raízes de calos jovens também podem quebrar durante o processo de plantio, resultando em pequenas feridas suscetíveis à infecção por patógenos habitantes do solo (AGUSTÍ-BRISACH; ARMENGOL, 2013).

A produção de clamidosporos pela maioria das espécies de *Campylocarpon*, *Cylindrocarpon*, *Cylindrocladiella* e *Ilyonectria* pode permitir a sobrevivência por longos períodos no solo (HALLEEN et al., 2004). No entanto, pouca informação é atualmente disponível sobre a sobrevivência desses patógenos e o papel de clamidosporos durante infecções subsequentes (HALLEEN; FOURIE; CROUS, 2006).

O risco de ocorrência do pé-preto pode ser aumentado pelo estresse imposto em videiras jovens em viveiros e campos de produção. Fatores ambientais e práticas de manejo do parreiral, incluindo má drenagem, compactação do solo e covas de plantio inadequadas, que causam o pobre desenvolvimento radicular, bem como a má nutrição, poda drástica de videiras jovens e os efeitos das pragas e patógenos poderiam ser considerados como fatores de estresse. Os processos de propagação no viveiro e estabelecimento do parreiral incluem muitas práticas que causam estresse em videiras jovens. Durante o processo de propagação da videira, as feridas produzidas durante a enxertia, o início do desenvolvimento de raízes e da parte aérea no viveiro, o desenraizamento e a limpeza, o armazenamento a frio e o tempo excessivo em recipientes antes do estabelecimento no parreiral causam estresse nas plantas jovens. Além disso, após o plantio no campo, essas videiras são novamente estressadas pela necessidade de desenvolver as raízes e a parte aérea em um ambiente que é muitas vezes selecionado para limitar o crescimento da parte aérea (PROBST et al., 2012).

4.5. Morte descendente

A morte descendente da videira foi descrita pela primeira vez em 1974, na Hungria (LEHOCZKY, 1974) e tem sido relatada em quase todos os principais países produtores de uva, incluindo África do Sul, Alemanha, Austrália, Brasil, Chile, China, Egito, Espanha, Estados Unidos da América, França, Grécia, Hungria, Iran, Iraque, Itália, Líbano, México, Nova Zelândia, Portugal e Uruguai (ABREO et al., 2013; LARIGNON, 2012; MORALES et al., 2012; ÚRBEZ-TORRES, 2011; YAN et al., 2013). Atualmente, a morte descendente é um dos principais fatores limitantes para a longevidade e produtividade dos parreirais, aumentando consideravelmente os custos de produção (QIU et al., 2011; ÚRBEZ-TORRES; GUBLER, 2009; ÚRBEZ-TORRES, 2011; YAN et al., 2013). Na Califórnia (EUA) é responsável por perdas econômicas estimadas em mais de 260 milhões de dólares anuais

(ÚRBEZ-TORRES et al., 2012). Os prejuízos são mais graves em plantas adultas de videira, com oito anos ou mais de idade. No entanto, os agentes causais da doença têm sido freqüentemente isolados de plantas jovens com declínio (CROUS et al., 2006; RIDGWAY et al., 2011; ÚRBEZ-TORRES, 2011). Além disso, os patógenos também têm sido detectados em materiais de propagação da videira em várias partes do mundo (AROCA et al., 2006; BILLONES-BAAIJENS et al., 2013a, 2013b; OLIVEIRA; REGO; NASCIMENTO, 2004; RUMBOS; RUMBOU, 2001; SPAGNOLO et al. 2011).

A característica distintiva da morte descendente é a necrose da madeira do tronco e dos braços das videiras infectadas. Sintomas típicos da doença incluem cancrios e outros sintomas de morte descendente, como mortalidade das brotações, clorose foliar, podridão e necrose setorial da madeira, descoloração castanho-escuro da parte afetada e falha de consolidação do enxerto (BERTSCH et al., 2013; LUQUE et al., 2009; ÚRBEZ-TORRES; GUBLER, 2011). A presença de faixas pretas no xilema da madeira infectada é característica da doença, causando podridão seca geralmente em forma de cunha no tronco e nos braços. Os cancrios são mais facilmente vistos quando a videira é cortada na seção transversal (DUBOS, 2002; LARIGNON et al., 2009; LEHOCZKY, 1988). Os sintomas aparecem nas plantas com cerca de dois a quatro anos após a infecção. A doença desenvolve-se lentamente nas videiras e nenhum sintoma é observado na primeira ou na segunda estação de crescimento após a infecção. Pela terceira ou quarta estação, um cancro é usualmente visto e acompanhado pela manifestação dos sintomas na folhagem. Os principais danos observados incluem a redução da produção nas plantas atacadas e a produção de cachos menores, apresentando bagas com menor teor de açúcar e maior acidez (DUBOS, 2002; GARRIDO et al., 2011).

A morte descendente é causada por várias espécies de fungos da família Botryosphaeriaceae, que pertence ao filo Ascomycota, classe, Dothideomycetes e ordem Botryosphaeriales (MYCOBANK, 2014). A família Botryosphaeriaceae contém numerosas espécies com distribuição cosmopolita (CROUS et al., 2006; LIU et al., 2012; PHILLIPS et al., 2008; PHILLIPS et al., 2013).

A identificação morfológica das espécies de Botryosphaeriaceae é complicada por vários aspectos. Os teleomorfos de muitas espécies de Botryosphaeriaceae raramente são encontrados na natureza e os anamorfos muitas vezes apresentam sobreposição de características morfológicas, ocasionando confusão e má identificação das espécies. Esses caracteres incluem: tamanho, forma, cor, septação, espessura da parede e textura dos conídios, bem como detalhes da conidiogênese. Algumas espécies apresentam características morfológicas com plasticidade extensa. Um conceito de espécie ecológica, centrada na

especialização do hospedeiro, também tem sido utilizado para identificar novas espécies de Botryosphaeriaceae. No entanto, uma única espécie é capaz de colonizar uma ampla gama de hospedeiros e várias espécies podem ocorrer no mesmo hospedeiro, não sendo um critério confiável para determinação de espécies (SLIPPERS et al., 2007). Com isso, duas espécies intimamente relacionadas podem apresentar pequenas diferenças morfológicas tornando a identificação uma tarefa difícil, necessitando, assim, ferramentas que possam fornecer identificações mais precisas e reprodutíveis para espécies de Botryosphaeriaceae. Nesse contexto, métodos de biologia molecular têm fornecido importantes contribuições (ALVES et al., 2007).

A análise filogenética dos genes ribossomais nucleares, especialmente a região do espaço interno transcrito (ITS), proporcionou uma significativa contribuição para estudos filogenéticos de Botryosphaeriaceae, principalmente do gênero *Botryosphaeria*. Contudo, o uso apenas desse gene pode subestimar a verdadeira diversidade especialmente entre espécies estreitamente relacionadas ou crípticas (TAYLOR et al., 2000). Portanto, o gene ITS associada a outros genes, principalmente, fator de alongação 1- α (EF1- α) e beta-tubulina (β -tubulina), têm sido aplicados com sucesso para discriminar espécies crípticas e elucidar as relações filogenéticas em Botryosphaeriaceae (AMPONSAH et al., 2011; DE WET et al., 2008; PHILLIPS et al., 2013; SLIPPERS et al., 2004; VAN NIEKERK et al., 2004).

Na última revisão taxonômica da família Botryosphaeriaceae, utilizando análise multilocus baseada nas seqüências combinadas dos genes ITS, EF1- α , β -tubulina, 18S rRNA (SSU) e 28S rRNA (LSU), 17 gêneros foram reconhecidos filogeneticamente: *Barriopsis* A.J.L. Phillips, A. Alves & Crous, *Botryobambusa* R. Phookamsak, J.K. Liu & K.D. Hyde, *Botryosphaeria* Ces. & De Not., *Cophinforma* Doilom, J.K. Liu & K.D. Hyde, *Diplodia* Fr., *Dothiorella* Sacc., *Endomelanconiopsis* Rojas & Samuels, *Lasiodiplodia* Ellis & Everh., *Macrophomina* Petr., *Neodeightonia* Booth, *Neofusicoccum* Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *Neoscytalidium* Crous & Slippers, *Phaeobotryon* Theiss. & Syd., *Pseudofusicoccum* Mohali, Slippers & M.J. Wingf., *Spencermartinsia* A.J.L. Phillips, A. Alves & Crous, *Sphaeropsis* Sacc. e *Tiarospora* Höhn (PHILLIPS et al., 2013).

Os gêneros *Diplodia*, *Dothiorella* e *Lasiodiplodia* são distinguidos morfológicamente de *Fusicoccum* por possuírem conídios de parede espessa e de menor razão comprimento e largura (LUQUE; MARTOS; PHILLIPS, 2005; PHILLIPS et al., 2005). Quando maduros, os conídios da maioria das espécies de *Diplodia*, *Dothiorella* e *Lasiodiplodia* são escuros e septados (ZHOU; SMITH; STANOSZ, 2001). Apesar da semelhança dos tamanhos dos conídios entre esses gêneros, no geral, os de *Lasiodiplodia* são asseptados e hialinos quando

jovens, tornando-se escuros, septados, mais largos, ovóides e parede estriada na maturidade (BURGESS et al., 2006). Conídios de *Dothiorella* tornam-se marrons e septados no seu estágio inicial de desenvolvimento, antes mesmo de serem liberados da célula conidiogênica, enquanto conídios em *Diplodia* são hialinos e tornam-se escuros e septados somente com o amadurecimento e após a liberação da célula conidiogênica (PHILLIPS et al., 2005). A principal característica que distingue *Lasiodiplodia* de outros gêneros relacionados é a presença de paráfises picnidiais e de estrias longitudinais em conídios maduros (BURGESS et al., 2006; PHILLIPS, 2007; PHILLIPS et al., 2008; SUTTON, 1980).

Espécies de Botryosphaeriaceae ocorrem em muitas partes do mundo sob diversos nichos ecológicos, e são encontrados como endofíticos, parasitas e saprófitas em um vasto número de plantas anuais e perenes (PUNITHALINGAM, 1980; SLIPPERS; WINGFIELD, 2007; VON ARX, 1987). Várias espécies desta família são importantes patógenos de plantas que causam manchas foliares, podridões de frutos, mortes descendentes, cancos perenes e morte em culturas perenes lenhosas e plantas ornamentais economicamente importantes, bem como em espécies florestais nativas e introduzidas (FARR; ROSSMAN, 2014). Além disso, algumas espécies em Botryosphaeriaceae têm sido reconhecidas como agentes patogênicos humanos oportunistas causando infecções subcutâneas, oculares e/ou de órgãos internos (REBELL; FORSTER, 1976; SUMMERBELL et al., 2004; TAN et al., 2008; WOO et al., 2008).

Até 2013, foram reportadas 25 espécies da família Botryosphaeriaceae causando morte descendente em videira, incluindo: *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not., *Diplodia corticola* A.J.L. Phillips, A. Alves & J. Luque, *Diplodia mutila* (Fr.) Mont., *Diplodia sarmentorum* (Fr.) A.J.L. Phillips, Alves & Luque, *Diplodia seriata* De Not., *Dothiorella americana* J.R. Úrbez-Torres, F. Peduto & W.D. Gubler, *Dothiorella iberica* A.A.J.L. Phillips, J. Luque & A. Alves, *Dothiorella vidmadera* W.M. Pitt, J.R. Úrbez-Torres & Trouillas, *Lasiodiplodia crassispora* T.I. Burgess & Barber, *Lasiodiplodia missouriana* J.R. Úrbez-Torres, F. Peduto & W.D. Gubler, *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., *Lasiodiplodia viticola* J.R. Úrbez-Torres, F. Peduto & W.D. Gubler, *Neofusicoccum australe* (Slippers, Crous & M.J. Wingf.) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *Neofusicoccum kwambonambiense* Pavlic, Slippers & M.J. Wingf., *Neofusicoccum luteum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *Neofusicoccum macroclavatum* T.I. Burgess, Barber & Hardy, *Neofusicoccum mediterraneum* Crous, M.J. Wingf. & A.J.L. Phillips, *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *Neofusicoccum ribis* (Slippers, Crous & M.J. Wingf.) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips,

Neofusicoccum viticlavatum (van Niekerk & Crous) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *Neofusicoccum vitifusiforme* (van Niekerk & Crous) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *Neoscytalidium dimidiatum* (Penz.) Crous & Slippers, *Sphaeropsis porosa* (Van Niekerk & Crous) A.J.L. Phillips & A. Alves e *Spencermartinsia viticola* (A.J.L. Phillips & J. Luque) A.J.L. Phillips, A. Alves & Crous (ABREO et al., 2013; AL-SAADON et al., 2012; BERTSCH et al., 2013; BILLONES-BAAIJENS et al., 2013a, 2013b; LARIGNON, 2012; LUQUE; MARTOS; PHILLIPS, 2005; MARTIN; COBOS, 2007; PHILLIPS, 2002; PITT et al., 2013b; PUNITHALINGAM, 1976; SHOEMAKER, 1964; TAYLOR et al., 2005; ÚRBEZ-TORRES, 2011; ÚRBEZ-TORRES et al., 2012; ÚRBEZ-TORRES; GUBLER, 2009; VAN NIEKERK et al., 2006; YAN et al., 2013).

Apesar do elevado número de espécies de Botryosphaeriaceae registradas como patogênicas à videira em nível mundial, somente *B. dothidea*, *D. mutila*, *D. seriata*, *L. theobromae*, *N. australe*, *N. luteum* e *N. parvum* são comuns em muitos países (LARIGNON; DUBOS, 2001; VAN NIEKERK et al., 2004; SLIPPERS; WINGFIELD, 2007; TAYLOR et al., 2005; ÚRBEZ-TORRES, 2011; ÚRBEZ-TORRES et al., 2012; YAN et al., 2013). A prevalência e a distribuição das espécies de Botryosphaeriaceae podem ser influenciadas pelas condições climáticas, cultivares e diferentes fontes de inóculo (ABREO et al., 2013; BASKARATHEVAN et al., 2012; YAN et al., 2013).

Dentre as quatro espécies de *Lasiodiplodia* constatadas em videira em nível mundial, *L. theobromae* é a mais prevalente (QIU et al., 2011; ÚRBEZ-TORRES, 2011; YAN et al., 2013) e tem sido reportada como a mais virulenta entre as espécies de Botryosphaeriaceae (PITT et al., 2013a; ÚRBEZ-TORRES et al., 2008; ÚRBEZ-TORRES, 2011; VAN NIEKERK et al., 2006; YAN et al., 2013).

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* (Pat.) Griff. & Maubl. Posteriormente, estudos baseados nas sequências dos genes ITS e EF1- α levaram à identificação de espécies crípticas dentro do complexo de espécies *L. theobromae* (ABDOLLAHZADEH et al., 2010; ALVES et al., 2008; BEGOUDE et al., 2010; BURGESS et al., 2006; DAMM; CROUS; FOURIE, 2007; ISMAIL et al., 2012; PAVLIC et al., 2004; PAVLIC et al., 2008; ÚRBEZ-TORRES et al., 2012). Pela análise filogenética multilocus baseada nas sequências combinadas dos genes ITS, EF1- α , β -tubulina, SSU e LSU, 18 espécies de *Lasiodiplodia* foram reconhecidas até 2013: *Lasiodiplodia citricola* Abdollahz., Javadi & A.J.L. Phillips, *L. crassispora*, *Lasiodiplodia*

egyptiaca A.M. Ismail, L. Lombard & Crous, *Lasiodiplodia gilanensis* Abdollahz., Javadi & A.J.L. Phillips, *Lasiodiplodia gonubiensis* Pavlic, Slippers & M.J. Wingf., *Lasiodiplodia hormozganensis* Abdollahz., Zare & A.J.L. Phillips, *Lasiodiplodia iraniensis* Abdollahz., Zare & A.J.L. Phillips, *Lasiodiplodia lignicola* (Ariyawansa, J.K. Liu & K.D. Hyde) A.J.L. Phillips, A. Alves & Abdollahz., *Lasiodiplodia mahajangana* Begoude, Jol. Roux & Slippers, *Lasiodiplodia margaritacea* Pavlic, T.I. Burgess & M.J. Wingf., *Lasiodiplodia missouriana*, *Lasiodiplodia parva* A.J.L. Phillips, A. Alves & Crous, *Lasiodiplodia plurivora* Damm & Crous, *Lasiodiplodia pseudotheobromae* A.J.L. Phillips, A. Alves & Crous, *Lasiodiplodia rubropurpurea* Burgess, Barber & Pegg, *L. theobromae*, *Lasiodiplodia venezuelensis* T.I. Burgess, Barber & Mohali e *L. viticola*. Com exceção de *L. theobromae*, todas as demais espécies foram relatadas desde 2004 (PHILLIPS et al., 2013). Em 2014, cinco novas espécies foram descritas, todas no Brasil: *Lasiodiplodia euphorbicola* A.R. Machado & O.L. Pereira, *Lasiodiplodia jatrophicola* A.R. Machado & O.L. Pereira, *Lasiodiplodia macrospora* A.R. Machado & O.L. Pereira, *Lasiodiplodia subglobosa* A.R. Machado & O.L. Pereira (MACHADO; PINHO; PEREIRA, 2014), *Lasiodiplodia brasiliense* M.S.B. Netto, M.W. Marques & A.J.L. Phillips e *Lasiodiplodia marypalme* M.S.B. Netto, M.W. Marques, A.J.L. Phillips & M.P.S. Câmara (NETTO et al., 2014).

Espécies de *Lasiodiplodia* ocorrem principalmente em regiões tropicais e subtropicais (BURGESS et al., 2006; PUNITHALINGAM, 1980), onde causam uma variedade de doenças em mais de 690 espécies de plantas hospedeiras (FARR; ROSSMAN, 2014). Além de videira, várias outras culturas de grande importância econômica são afetadas por *Lasiodiplodia* no Brasil, especialmente abacateiro (*Persea americana* Mill.), aceroleira (*Malpighia glabra* L.), ateira (*Annona squamosa* L.), bananeira (*Musa* spp.), cacaueteiro (*Theobromae cacao* L.), cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), citrus (*Citrus* spp.), coqueiro (*Cocos nucifera* L.), goiabeira (*Psidium guajava* L.), gravioleira (*Annona muricata* L.), guaranazeiro (*Paullinia cupana* Ducke), mamoeiro (*Carica papaya* L.), mamoneira (*Ricinus communis* L.), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), mangueira (*Mangifera indica* L.), maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims), melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) e meloeiro (*Cucumis melo* L.) (CARDOSO et al., 2009; COSTA et al., 2010; FREIRE et al., 2003; FREIRE et al., 2004; FREIRE et al., 2011; LIMA et al., 2013; MARQUES et al., 2013; MUNIZ et al., 2012; NETTO et al., 2014; PEREIRA et al., 2012; TAVARES, 2002).

Existe ainda pouca informação sobre o ciclo de vida e epidemiologia de Botryosphaeriaceae em videira (BERTSCH et al., 2013; VAN NIEKERK et al., 2006). O elevado número de espécies existentes, as distintas doenças que provocam, bem como a

ocorrência simultânea de diferentes espécies numa mesma videira e, por vezes, a sua associação com outros patógenos da madeira da videira, tem dificultado muito esse conhecimento (ÚRBEZ-TORRES, 2011; VAZ, 2008).

As infecções causadas por fungos Botryosphaeriaceae iniciam nas plantas-mãe de porta enxertos e garfos (FOURIE; HALLEEN, 2002; REGO; NASCIMENTO; OLIVEIRA, 2001). As varas usadas para a obtenção de estacas vêm infectadas das videiras-mãe, originando bacelos e enxertos-prontos portadores de inóculo (BILLONES-BAAIJENS et al., 2013a, 2013b; PHILLIPS, 2002; REGO; NASCIMENTO; OLIVEIRA, 2001). Por conseguinte, a maioria dos viveiros vitícolas e dos parreirais é instalado com materiais doentes (OLIVEIRA; REGO; NASCIMENTO, 2004). A contaminação das ferramentas utilizadas durante o processo de propagação também constitui uma fonte de inóculo potencial (BILLONES-BAAIJENS et al., 2013a, 2013b). Embora as infecções causadas por Botryosphaeriaceae possam se manter latentes nos materiais propagativos, se manifestam com severidade quando as videiras jovens são submetidas a estresse (VAN NIEKERK et al., 2006).

Espécies de Botryosphaeriaceae sobrevivem como picnídios e/ou peritécios em partes doentes da planta de videira, como troncos e ramos com cancrios, ou em madeira resultante da poda abandonada no parreiral (ÚRBEZ-TORRES et al., 2006; VAN NIEKERK et al., 2004). A infecção das videiras ocorre principalmente através de ferimentos de poda. Os conídios são dispersos principalmente por respingos de chuva à curta distância (AMPONSAH et al., 2009; ÚRBEZ-TORRES et al., 2010; VAN NIEKERK et al., 2010) e infectam o xilema exposto de feridas de poda, onde ocorre a germinação dos esporos e a colonização dos vasos (ÚRBEZ-TORRES; GUBLER, 2011; ROLSHAUSEN et al., 2010). A temperatura ótima para infecção se situa entre 23 e 26°C (COPEL; HENDRIX, 2004; LEHOCZKY, 1988; LARIGNON; DUBOS, 2001), mas tem sido verificado que períodos de molhamento e de umidade relativa elevados favorecem as infecções. Nestas condições, os picnídios e os pseudotécios (caso se formem) sofrem hidratação com a consequente produção de conídios e de ascósporos, respectivamente (PHILLIPS, 1998). A abundância de inóculo na presença de feridas recentes é condição favorável à ocorrência de infecções, uma vez que as espécies de Botryosphaeriaceae em videira são referidas como patógenos de feridas (FOURIE; HALLEEN, 2004a; LARIGNON, 2012). A infecção também é favorecida por condições que reduzam o vigor das plantas, tais como geada, altas temperaturas, nutrição pobre e podas mal conduzidas (LARIGNON; DUBOS, 2001). Em suma, os fatores de estresse abiótico, ao

debilitarem as plantas, proporcionam condições ótimas ao aumento da severidade da morte descendente (VAN NIEKERK et al., 2006, 2011).

4.6. Medidas de controle

No início do século XX, foi constatado que o arsenito de sódio, utilizado como inseticida, também tinha atividade fungicida e permitia controlar a esca da videira. Posteriormente, durante os anos 70, a utilização desse composto foi generalizada para o controle da doença. A eficácia do arsenito de sódio está relacionada à sua alta toxicidade e capacidade de penetrar até o xilema, eliminando a maior parte dos fungos (LARIGNON et al., 2008). No entanto, devido ao efeito carcinogênico em humanos e à alta toxidade ao ambiente, o arsenito de sódio foi proibido em todo o mundo (BERTSCH et al., 2013; DECOIN, 2001; LARIGNON et al., 2008). Como consequência da proibição do arsenito de sódio, foi intensificada a incidência do declínio da videira em todas as regiões produtoras de uva no mundo (SURICO; MUGNAI; MARCHI, 2006).

Como consequência da proibição do arsenito de sódio, uma vasta gama de métodos de controle, incluindo produtos químicos, agentes de controle biológico, moléculas naturais e métodos de saneamento, têm sido testados contra o declínio da videira. No entanto, apesar desses esforços, a eficácia de um método único de controle parece ser limitada, e as estratégias de manejo que combinam dois ou mais destes métodos precisam ser aplicadas para reduzir a incidência da doença (BERTSCH et al., 2013).

O material vegetal do viveiro (planta-matriz e porta-enxerto) pode ser portador dos fungos causadores de declínio (AROCA et al., 2010; DUBROVSKY; FABRITIUS, 2007; FOURIE; HALLEEN, 2004a), motivo pelo qual é essencial a utilização de material vegetal certificado nos viveiros de mudas. Como medida preventiva, deve ser realizada análise para determinar a presença dos fungos do declínio nos campos das plantas-matrizes e nos distintos passos da propagação que se desenvolvem nos viveiros comerciais. Nesse contexto, o uso de material de propagação sem *Pa. chlamydospora* e espécies de *Phaeoacremonium* seria a medida ideal de controle da doença de Petri. Entretanto, a detecção dos fungos em videiras matrizes é difícil, uma vez que a identificação baseada nos sintomas visuais apresenta alta proporção de falso positivo (WHITEMAN et al., 2007). Métodos moleculares para detecção e identificação vêm sendo investigados, mas nenhum serviço comercial está disponível para certificação de material de plantio livre dos fungos relacionados à doença de Petri (MUNDY; MANNING, 2010).

Outras práticas culturais efetivas para o controle dos fungos associados ao declínio da videira no viveiro, além do uso de material vegetal sadio, incluem o mergulho das raízes antes do plantio em solução de fungicida (após o corte das raízes) e a redução das condições de estresse hídrico. A termoterapia é outra opção de controle e consiste na imersão do material vegetal de propagação em água quente (48 a 53°C por 30 minutos) e os resultados obtidos são promissores para o controle de *Pa. chlamydospora*, *Phaeoacremonium* spp. e *Cylindrocarpon* spp. (BLEACH et al., 2013; EDWARDS et al., 2004; GRAMAJE; ARMENGOL, 2011; HALLEEN; FOURIE; CROUS, 2007). No entanto, estes tratamentos podem provocar, em algumas ocasiões, problemas de brotação no material de propagação (WAITE; MAY, 2005; WAITE; MORTON, 2007) e não protegem de infecções posteriores, durante o processo de enraizamento ou no plantio definitivo (WAITE; MAY; BOSSINGER, 2013). Cultivares de *V. vinifera* têm diferentes graus de sensibilidade ao tratamento térmico e as temperaturas a serem usadas dependem dos agentes patogênicos que necessitam ser controladas (BERTSCH et al., 2013). Temperaturas de 45 a 47°C conseguem eliminar *Pa. chlamydospora*, enquanto as temperaturas de 51 a 53°C são necessárias para eliminar patógenos mais resistentes que os causadores da doença de Petri. Dois tratamentos térmicos diferentes podem também ser realizados: um de 54°C por cinco minutos para o controle de pragas e patógenos externos, e outro a 50°C por 30 a 45 minutos para o controle de pragas e patógenos internos (GRAMAJE et al., 2009a; WAITE; MORTON, 2007).

Vários estudos têm avaliado a eficácia de fungicidas aplicados em diferentes momentos durante o processo de propagação em viveiros. Dentre estes, a utilização de didecildimetil cloreto de amônio durante o processo de hidratação dos ramos demonstrou ser o tratamento mais eficaz de desinfestação para prevenir a infecção de *Pa. chlamydospora* e *Pm. aleophilum* (GRAMAJE et al., 2009b; FOURIE; HALLEEN, 2006). Em outro estudo, foi observado que a imersão dos porta-enxertos e dos ramos em uma suspensão de ciprodinil e fludioxonil reduziu a incidência e a severidade de *Cylindrocarpon* spp. e de espécies de Botryosphaeriaceae (REGO et al., 2009).

A erradicação dos fungos causadores de declínio, após a infecção da videira, é muito difícil. No entanto, existe uma série de medidas que devem ser seguidas no manejo das parcelas afetadas. Por muitos anos, as medidas de saneamento têm se mantido como os procedimentos mais amplamente utilizados para controlar a disseminação do declínio nos campos de produção de uva (BERTSCH et al., 2013). É importante observar os possíveis sintomas externos das plantas afetadas e identificá-las para comprovar a evolução da doença. A poda curativa, que consiste na eliminação completa das zonas afetadas, é a medida mais

efetiva. Depois de realizado este saneamento, é aconselhado aplicar um isolante com ou sem fungicida para evitar uma nova infecção (HERCHE, 2009; MUGNAI; GRANITI; SURICO, 1999). A eliminação dos restos da poda curativa constitui outra prática cultural imprescindível, e tem de ser realizada imediatamente após a poda, para diminuir as fontes de inóculo na parcela. As plantas completamente afetadas, sem possibilidade de serem podadas curativamente, devem ser arrancadas desde a raiz e eliminadas. Antes da reposição das plantas, deve ser efetuada aração profunda do solo. O replantio pode ser realizado logo em seguida, desde que a videira adjacente esteja sadia. É aconselhada a realização de um cuidado otimizado e individual da nova planta, até seu desenvolvimento igualar às demais plantas (MUGNAI; GRANITI; SURICO, 1999).

Como as feridas de podas podem constituir uma porta de entrada para os fungos responsáveis pelo declínio da videira, alguns hábitos de poda podem reduzir a suscetibilidade das feridas. Portanto, é aconselhável reduzir a seção de corte, proteger as feridas com fungicidas (HERCHE, 2009; MUGNAI; GRANITI; SURICO, 1999), evitar as operações de podas em dias chuvosos e desinfestar as ferramentas de poda entre as plantas para evitar o contágio. Uma das melhores estratégias de poda para reduzir a disseminação do declínio nas videiras consiste em realizar uma pré-poda longa e uma poda definitiva tardia. A poda no ramo ainda verde reduz as feridas que são maiores durante a poda no ramo seco (HERCHE, 2009).

Medidas de saneamento são muitas vezes complementadas com a proteção de feridas de poda do ataque de patógenos pela aplicação de fungicidas, formulações biológicas ou ambos em rotação. As partes infectadas de uma planta e a madeira morta infectada no solo devem ser removidas para reduzir a carga de inóculo nos parreirais (CARTER, 1991; DI MARCO et al., 2000).

A proteção das feridas de poda com fungicidas, aplicados na forma de pastas ou formulações líquidas, é considerada a medida mais eficaz e viável economicamente para prevenir a infecção da videira pelos patógenos causadores de declínio (BERTSCH et al., 2013; CALZARANO; DI MARCO; CESARI, 2004; CARTER, 1991; PITT et al., 2012; ÚRBEZ-TORRES, 2011). Entre os fungicidas testados destacam-se os princípios ativos carbendazim, procimidone, iprodione, mancozeb, fluazinan, tiofanato-metílico, flusilazole, tebuconazole, piraclostrobina e fosetyl-Al (AMPONSAH et al., 2012; BESTER; CROUS; FOURIE, 2007; DÍAZ; LATORRE, 2013; FOURIE; HALLEEN, 2006; PITT et al., 2012; ROLSHAUSEN et al., 2010). No entanto, o sucesso no controle depende de vários fatores, tais como o modo e o número de aplicações em videiras, a persistência do produto e as

espécies dos fungos tratados (BERTSCH et al., 2013; DI MARCO; OSTI, 2005; MUNDY; MANNING, 2010; ROLSHAUSEN et al., 2010).

Espécies de *Trichoderma* têm sido testadas como agentes biológicos para proteger feridas de poda contra os patógenos de esca, da eutipiose e da morte descendente com resultados promissores (COMPANT et al., 2013; JOHN et al., 2005, 2008). A eficácia da protecção com tratamentos à base de *Trichoderma* depende da capacidade destes fungos colonizarem as feridas de poda da videira. Geralmente, *Trichoderma* precisa de um período de tempo para a completa colonização, durante o qual a videira podada é suscetível a infecções e/ou à lavagem pela chuva (JOHN et al., 2008). Apesar dos resultados animadores, procedimentos de controle baseados na utilização de *Trichoderma* ainda requerem mais testes em campo para serem avaliados com precisão e eventualmente serem otimizados pela combinação com outras estratégias de manejo, como a combinação com outros produtos biológicos e químicos, cirurgia corretiva, redução do número e do tamanho dos ferimentos de poda, e aplicação de medidas de sanitização (BERTSCH et al., 2013). Outros agentes biológico, como *Bacillus subtilis* Cohn, *Fusarium lateritium* Nees e *Pantoea agglomerans* (Ewing & Fife) Gavini et al., e moléculas naturais, como quitosana e cisteína também, têm sido relatados como efetivos contra os agentes do declínio da videira, sozinhos ou em combinação com fungicidas, embora alguns destes tenham sido testados somente *in vitro* ou em viveiros (BERTSCH et al., 2013; COMPANT et al., 2013).

Baseado nos resultados obtidos até o momento pode-se concluir que os trabalhos mais inovadores estão focados no saneamento das plantas durante o período que estão nos viveiros, mediante estratégias de controle integrado, que combinam medidas de controle químico, controle físico e controle biológico (FOURIE; HALLEEN, 2004b; GRAMAJE; ARMENGOL, 2011; HALLEEN; FOURIE; CROUS, 2007). Em condições de campo, todos os tratamentos propostos podem perder a eficácia como resultado de fatores como estresse em condições climáticas extremas que podem predispor as videiras à infecção. Outros fatores incluem a idade da planta, a suscetibilidade da cultivar e o estágio e a intensidade da infecção. Além disso, os custos dos procedimentos mais cuidadosos de poda e o pequeno número de fungicidas registrados com diferentes gamas de ação contra os patógenos podem ser caros para parreirais de baixo valor. Portanto, muitos fatores contribuem para que não seja possível o controle eficaz do declínio videira em nível mundial (BERTSCH et al., 2013).

4.7. Declínio da videira no Brasil

Os estudos sobre a etiologia dos fungos causadores de declínio em videira no Brasil são escassos, pois poucos artigos na íntegra foram publicados sobre o assunto até o momento.

A eutipiose, causada por *E. lata*, foi relatada em pomares de videira de São Paulo (PARADELA FILHO et al., 1993) e do Rio Grande do Sul (SÔNEGO; INÁCIO; DIANESE, 1999), sendo considerada uma doença muito destrutiva nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (GARRIDO; SÔNEGO, 2004; GARRIDO et al., 2011).

A incidência da doença de Petri e do pé-preto vem se tornando cada vez mais importante no contexto da produção de uvas no Brasil. Embora a repercussão e o impacto do problema ainda não tenham sido calculados, produtores das principais regiões em questão têm relatado perdas, principalmente devido aos custos com replantio precoce nas áreas contaminadas (CAVALCANTI; BUENO; ALMANÇA, 2013). Existem poucos estudos sobre a etiologia da doença de Petri e do pé-preto no Brasil. Em relação à doença de Petri, isolamentos efetuados de plantas sintomáticas no Rio Grande do Sul propiciaram evidências morfológicas para a ocorrência de *P. chlamydospora* (ALMANÇA et al., 2013). Quanto ao pé-preto, em estudo que analisou os fungos associados ao sintoma no Rio Grande do Sul (GARRIDO et al., 2004a), foram identificados *Cylindrocarpon* sp., *Cylindrocladium* sp. e *Phaeoacremonium* sp., mas sem a identificação em nível de espécie. Em outro estudo, (GARRIDO et al., 2004b) isolaram *C. destructans* de plantas de videira com sintomas de pé-preto coletadas no Rio Grande do Sul e comprovaram a patogenicidade em plantas cultivadas em casa de vegetação.

A morte descendente da videira é uma doença cuja incidência vem aumentando nos últimos anos, em todas as áreas de produção de uva do Brasil, ocorrendo principalmente em vinhedos dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Pernambuco e Bahia. Dependendo da região, pode-se encontrar uma ou outra espécie do agente causal, não sendo, portanto, causada por apenas um agente etiológico. Os principais agentes da morte descendente identificados no Brasil foram *L. theobromae*, encontrada em São Paulo, Minas Gerais, Pernambuco e Bahia, *Neofusicoccum* sp. e *Fusicoccum aesculi* Corda in Sturm, relatadas principalmente no Rio Grande do Sul (GARRIDO et al., 2011). Portanto, entre as espécies de *Lasiodiplodia*, a morte descendente da videira é atribuída exclusivamente à *L. theobromae* no Brasil. É importante salientar que as identificações da espécie foram baseadas em características morfológicas, que atualmente são consideradas

inadequadas para a discriminação de espécies, uma vez que as características morfológicas de *L. theobromae* sobrepõem com outras espécies de *Lasiodiplodia* (COSTA et al. 2010).

O conhecimento dos diferentes fungos associados ao declínio da videira é fundamental para o sucesso no manejo das doenças, aspecto essencial para prolongar a vida econômica dos parreirais (ÚRBEZ-TORRES et al., 2012). Apesar da importância da viticultura para o agronegócio do Nordeste brasileiro e da importância crescente do declínio da videira, não existem informações precisas sobre as espécies fúngicas associadas, bem como sobre a prevalência e a distribuição destas nos pólos de produção. Além disso, considerando os recentes estudos de taxonomia do gênero *Lasiodiplodia* e a ausência de dados moleculares na identificação de isolados brasileiros, podemos especular que outras espécies do gênero, além de *L. theobromae*, estejam associadas com a morte descendente da videira no Brasil. Conseqüentemente, os objetivos dessa tese foram: a) identificar as espécies fúngicas associadas ao declínio da videira no Nordeste brasileiro utilizando características morfológicas e análises filogenéticas; b) investigar a prevalência e a distribuição das espécies de *Lasiodiplodia* nos pólos de produção de uva no Nordeste brasileiro; e c) avaliar a patogenicidade e a virulência das espécies de *Lasiodiplodia* em ramos de videira. Os conhecimentos gerados sobre a etiologia e a epidemiologia do declínio da videira são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias de ação específicas aos agentes causais, contribuindo para diminuir as perdas de produção e, conseqüentemente, aumentar a competitividade do agronegócio da viticultura no Nordeste do Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOLLAHZADEH, J.; JAVADI, A.; MOHAMMADI-GOLTAPPEH, E.; ZARE, R.; PHILLIPS, A. J. L. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. **Persoonia**, Leiden, v. 25, p.1-10, 2010.
- ABREO, E.; MARTÍNEZ, I.; BETTUCCI, L.; LUPO, S. Morphological and molecular characterization of *Campylocarpon* and *Cylindrocarpon* spp. associated with black foot disease of grapevines in Uruguay. **Australasian Plant Pathology**, Canberra, v. 39, n. 5, p. 446-452, 2010.
- ABREO, E.; MARTINEZ, S.; BETTUCCI, L.; LUPO, S. Characterization of Botryosphaeriaceae species associated with grapevines in Uruguay. **Australasian Plant Pathology**, Canberra, v. 42, n. 3, p. 241-249, 2013.
- AGUSTÍ-BRISACH, C.; ARMENGOL, J. Black-foot disease of grapevine: an update on taxonomy, epidemiology and management strategies. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 52, n. 2, p. 245-261, 2013.
- AGUSTÍ-BRISACH, C.; GRAMAJE, D.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. Detection of black-foot disease pathogens in the grapevine nursery propagation process in Spain. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 137, n. 1, p. 103-112, 2013.
- AGUSTÍ-BRISACH, C.; ALANIZ, S.; GRAMAJE, D.; PÉREZ-SIERRA, A.; ARMENGOL, J.; LANDERAS, E.; IZQUIERDO, P. M. First report of *Cylindrocladiella parva* and *C. peruviana* associated with black-foot disease of grapevine in Spain. **Plant Disease**, St. Paul, v. 96, n. 9, p. 1381, 2012.
- ALANIZ, S.; ABAD-CAMPOS, P.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. Evaluation of fungicides to control *Cylindrocarpon liriodendri* and *Cylindrocarpon macrodidymum* *in vitro*, and their effect during the rooting phase in the grapevine propagation process. **Crop Protection**, Oxford, v. 30, n. 4, p. 489-494, 2011.
- ALANIZ, S.; LEON, M.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ABAD, P.; ARMENGOL, J. Characterization of *Cylindrocarpon* species associated with black-foot disease of grapevine in Spain. **Plant Disease**, St. Paul, v. 91, n. 9, p.1187-1193, 2007.
- ALMANÇA, M. A.; K.; ABREU, C. M.; SCOPEL, F. B.; BENEDETTI, M.; HALLEEN, F.; CAVALCANTI, F. R. **Evidências Morfológicas da Ocorrência de *Phaeomoniella chlamydospora* em Videiras no Estado do Rio Grande do Sul**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2013. 5 p. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico, 134).
- AL-SAADON, A.H.; AMEEN, M.K.M.; HAMEED, M.A.; AL-BADRAN, A.; ALI, Z. First report of grapevine dieback caused by *Lasiodiplodia theobromae* and *Neoscytalidium dimidiatum* in Basrah, Southern Iraq. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 11, n. 95, p. 16165-16171, 2012.
- ALVES, A.; CROUS, P. W.; CORREIA, A.; PHILLIPS, A. J. L. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. **Fungal Diversity**, Kumming, v. 28, n. 1, p. 1-13, 2008.

- ALVES, A.; PHILLIPS, A. J. L.; HENRIQUES, I.; CORREIA, A. Rapid differentiation of species of Botryosphaeriaceae by PCR fingerprinting. **Research in Microbiology**, Paris, v. 158, n. 2, p. 112-121, 2007.
- AMPONSAH, N. T.; JONES, E. E.; RIDGWAY, H. J.; JASPERS, M. V. Rainwater dispersal of *Botryosphaeria* conidia from infected grapevines. **New Zealand Plant Protection**, Auckland, v. 62, p. 228-233, 2009.
- AMPONSAH, N. T.; JONES, E. E.; RIDGWAY, H. J.; JASPERS, M. V. Identification, potential inoculum sources and pathogenicity of botryosphaeriaceous species associated with grapevine dieback disease in New Zealand. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 131, n. 3, p. 467-482, 2011.
- AMPONSAH, N. T.; JONES, E.; RIDGWAY, H. J.; JASPERS, M. V. Evaluation of fungicides for the management of Botryosphaeria dieback diseases of grapevines. **Pest Management Science**, London, v. 68, n. 5, p. 676-83, 2012.
- ARAÚJO, J. L. P.; RAMALHO, P. J. P. Custos de produção. In: SOARES, J. M.; LEÃO, P. C. S. (Eds.). **A viticultura no Semi-árido brasileiro**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. p. 727-736.
- ARMENGOL, J.; VICENT, A.; TORNÉ, L.; GARCÍA-FIGUERES, F.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J. Fungi associated with esca and grapevine declines in Spain: a three year survey. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 40, n. 3, p. 325-329, 2001.
- AROCA, A.; GARCÍA-FIGUERES, F.; BRACAMONTE, L.; LUQUE, J.; RAPOSO, R. A survey of trunk disease pathogens within rootstocks of grapevines in Spain. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 115, n. 2, p. 195-202, 2006.
- AROCA, A.; GRAMAJE, D.; ARMENGOL, J.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; RAPOSO, R. Evaluation of grapevine nursery process as a source of *Phaeoacremonium* spp. And *Phaeomoniella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 126, n. 2, p. 165-174, 2010.
- BARBOSA, M. A. G.; CASTRO, J. M. C.; TERAPO, D.; LIMA, M. F.; BATISTA, D.C.; TAVARES, S. C. C. H. Doenças. In: LEÃO, P. C. S.; SOARES, J. M. (Eds.). **Cultivo da videira**. 2. ed. [on line] Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2010. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/CultivodaVideira_2ed/doencas.html> Acesso em: 08 de jan. de 2014.
- BASKARATHEVAN, B.; JASPERS, M. V.; JONES, E. E.; RIDGWAY, H. J. Incidence and distribution of botryosphaeriaceous species in New Zealand vineyards. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 132, n. 4, p. 549-560, 2012.
- BEGOUDE, B. A. D.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; ROUX, J. Botryosphaeriaceae associated with *Terminalia catappa* in Cameroon, South Africa and Madagascar. **Mycological Progress**, Heidelberg, v. 9, n. 1, p. 101-123, 2010.

BERTSCH, C.; RAMÍREZ-SUERO, M.; MAGNIN-ROBERT, M.; LARIGNON, P.; CHONG, J.; ABOU-MANSOUR, E.; SPAGNOLO, A.; CLÉMENT, C.; FONTAINE, F. Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. **Plant Pathology**, London, v. 62, n. 2, p. 243–265, 2013.

BESTER, W.; CROUS, P. W.; FOURIE, P. H. Evaluation of fungicides as potential grapevine pruning wound protectants against *Botryosphaeria* species. **Australasian Plant Pathology**, Canberra, v. 36, n. 1, p. 73-77, 2007

BILLONES-BAAIJENS, R.; RIDGWAY, H. J.; JONES, E. E.; JASPERS, M. Inoculum sources of *Botryosphaeriaceae* species in New Zealand grapevine nurseries. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 135, n. 1, p. 159-174, 2013a.

BILLONES-BAAIJENS, R.; RIDGWAY, H. J.; JONES, E. E.; CRUICKSHANK, R. H.; JASPERS, M. Prevalence and distribution of *Botryosphaeriaceae* species in New Zealand grapevine nurseries. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 135, n. 1, p. 175-185, 2013b.

BLEACH, C.; JONES, E.; RIDGWAY, H.; JASPERS, M.V. Hot water treatment to reduce incidence of black foot pathogens in young grapevines grown in cool climates. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 52, n. 2, p. 347-358, 2013.

BRUEZ, E.; LECOMTE, P.; GROSMAN, J.; DOUBLET, B.; BERTSCH, C.; FONTAINE, F.; UGAGLIA, A.; TEISSEDE, P. -L.; DA COSTA, J. -P.; GUERIN-DUBRANA, L.; REY, P. Overview of grapevine trunk diseases in France in the 2000s. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 52, n. 2, p. 262-275, 2013.

BURGESS, T. I.; BARBER, P.A.; MOHALI, S.; PEGG, G.; DE BEER, W.; WINGFIELD, M.J. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. **Mycologia**, Bronx, v. 98, n. 3, p. 423-435, 2006.

CABRAL, A.; GROENEWALD, J. Z.; REGO, C.; OLIVEIRA, H.; CROUS, P. W. *Cylindrocarpon* root rot: multi-gene analysis reveals novel species within the *Ilyonectria radiculicola* species-complex. **Mycological Progress**, Heidelberg, v. 11, n. 3, p. 655-688, 2012a.

CABRAL, A.; REGO, C.; NACIMENTO, T.; OLIVEIRA, H.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Multi-gene analysis and morphology reveal novel *Ilyonectria* species associated with black foot disease of grapevines. **Fungal Biology**, London, v. 116, n. 1, p. 62-80, 2012b.

CALZARANO, F.; DIMARCO, S.; CESARI, A. Benefit of fungicide treatment after trunk renewal of vines with different types of esca necrosis. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 43, n. 1, p. 116-123, 2004.

CAMARGO, U. A.; PROTAS, J. F. S.; MELLO, L. M. R. Grape growing and processing in Brazil. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 785, p. 51-57, 2008.

CARDOSO, J. E.; BEZERRA, M. A.; VIANA, F. M. P.; SOUSA, T. R. M.; CYSNE, A. Q.; FARIAS, F. C. Endophyte occurrence of *Lasiodiplodia theobromae* in cashew tissues and its transmission by vegetative propagules. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 3, p. 262–266, 2009.

- CARTER, M. V. *Eutypa dieback*. In: PEARSON, R. C. GOHEEN, A. C. (Eds.). **Compendium of grape diseases**. St. Paul: APS Press, 1988. p. 32-34.
- CARTER, M. V. **The status of *Eutypa lata* as a pathogen**. Kew: International Mycological Institute, 1991. 59 p. (IMI. Phytopathological Papers, 32).
- CAVALCANTI, F. R.; BUENO, C. J.; ALMANÇA, M. A. K. **Declínio e morte de plantas de videira**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2013. 40 p. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 82).
- CHAVERRI, P.; SALGADO, C.; HIROOKA, Y.; ROSSMAN, A. Y.; SAMUELS, G. J. Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (*Nectriaceae*, *Hypocreales*, *Ascomycota*) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 68, p. 57-78, 2011.
- CHIARAPPA, L. Esca (black measles) of grapevine - an overview. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 39, n. 1, p. 11-15, 2000.
- COMPANT, S.; BRADER, G.; MUZAMMIL, S.; SESSITSCH, A.; LEBRIHI, A.; MATHIEU, F. Use of beneficial bacteria and their secondary metabolites to control grapevine pathogen diseases. **BioControl**, Dordrecht, v. 58, n. 4, p. 435-455, 2013.
- COPESE, W. E.; HENDRIX JR., F.F. Effect of temperature on sporulation of *Botryosphaeria dothidea*, *B. obtusa* and *B. rhodina*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 88, N. 3, p. 292-296, 2004.
- COSTA, V. S. O.; MICHEREFF, S. J.; LIMA, G. S. A.; MARTINS, R. B.; GAVA, C. A. T.; MIZUBUTI, E. S. G.; CÂMARA, M. P. S. Species of *Botryosphaeriaceae* associated on mango in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.127, n. 4, p. 509-519, 2010.
- CREASY, G. L.; CREASY, L. L. **Grapes**. Wallingford: CAB International, 2009. 295 p.
- CROUS, P. W.; GAMS, W. *Phaeoconiella chlamydospora* gen. et comb. nov., a causal organism of Petri grapevine decline and esca. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 39, n. 1, p. 112-188, 2000.
- CROUS, P. W.; GAMS, W.; WINGFIELD, M. J.; VAN WYK, P. S. *Phaeoacremonium* gen. nov. associated with wilt and decline diseases of woody hosts and human infections. **Mycologia**, Bronx, v. 85, n. 5, p. 786-796, 1996
- CROUS, P. W.; PHILLIPS, A. J. L.; WINGFIELD, M. J. New records of *Cylindrocladium* and *Cylindrocladiella* spp. in South Africa. **Mycological Research**, London, v. 42, n. 2, p. 302-305, 1993.
- CROUS, P. W.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; RHEEDER, J.; MARASAS, W. F.O.; PHILLIPS, A. J. L.; ALVES, A.; BURGESS, T.; BARBER, P.; GROENEWALD, J. Z. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 55, n. 2, p. 235-253. 2006.
- DAMM, U.; CROUS, P. W.; FOURIE, P. H. *Botryosphaeriaceae* as potential pathogens of *Prunus* in South Africa, with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. **Mycologia**, Bronx, v. 99, n. 5, p. 664-680, 2007.

- DECOIN, M. Grapevine products: news on withdrawals and restrictions. **Phytoma**, Paris, v. 543, p. 28-33. 2001.
- DE WET, J.; SLIPPERS, B.; PRELSIG, O.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Phylogeny of the Botryosphaeriaceae reveals patterns of host association. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, New York, v. 46, n. 1, p.116-126, 2008.
- DI MARCO, S.; MAZZULO, A.; CALZARANO, F.; CESARI, A. The control of esca: status and perspectives. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 39, n. 1, p. 232-340, 2000.
- DI MARCO, S; OSTI, F. Effect of fosetyl-Al foliar applications towards esca fungi in grapevine. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 44, n. 1, p. 114-115, 2005.
- DÍAZ, G. A.; LATORRE, B. A. Efficacy of paste and liquid fungicide formulations to protect pruning wounds against pathogens associated with grapevine trunk diseases in Chile. **Crop Protection**, Oxford, v. 46, p. 106-112, 2013.
- DUBOS, B. **Maladies cryptogamiques de la vigne**. 2. ed. Bordeaux: Féret, 2002. 208 p.
- DUBOS, B.; LARIGNON, P. Esca and black measles. In: PEARSON, R. C. GOHEEN, A. C. (Eds.). **Compendium of grapes diseases**. St. Paul: APS Press, 1988. p. 34-35.
- DUBROVSKY, S.; FABRITIUS, A. L. Occurrence of *Cylindrocarpum* spp. in nursery grapevine in California. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 46, n. 1, p. 84-86, 2007.
- DUPONT, J.; LALOUI, W.; MAGNIN, S.; LARIGNON, P.; ROQUEBERT, M. F. *Phaeoacremonium viticola*, a new species associated with Esca disease of grapevine in France. **Mycologia**, Bronx, v. 92, n. 3, p. 499-504, 2000.
- EDWARDS, J.; PASCOE, I. G.; SALIB, S.; LAUKART, N. Hot treatment of grapevine cuttings reduces incidence of *Phaeomoniella chlamydospora* in young vines. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 43, n. 1, p. 158-159, 2004.
- EDWARDS, J.; SALIB, S.; THOMSON, F.; PASCOE, L. The impact of *Phaeomoniella chlamydospora* infections on the grapevine's physiological response to water stress Part 1: Zinfandel. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 46, n. 1, p. 26-37, 2007.
- ESSAKHI, S.; MUGNAI, L.; CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z.; SURICO, G. Molecular and phenotypic characterization of novel *Phaeoacremonium* species associated with Petri disease and esca of grapevine. **Persoonia**, Leiden, v. 21, p. 119-134, 2008.
- FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **FAOSTAT**: Agricultural statistics database [on line]. Rome: World Agricultural Information Centre, 2014. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 18 jan. 2014.
- FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. **Fungal databases**: Fungus-host distributions [on line]. Beltsville: Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS-USDA, 2014. Disponível em: <<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/fungushost/fungushost.cfm>>. Acesso em: 18 jan. 2014.

FISCHER, M. A new wood-decaying basidiomycete species associated with esca of grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (Hymenochaetales). **Mycological Progress**, Heidelberg, v. 1, n. 3, p. 315-324, 2002.

FOURIE, P. H.; HALLEEN, F. Diagnosis of fungal diseases and their involvement in dieback disease of youngvines. **Wynboer**, Suider Paarl, v.149, p. 19-23, 2001.

FOURIE, P. H.; HALLEEN, F. Investigation on the occurrence of *Phaeomoniella chlamydospora* in canes of rootstock mother vines. **Australasian Plant Pathology**, Canberra, v. 31, n. 4, p. 425-426, 2002.

FOURIE, P. H.; HALLEEN, F. Occurrence of grapevine trunk disease pathogens in rootstock mother plants in South Africa. **Australasian Plant Pathology**, Canberra, v. 33, n. 2, p. 313-315, 2004a.

FOURIE, P. H.; HALLEEN, F. Proactive control of Petri disease of grapevine through treatment of propagation material. **Plant Disease**, St. Paul, v. 88, n. 11, p. 1241-1245, 2004b.

FOURIE, P. H.; HALLEEN, F. Chemical and biological protection of grapevine propagation material from trunk disease pathogens. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 116, n. 4, p. 255-265, 2006

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

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

FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P.; MARTINS, M. V. V. Status of *Lasiodiplodia theobromae* as a plant pathogen in Brazil. **Essentia**, Sobral, v. 12, n. 2, p. 53-71, 2011.

GARCÍA-JIMÉNEZ, J. Enfermedades fúngicas de la madera. In: GRUPO NACIONAL DE TRABAJO DE LOS PROBLEMAS FITOSANITARIOS DE LA VID (Ed.). **Los parásitos de la vid: estrategias de protección razonada**. 5. ed. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación / Mundi-Prensa, 2004. p. 221-228.

GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; RAPOSO, R.; ARMENGOL, J. Enfermedades fúngicas de la madera de la vid. In: JIMÉNEZ DÍAZ, R. M.; SEGUÍ, E. M. (Eds.). **Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos: naturaleza e control integrado**. Valencia: Phytoma-España & Sociedad Española de Fitopatología, 2010. p. 161-173.

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

GARRIDO, L. R.; SÔNEGO, O. R. **Eutipiose** - epidemiologia, sintomatologia e controle. Bento Gonçalves: EMBRAPA-CNPUV, 2004. 8 p. (EMBRAPA-CNPUV. Circular Técnica, 53).

- GARRIDO, L. R.; SÔNEGO, O. R.; GOMES, V. N. Fungos associados com o declínio e morte de videiras no Estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 322-324, 2004a.
- GARRIDO, L. R.; SÔNEGO, O. R.; URBEN, A. F. *Cylindrocarpon destructans* causador do "pé-preto" da videira no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 5, p. 548- 550, 2004b.
- GIMÉNEZ-JAIME, A.; AROCA, A.; RAPOSO, R.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. Occurrence of fungal pathogens associated with grapevine nurseries and the decline of young vines in Spain. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 154, n. 10, p. 598-602, 2006.
- GRAHAM, A. B.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S. Three new *Phaeoacremonium* species on grapevines in New Zealand. **Australasian Plant Pathology**, Canberra, v. 38, n. 5, p. 505-513, 2009.
- GRAMAJE, D.; ARMENGOL, J. Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. **Plant Disease**, St. Paul, v. 95, n. 9, p. 1040-1055, 2011.
- GRAMAJE, D.; MOSTERT, L.; ARMENGOL, J. Characterization of *Cadophora luteo-olivacea* and *C. melinii* isolates obtained from grapevines and environmental samples from grapevine nurseries in Spain. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 50, Supplement, p. S112-S126, 2011.
- GRAMAJE, D.; ARMENGOL, J.; SALAZAR, D.; LÓPEZ-CORTÉS, I.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J. Effect of hot-water treatments above 50°C on grapevine viability and survival of Petri disease pathogens. **Crop Protection**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 280-285, 2009a.
- GRAMAJE, D.; AROCA, A.; RAPOSO, R.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. Evaluation of fungicides to control Petri disease pathogens in the grapevine propagation process. **Crop Protection**, Oxford, v. 28, n. 12, p. 1091-1097, 2009b.
- GROENEWALD, M.; KANG, J. -C.; CROUS, P. W.; GAMS, W. ITS and β -tubulin phylogeny of *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella* species. **Mycological Research**, London, v. 105, n. 6, p. 651-657, 2001.
- GUARRO, J.; ALVES, S.H.; GENÉ, J.; GRAZZIOTIN, N.A.; MAZZUCO, R.; DALMAGRO, C.; CAPILLA, J.; ZAROR, L.; MAYAYO, E. Two cases of subcutaneous infection due to *Phaeoacremonium* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 3, p. 1332-1336, 2003.
- GUBLER, W. D.; BAUMGARTNER, K.; BROWNE, G. T.; ESKALEN, A.; ROONEY-LATHAM, S.; PETIT, E.; BAYRAMIAN, L. A. Root diseases of grapevines in California and their control. **Australasian Plant Pathology**, Canberra, v. 33, n. 2, p. 157-165, 2004.
- HALLEEN, F.; FOURIE, P. H.; CROUS, P. W. A review of black foot disease of grapevine. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 45, n. 1, p. 55-67, 2006.
- HALLEEN, F.; FOURIE, P. H.; CROUS, P. W. Control of black foot disease in grapevine nurseries. **Plant Pathology**, London, v. 56, n. 4, p. 637-645, 2007.

HALLEEN, F.; MOSTERT, L.; CROUS, P. W. Pathogenicity testing of lesser-known vascular fungi of grapevines. **Australasian Plant Pathology**, Canberra, v. 36, n. 3, p. 277-285, 2007.

HALLEEN, F.; SCHROERS, H. J.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Novel species of *Cylindrocarpon* (*Neonectria*) and *Campylocarpon* gen. nov. associated with black-foot disease of grapevines (*Vitis* spp). **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 50, p. 431-455, 2004.

HERCHE, R. **Control strategies for trunk diseases of grapevine (*Vitis vinifera* L.)**. 2009. 52 f. Dissertation (Master in Plant Pathology) - University of California Davis, Davis.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **SIDRA**: Sistema IBGE de recuperação automática [on line]. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2014. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda>>. Acesso em: 18 jan. 2014.

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

JOHN, S.; WICKS, T. J.; HUNT, J. S.; LORIMER, M. F.; OAKEY, H.; SCOTT, E. S. Protection of grapevine pruning wounds from infection by *Eutypa lata* using *Trichoderma harzianum* and *Fusarium lateritium*. **Australasian Plant Pathology**, Canberra, v. 34, n. 4, p. 569-575, 2005.

JOHN, S.; WICKS, T. J.; HUNT, J. S.; SCOTT, E. S. Colonisation of grapevine wood by *Trichoderma harzianum* and *Eutypa lata*. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Canberra, v. 14, n. 1, p. 18-24, 2008.

JONES, E. E.; BROWN, D. S.; BLEACH, C. M.; PATHROSE, B.; BARCLAY, C.; JASPERS, M. V.; RIDGWAY, H. J. First report of *Cylindrocladiella parva* as a grapevine pathogen in New Zealand. **Plant Disease**, St. Paul, v. 96, n. 1, p. 144, 2012.

KIST, B. B.; VENCATO, A. Z.; SANTOS, C.; CARVALHO, C.; REETZ, E. R.; POLL, H.; BELING, R. R. **Anuário brasileiro da fruticultura**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2012. 128 p.

LARIGNON, P. Black foot disease in France. In: MORTON, L. (Ed.). **Black goo: symptoms and occurrence of grape declines**. Virginia: International Ampelography Society, 1999. p. 89-90.

LARIGNON, P. **Maladies cryptogamiques du bois de la vigne: symptomatologie et agents pathogènes**. Grau du Roi dans le Gard: Institut Français de la Vigne et du Vin, 2012. 74 p.

LARIGNON, P.; DARNE, G.; MENARD, E.; DESACHE, F.; DUBOS, B. Comment agissait l'arsénite de sodium sur l'esca de la vigne? **Progrès Agricole et Viticole**, Montpellier, v. 125, n. 23, p. 642-651, 2008.

LARIGNON, P.; DUBOS, B. Fungi associated with esca disease in grapevine. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, n. 2, p. 147-157, 1997.

LARIGNON, P.; DUBOS, B. Preliminary studies on the biology of *Phaeoacremonium*. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 39, n. 1, p. 184-189, 2000.

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

LARIGNON, P.; FONTAINE, F.; FARINE, S.; CLÉMENT, C.; BERTSCH, C. Esca et black dead arm: deux acteurs majeurs des maladies du bois chez la vigne. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 332, n. 9, p. 765-783, 2009.

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

LEÃO, P. C. S. Cultivares. In: LEÃO, P. C. S.; SOARES, J. M. (Eds.). **Cultivo da videira**. 2. ed. [on line] Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2010. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/CultivodaVideira_2ed/cultivares.html> Acesso em: 08 de jan. de 2014.

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

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

LIMA, J. S.; MOREIRA, R. C.; CARDOSO, J. E.; MARTINS, M. V. V.; VIANA, F. M. P. Caracterização cultural, morfológica e patogênica de *Lasiodiplodia theobromae* associado a frutíferas tropicais. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 39, n. 2, p. 81-88, 2013.

LIU, J. -K.; PHOOKAMSAK, R.; DOILOM, M.; WIKKE, S.; LI, Y. -M.; ARIYAWANSHA, H.; BOONMEE, S.; CHOMNUNTI, P.; DAÍ, D. -Q.; BHAT, J. D.; ROMERO, A. I.; ZHUANG, W. -Y.; MONKAI, J.; JONES, E. B. G.; CHUKEATIROTE, E.; KO-KO, T. W.; ZHAO, Y. -C.; WANG, Y.; HYDE, K. D. Towards a natural classification of Botryosphaeriales. **Fungal Diversity**, Kunning, v. 57, n. 1, p. 149-210, 2012.

LOMBARD, L.; SHIVAS, R. G.; TO-ANUN, C.; CROUS, P. W. Phylogeny and taxonomy of the genus *Cylindrocladiella*. **Mycological Progress**, Heidelberg, v. 11, n. 4, p. 835-868, 2012.

LUQUE, J.; GARCIA-FIGUERES, F.; LEGORBURU, F. J.; MURUAMENDIARAZ, A.; ARMENGOL, J.; TROUILLAS, F.P. Species of Diatrypaceae associated with grapevine trunk diseases in Eastern Spain. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 51, n. 3, p. 528-540, 2012.

LUQUE, J.; MARTOS, S.; AROCA, A.; RAPOSO, R.; GARCIA-FIGUERES, F. Symptoms and fungi associated with declining mature grapevine plants in Northeast Spain. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 91, n. 2, p. 381-390, 2009.

LUQUE, J.; MARTOS, S.; PHILLIPS, A. J. L. *Botryosphaeria viticola* sp. nov. on grapevines: a new species with a *Dothiorella* anamorph. **Mycologia**, Bronx, v. 97, n. 5, p. 1111-1121, 2005.

- MACHADO, A. R.; PINHO, D. B.; PEREIRA, O. L. Phylogeny, identification and pathogenicity of the Botryosphaeriaceae associated with collar and root rot of the biofuel plant *Jatropha curcas* in Brazil, with a description of new species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Diversity**, Kunming, 2014 (Aceito para publicação, DOI 10.1007/s13225-013-0274-1)
- MALUTA, D. R.; LARIGNON, P. Pied-noir: mieux vaut prévenir. **Viticulture**, Bordeaux, v.11, p. 71-72, 1991.
- MARQUES, M. W.; LIMA, N. B.; MORAIS JUNIOR, M. A.; BARBOSA, M. A. G.; SOUZA, B. O.; MICHEREFF, S. J.; PHILLIPS, A. J. L.; CÂMARA, M. P. S. Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 61, n. 1, p.181-193, 2013.
- MARTIN, M. T.; COBOS, R. Identification of fungi associated with grapevine decline in Castilla y León (Spain). **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 46, n. 1, p. 18-25, 2007.
- MARTÍN, L.; MARTÍN, M. T. Multi-gene sequence analysis and phenotypic diversity of *Phaeoacremonium* species isolated from grapevines in Spain. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 137, n. 2, p. 343-361, 2013.
- MARTÍN, L.; MIERA, L. E. S.; MARTÍN, M. T. Applicability of AFLP fingerprinting markers to molecular discrimination of the three main fungal species associated with grapevine decline in Spain. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 161, n. 10, p. 689-695, 2013.
- MOHAMMADI, H.; BANIHASHEMI, Z.; GRAMAJE, D.; ARMENGOL, J. Fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Iran. **Journal of Agricultural Science and Technology**, Tehran, v. 15, n. 1, p. 137-150, 2013.
- MOLLER, W. J.; KASIMATIS, A. N. Further evidence that *Eutypa armeniaca* - not *Phomopsis viticola* - incites dead arm symptoms on grape. **Plant Disease**, St. Paul, v. 65, n. 5, p. 429-431, 1981.
- MOLLER, W.J.; LEHOCZKY, J. The occurrence of *Eutypa* dieback grapevines in Hungary. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 99, n. 2, p.116-125, 1980.
- MORALES, A.; LATORRE, B. A.; PIONTELLI, E.; BESOAIN, X. Botryosphaeriaceae species affecting table grape vineyards in Chile and cultivar susceptibility. **Ciencia y Investigación Agraria**, Santiago, v. 39, n. 3, p. 445-458, 2012.
- MORTON, L. Viticulture and grapevine declines: lessons of black goo. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 39, n. 1, p. 59-67, 2000.
- MOSTERT, L.; GROENEWALD, J. A.; SUMMERBELL, R. C.; GAMS, W.; CROUS, P. W. Taxonomy and pathology on *Togninia* (Diaporthales) and its *Phaeoacremonium* anamorphs. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 54, p. 1-115, 2006.
- MUGNAI, L.; GRANITI, A.; SURICO, G. Esca (black measles) and brown wood streaking: two old and elusive diseases of grapevines. **Plant Disease**, St. Paul, v. 83, n. 5, p. 404-418, 1999.

MUNDY, D. C.; MANNING, M. A. Ecology and management of grapevine trunk diseases in New Zealand: a review. **New Zealand Plant Protection**, Auckland, v. 63, p. 160-166, 2010.

MUNIZ, C. R.; FREIRE, F. C. O.; VIANA, F. M. P.; CARDOSO, J. E.; CORREIA, D.; JALINK, H.; KEMA, G. H. J.; SILVA, G. F.; , M. I. F. Polyclonal antibody-based ELISA in combination with specific PCR amplification of internal transcribed spacer regions for the detection and quantitation of *Lasiodiplodia theobromae*, causal agent of gummosis in cashew nut plants. **Annals of Applied Biology**, London, v. 160, n. 3, p. 217-224, 2012.

MYCOBANK. **Fungal databases**: Nomenclature and species bank [on line]. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center, 2014. Disponível em: < <http://www.mycobank.org/>>. Acesso em: 06 jan. 2014.

NAVARRETE, F.; ABREO, E.; MARTÍNEZ, S.; BETTUCCI, L; LUPO, S. Pathogenicity and molecular detection of Uruguayan isolates of *Greeneria uvicola* and *Cadophora luteo-olivacea* associated with grapevine trunk diseases. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 50, Supplement, p. S166-S175, 2011.

NETTO, M. B. S.; ASSUÇÃO, I. P.; LIMA, G. S. A.; MARQUES, M. W.; LIMA, W. G.; MONTEIRO, J. H. A.; BALBINO, V. Q.; MICHEREFF, S. J.; PHILLIPS, A. J. L.; CÂMARA, M. P. S. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. **Fungal Diversity**, Kunming, 2014 (Aceito para publicação, DOI 10.1007/s13225-014-0279-4)

OLIVEIRA, H.; REGO, M. C.; NASCIMENTO, T. Decline of young grapevines caused by fungi. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 652, p. 295-304, 2004.

OVERTON, B. E.; STEWART, E. L.; WENNER N. G. Molecular phylogenetics of grapevine decline fungi from Pennsylvania and New York. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 44, n. 1, p. 90-91, 2005.

PARADELA FILHO, O.; RIBEIRO, I. J. A.; BRAGA, F. J.; NOGUEIRA, E. M. C.; PESCE, G.; KUNIYUKI, H.; FOSSA, E.; RODRIGUES, N. J.; FEICHTENBERGER, E. *Eutypa lata*, the agent of decline of grape in São Paulo state. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 19, n. 1, p. 86-89, 1993.

PAVLIC, D.; SLIPPERS, B.; COUTINHO, T. A.; GRYZENHOUT, M.; WINGFIELD, M. J. *Lasiodiplodia gonubiensis* sp. nov., a new *Botryosphaeria* anamorph from native *Syzygium cordatum* in South Africa. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 50, n. 1, p. 313-322, 2004.

PAVLIC, D.; WINGFIELD, M. J.; BARBER, P.; SLIPPERS, B.; HARDER, G. E. S.; BURGESS, T. I. Seven new species of the Botryosphaeriaceae from baobab and other native trees in Western Australia. **Mycologia**, Bronx, v. 100, n. 6, p. 851-866, 2008.

PEREIRA, A. V. S.; MARTINS, R. B.; MICHEREFF, S. J.; SILVA, M. B.; CÂMARA, M. P. S. Sensitivity of *Lasiodiplodia theobromae* from Brazilian papaya orchards to MBC and DMI fungicides. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 132, n. 4, p. 489-498, 2012.

PHILLIPS, A. J. L. *Botryosphaeria dothidea* and other fungi associated with excoriose and dieback of grapevines in Portugal. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 146, n. 7, p. 327-332, 1998.

PHILLIPS, A. J. L. *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 41, n. 1, p. 3-18, 2002.

PHILLIPS, A. J. L. **Key to the various lineages in "*Botryosphaeria*"** [on line]. Lisboa: Centro de Recursos Microbiológicos/Faculdade de Ciências e Tecnologia/Universidade Nova de Lisboa, 2007. Disponível em: <http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site/key.htm>. Acesso em: 05 jan. 2014.

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

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

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, p. 29-55, 2008.

PINTO, P. S. G. C. **Doença de Petri da videira: avaliação da eficácia de fungicidas na protecção de feridas de poda**. 69 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrônômica) - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.

PITT, W. M.; HUANG, R.; STEEL, C. C.; SAVOCCHIA, S. Identification, distribution and current taxonomy of Botryosphaeriaceae species associated with grapevine decline in New South Wales and South Australia. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Canberra, v. 16, n. 1, p. 258-271, 2010.

PITT, W. M.; SOSNOSWKI, M. R.; HUANG, R.; QIU, Y.; SAVOCCHIA, S.; STEEL, C. C. Evaluation of fungicides for the management of Botryosphaeria canker of grapevines. **Plant Disease**, St. Paul, v. 96, n. 12, p. 1303-1308, 2012.

PITT, W. M.; HUANG, R.; STEEL, C.C.; SAVOCCHIA, S. Pathogenicity and epidemiology of Botryosphaeriaceae species isolated from grapevines in Australia. **Australasian Plant Pathology**, Canberra, v. 42, n. 5, p. 573-582, 2013a.

PITT, W. M.; ÚRBEZ-TORRES, J. R.; TROUILLAS, F. P. *Dothiorella vidmadera*, a novel species from grapevines in Australia and notes on *Spencermartinsia*. **Fungal Diversity**, Kunning, v. 61, n. 1, p. 209-219, 2013b.

POLL, H.; KIST, B. B.; SANTOS, C. E.; REETZ, E. R., CARVALHO, C.; SILVEIRA, D. N. (Eds.). **Anuário brasileiro da fruticultura 2013**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2013. 136 p.

PROBST, C.; JONES, E. E.; RIDGWAY, H. J.; JASPERS, M. V. *Cylindrocarpon* black foot in nurseries-two factors that can increase infection. **Australasian Plant Pathology**, Canberra, v. 41, n. 2, p. 157-163, 2012.

PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A. (). **Vitivinicultura brasileira: panorama setorial de 2010**. Brasília, Bento Gonçalves, SEBRAE, IBRAVIN/Embrapa Uva e Vinho, 2011. 110 P.

PUNITHALINGAM, E. *Botryodiplodia theobromae*. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1976. 3 p. (CMI. Description of Pathogenic Fungi and Bacteria, 519).

PUNITHALINGAM, E. **Plant diseases attributed to *Botryodiplodia theobromae***. Vaduz: Pat. J. Cramer, 1980. 123 p.

QIU, Y.; STEEL, C. C.; ASH, G. J.; SAVOCCHIA, S. Survey of Botryosphaeriaceae associated with grapevine decline in the Hunter Valley and Mudgee grape growing regions of New South Wales. **Australasian Plant Pathology**, Canberra, v. 40, n. 1, p. 1-11, 2011.

REBELL, G.; FORSTER, R. K. *Lasiodiplodia theobromae* as a cause keratomycoses. **Sabouraudia**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 155-170, 1976.

REGO, C.; NASCIMENTO, T.; CABRAL, A.; SILVA, M. J.; OLIVEIRA, H. Control of grapevine wood fungi in commercial nurseries. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 48, n. 1, p. 128-135, 2009.

REGO, C.; NASCIMENTO, T.; OLIVEIRA, H. Characterisation of *Cylindrocarpon destructans* isolates from grapevine in Portugal. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 40, Supplement, p. S343-S350, 2001.

REGO, C.; OLIVEIRA, H.; CARVALHO, A.; PHILLIPS, A. J. L. Involvement of *Phaeoacremonium* spp. and *Cylindrocarpon destructans* with grapevine decline in Portugal. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 39, n. 1, p. 76-79, 2000.

RIDGWAY, H. J.; AMPONSAH, N. T.; BROWN, D. S.; BASKARATHEVAN, J., JONES, E. E.; JASPERS, M. V. Detection of botryosphaeriaceous species in environmental samples using a multi-species primer pair. **Plant Pathology**, London, v. 60, n. 6, p. 1118-1127, 2011.

ROLSHAUSEN, P. E., ÚRBEZ-TORRES, J. R.; ROONEY-LATHAM, S.; ESKALEN, A.; SMITH, R. J.; GUBLER, W. D. Evaluation of pruning wound susceptibility and protection against fungi associated with grapevine trunk diseases. **American Journal of Enology and Viticulture**, Sand Diego, v. 61: n. 1, p. 113-119, 2010.

RUMBOS, I.; RUMBOU, A. Fungi associated with esca and young grapevine decline in Greece. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 40, Supplement, p. S330-S335, 2001.

SCHECK, H. J.; VASQUEZ, S. J.; GUBLER, W. D. First report of black-foot disease, caused by *Cylindrocarpon obtusisporum*, of grapevine in California. **Plant Disease**, St. Paul, v. 82, n. 4, p. 448, 1998.

SCHECK, H. J.; VASQUEZ, S. J.; FOGLE, D.; GUBLER, W. D. Grape growers report losses to black-foot and grapevine decline. **California Agriculture**, Davis, v. 52, p. 19-23, 1998.

SCHROERS, H. J.; ZERJAV, M.; MUNDA, A.; HALLEEN, F.; CROUS, P. W. *Cylindrocarpon pauciseptatum* sp. nov., with notes on *Cylindrocarpon* species with wide, predominantly 3-septate macroconidia. **Mycological Research**, London, v. 112, n. 1, p. 82-92, 2008.

SHOEMAKER, R. A. Conidial states of some *Botryosphaeria* species on *Vitis* and *Quercus*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 42, n. 12, p. 1297-1301, 1964.

- SILVA, P. C. G.; COELHO, R. C. Caracterização social e econômica da cultura da videira. In: LEÃO, P. C. S.; SOARES, J. M. (Eds.). **Cultivo da videira**. 2. ed. [on line] Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2010. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/CultivodaVideira_2ed/Cara-terizaca_social_da_%20videira.html> Acesso em: 08 de jan. de 2014.
- SLIPPERS B.; CROUS, P. W.; DENMAN, S.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. C.; WINGFIELD, M. J. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. **Mycologia**, Bronx, v. 96, p. 83-101, 2004.
- SLIPPERS, B.; JOHNSON, G. I.; CROUS, P. W.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. C.; WINGFIELD, M. J. Phylogenetic and morphological re-evaluation of the *Botryosphaeria* species causing diseases of *Mangifera indica*. **Mycologia**, Bronx, v. 97, n. 1, p. 99-110, 2005.
- SLIPPERS, B.; SMIT, W. A.; CROUS, P. W.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. C.; WINGFIELD, M. J. Taxonomy, phylogeny and identification of Botryosphaeriaceae associated with pome and stone fruit trees in South Africa and other regions of the world. **Plant Pathology**, London, v. 56, n. 1, p. 128-139, 2007.
- SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. **Fungal Biology Reviews**, London, v. 21, n. 2-3, p. 90-106. 2007.
- SOFIA, J.; NASCIMENTO, T.; GONÇALVES, M. T.; REGO, C. Contribution for a better understanding of grapevine fungal trunk diseases in the Portuguese Dão wine region. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 52, n. 2, p. 324-334, 2013.
- SÔNEGO, O. R.; INÁCIO, C. A.; DIANESE, J. C. First report of *Botryosphaeria dothidea* and *Eutypa lata* on grapevine in Rio Grande do Sul. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 24, n.3, p. 333, 1999.
- SPAGNOLO, A.; MARCHI, G.; PEDUTO, F.; PHILLIPS, A. J. L.; SURICO G. Detection of Botryosphaeriaceae species within grapevine woody tissues by nested PCR, with particular emphasis on the *Neofusicoccum parvum*/*N. ribis* complex. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 129, n. 3, p. 485-500, 2011.
- SUMMERBELL, R.C.; KRAJDEN, S.; LEVINE, R.; FUSKA, M. Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Lasiodiplodia theobromae* and successfully treated surgically. **Medical Mycology**, New York, v. 42, n. 6, p. 543-543, 2004.
- SURICO, G.; MUGNAI, L.; MARCHI, G. Older and more recent observations on esca: a critical overview. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 45, n. 1, p. 68-86, 2006.
- SUTTON, B. C. **The Coelomycetes**: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696 p.
- TAN, D. H. S.; SIGLER, L.; GIBAS, C. F. C.; FONG, I. W. Disseminated fungal infection in a renal transplant recipient involving *Macrophomina phaseolina* and *Scytalidium dimidiatum*: case report and review of taxonomic changes among medically important members of the Botryosphaeriaceae. **Medical Mycology**, New York, v. 46, n. 3, p. 285-292, 2008.

- TAVARES, S. C. C. H. Epidemiologia e manejo integrado de *Botryodiplodia theobromae* - situação atual no Brasil e no mundo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 3, p. 46-52, 2002.
- TAVARES, S. C. C. H.; LIMA, V. C. **A indicação geográfica da uva de São Vicente Ferrer e Macaparana – PE a partir das pesquisas da Embrapa**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos UEP Nordeste, 2009. 10 p. (Embrapa Solos UEP Nordeste.Circular Técnica, 43).
- TAYLOR, A.; HARDY, G. E. S.; WOOD, P.; BURGUESS, T. Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* species associated with grapevine decline in Western Australia. **Australasian Plant Pathology**, Canberra, v. 34, n. 2, p. 187-195, 2005.
- TAYLOR, J. W.; JACOBSON, D. J.; KROKEN, S.; KASUGA, T.; GEISER, D. M.; HIBBETT, D. S.; FISHER, M. C. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v. 31, n. 1, p. 21-32. 2000.
- ÚRBEZ-TORRES, J. R. The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 50, Supplement, p. S5-S45, 2011.
- ÚRBEZ-TORRES, J. R.; BATTANY, M.; BETTIGA, L.J.; GISPERT, C.; MCGOURTY, G.; RONCORONI, J.; SMITH, R.J.; VERDEGAAL, P.; GUBLER, W. D. *Botryosphaeriaceae* species spore-trapping studies in California vineyards. **Plant Disease**, St. Paul, v. 94, n. 6, p. 717-724, 2010.
- ÚRBEZ-TORRES, J. R.; ADAMS, P.; KAMAS, J.; GUBLER, W. D. Identification, incidence, and pathogenicity of fungal species associated with grapevine dieback in Texas. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 60, n. 4, p. 497-507, 2009.
- ÚRBEZ-TORRES, J. R.; GUBLER, W. D. Pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species isolated from grapevine cankers in California. **Plant Disease**, St. Paul, v. 93, n. 6, p. 584-592, 2009.
- ÚRBEZ-TORRES, J. R.; GUBLER, W. D. Susceptibility of grapevine pruning wounds to infection by *Lasiodiplodia theobromae* and *Neofusicoccum parvum*. **Plant Pathology**, London, v. 6, n. 2, p. 261-270, 2011.
- ÚRBEZ-TORRES, J. R.; LEAVITT, G. M.; GUERRERO, J. C.; GUEVARA, J.; GUBLER, W. D. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. **Plant Disease**, St. Paul, v. 92, n. 4, p. 519-529, 2008.
- ÚRBEZ-TORRES, J. R.; LEAVITT, G. M.; VOEGEL, T. M.; GUBLER, W. D. Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine cankers in California. **Plant Disease**, St. Paul, v. 90, n. 12, p. 1490-1503, 2006.
- ÚRBEZ-TORRES, J. R.; PEDUTO, F.; STRIEGLE, R. K.; URREA-ROMER, J. E. O.; RUPE, J. C.; CARTWRIGHT, R. D.; GUBLER, W. D. Characterization of fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Arkansas and Missouri. **Fungal Diversity**, Kunning, v. 52, n. 1, p. 169-189, 2012.
- ÚRBEZ-TORRES, J.R.; HAAG, P.; BOWEN, P.; O’GORMAN, D.T. Grapevine trunk diseases in British Columbia: incidence and characterization of the fungal pathogens

associated with esca and petri diseases of grapevine. **Plant Disease**, St. Paul, 2014 (Aceito para publicação, <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-05-13-0523-RE>).

VAN COLLER, G. J.; DENMAN, S.; GROENEWALD, J. Z.; LAMPRECHT, S. C.; CROUS P.W. Characterisation and pathogenicity of *Cylindrocladiella* spp. associated with root and cutting rot symptoms of grapevines in nurseries. **Australasian Plant Pathology**, Canberra, v. 34, n. 4, p. 489-498, 2005.

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

VAN NIEKERK, J. M.; FOURIE, P. H.; HALLEN, F.; CROUS, P. *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 45, v. 1, p. 43-54, 2006.

VAN NIEKERK, J. M.; CALITZ, F.J.; HALLEEN, F.; FOURIE, P. Temporal spore dispersal patterns of grapevine trunk pathogens in South Africa. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 127, n. 3, p. 375–390, 2010.

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

VAZ, A. T. A. **Doenças causadas por fungos Botryosphaeriaceae em videira:** caracterização fenotípica e molecular de isolados e sensibilidade a fungicidas. 93 f. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrônômica) - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

VICTOR, D.; CROUS, P. W.; JANSE, B. J. H.; VAN ZYL, W. H.; WINGFIELD, M. J.; ALFENAS, A. Systematic appraisal of species complexes within *Cylindrocladiella*. **Mycological Research**, London, v. 102, n. 3, p. 273-279, 1998.

VON ARX, A. J. **Plant-pathogenic fungi**. Berlin: J. Cramer, 1987. 288 p.

WAITE, H.; GRAMAJE, D.; WHITELAW-WECKERT, M.; TORLEY, P.; HARDIE, W. J. Soaking grapevine cuttings in water: a potential source of cross contamination by micro-organisms. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 52, n. 2, p. 359-368, 2013.

WAITE, H.; MAY, P. The effects of hot water treatment, hydration and order of nursery operations on cuttings of *Vitis vinifera* cultivars. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 44, n. 1, p. 144-152, 2005.

WAITE, H.; MAY, P.; BOSSINGER, G. Variations in phytosanitary and other management practices in Australian grapevine nurseries. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 52, n. 2, p. 369-379, 2013.

WAITE, H.; MORTON, L. Hot water treatment, trunk diseases and other critical factors in the production of high-quality grapevine planting material. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 46, n. 1, p. 5-17, 2007.

WHITEMAN, S. A.; JASPERS, M. V.; STEWART, A.; RIDGWAY, H. J. Detection of *Phaeoconiella chlamydospora* in soil using species-specific PCR. **New Zealand Plant Protection**, Auckland, v. 55, p. 139-145, 2002.

WHITEMAN, S. A.; STEWART, A.; RIDGWAY, H. J.; JASPERS, M. V. Infection of rootstock mothervines by *Phaeoconiella chlamydospora* results in infected young grapevines. **Australasian Plant Pathology**, Canberra, v. 36, n. 2, p. 198-203, 2007.

WOO, P. C. Y.; LAU, S. K. P.; NGAN, A. H. Y.; TSE, H.; TUNG, E. T. K.; YUEN, K. Y. *Lasiodiplodia theobromae* pneumonia in a liver transplant recipient. **Journal of Clinical Microbiology**, New York, v. 46, n. 1, p. 380-384, 2008.

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

ZHOU, S.; SMITH, D. R.; STANOSZ, G. R. Differentiation of *Botryosphaeria* species and related anamorphic fungi using inter simple or short sequence repeat (ISSR) fingerprinting. **Mycological Research**, London, v. 105, n. 8, p. 919-926, 2001.

Capítulo II

Fungal trunk pathogens associated with table grape decline in Northeastern Brazil

Submissão: **Phytopathologia Mediterranea**
Florença, Itália
JCR = 1,34

Fungal trunk pathogens associated with table grape decline in Northeastern Brazil

Kamila Câmara CORREIA¹; Marcos Paz Saraiva CÂMARA¹; Maria Angélica Guimarães BARBOSA²; Rui SALES Jr.³; Carlos AGUSTÍ-BRISACH⁴; David GRAMAJE⁵; Maela LEÓN⁴; José GARCÍA-JIMÉNEZ⁴; Paloma ABAD-CAMPOS⁴; Josep ARMENGOL⁴; Sami Jorge MICHEREFF¹

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, 52171-900 Recife, Pernambuco, Brazil; ²Embrapa Semiárido, Laboratório de Fitopatologia, 56300-970, Petrolina, Pernambuco, Brazil; ³Universidade Federal Rural do Semiárido, Departamento de Ciências Vegetais, 59625-900 Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil; ⁴Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022-Valencia, Spain; ⁵Department of Crop Protection, Institute for Sustainable Agriculture (IAS), Spanish National Research Council (CSIC), Alameda del Obispo s/n, P.O. Box 4084, 14080 Córdoba, Spain

Corresponding author: S.J. Michereff

Fax: +55 81 33206200

E-mail: sami@depa.ufrpe.br

Summary. During the last years a decline of table grape plants has been noticed in nurseries, young plantations and vineyards of the Northeastern region of Brazil, where the management systems for grapevine production are adapted to the specific environmental conditions of a tropical viticulture. Samples of table grape plants showing decline symptoms were obtained from nurseries, young plantations and vineyards located in the São Francisco, Assú and Siriji Valleys in 2010, and were subjected to fungal isolation. Grapevine trunk pathogens were identified using morphological and molecular methods. Species recovered included *Botryosphaeria mamane*, *Campylocarpon fasciculare*, *C. pseudofasciculare*, *Lasiodiplodia crassipora*, *L. parva*, *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae*, *Neofusicoccum parvum*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Pm. parasiticum* and *Phaeomoniella chlamydospora*. They are all reported for the first time on grapevine in Brazil, with the exception of *L. theobromae*. Moreover, *B. mamane*, *L. parva* and *L. pseudotheobromae* are reported for the first time on grapevine worldwide, and *C. fasciculare* is reported for the first time on grapevine in the American continent.

Key words: Botryosphaeriaceae, *Campylocarpon*, *Phaeoacremonium*, *Phaeomoniella*, *Vitis vinifera*.

Introduction

In 2011, 58,236 t of table grapes (*Vitis* spp.) were exported from Brazil, being the main fresh fruit export from this country and accounting for US\$ 141 million (Agrianual, 2012). Most of these table grapes are produced in the Northeastern region, where 9,600 ha are cultivated in three different areas: the São Francisco Valley, located in the semi-arid region of Bahia and Pernambuco States; the Assú Valley, located in the semi-arid region of Rio Grande do Norte State; and the Siriji Valley, located in the humid region of Pernambuco State. The São Francisco Valley is the main table grape growing area in the region, accounting for 98% of the production. The Assú Valley is a new area of production of fine table grapes for export, which was implemented five years ago, while in the Siriji Valley table grapes have been grown for over 40 years with a production intended only for the local market (Araújo and Ramalho, 2009). Northeastern Brazil is a tropical region, thus the management systems for grapevine production are adapted to the specific environmental conditions of a tropical viticulture. In both the dry and wet tropics, the growth and cropping cycle of the vine can be manipulated to extend from 5 to 12 months by a combination of pruning, modifying vine

water status and the use of chemical regulators. Thus, it is possible to achieve two and a half to three vegetative cycles per year (Camargo *et al.*, 2008; Possingham, 2008).

During the last five years a decline of table grape plants has been noticed in nurseries, young plantations and vineyards of the Northeastern regions of Brazil. Symptoms included poor early growth, reduced vigour showing leaf yellowing, wilting and dieback, and different symptoms in wood such as V-shaped necroses when affected arms and trunks were cut in cross-section, and longitudinal brown and black streaking that appeared as necrotic black spots in cross-sections. These symptoms are similar to those described in other viticultural regions worldwide (Luque *et al.*, 2009; Gramaje and Armengol, 2011), which have been associated with several decline diseases such as black dead arm, black foot, eutypiose, esca or Petri disease (Moller and Kasimatis, 1981; Mugnai *et al.*, 1999; Halleen *et al.*, 2006; Mostert *et al.*, 2006; Úrbez-Torres, 2011). Nevertheless, grapevine decline and its associated pathogens are yet to be studied in tropical viticulture. Thus, the aim of this work was to determine the occurrence of fungal trunk pathogens in declining table grapes in Northeastern Brazil.

Materials and methods

Sampling and isolation of fungi

Samples of table grape plants showing decline symptoms were obtained from grapevine nurseries, young plantations and vineyards located in the São Francisco, Assú and Siriji Valleys (Northeastern Brazil) in 2010 (Figure 1), and were subjected to fungal isolation. At least 5–7 plants were analyzed per sample.

Rootstocks, graft unions and scions were examined. Symptomatic wood fragments taken from the margin of dead and healthy tissue, and from internal necroses and brown-black vascular streaking were washed under running tap water, surface-disinfected for 1 min in a 1.5% sodium hypochlorite solution, and washed twice with sterile distilled water. Small pieces of necrotic, discolored or decayed tissues were plated on malt extract agar (MEA) (Oxoid Ltd., Basingstoke, England) supplemented with 0.5 g L⁻¹ of streptomycin sulphate (MEAS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Plates were incubated at 25°C in the dark for 14 to 21 days, and all colonies were transferred to 2% potato dextrose agar (PDA; Biokar-Diagnostics, Zac de Ther, France). Thirty two representative isolates were selected for further

analyses (Table 1). They were hyphal-tipped or single-spored with the serial dilution method, prior to morphological and molecular identification (Dhingra and Sinclair, 1995).

Fungal identification

Morphological identification

Species of the Botryosphaeriaceae were identified by colony and conidial morphology (Phillips, 2006). In order to enhance sporulation, cultures were placed with sterilized pine needles on 2% water agar (WA; Biokar-Diagnostics) at 25°C with a 12-h day (Philips TDL18W/33) (Slippers *et al.*, 2004). Isolates were examined weekly for formation of pycnidia and conidia. Conidial morphology (cell wall, shape, color, and presence or absence of septa) from pycnidia was recorded. Species of *Campylocarpon* were identified by macroscopic characters such as colony texture, color, and the margin on PDA. Colonies grown on PDA were incubated for a further 20 days to determine the presence/absence of chlamydospores. Conidia size was also measured on Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) with the addition of a 1×1 cm piece of filter paper to the colony surface (Halleen *et al.*, 2004). Morphological characters to distinguish species of *Phaeoacremonium* included conidiophore morphology, phialide type and shape, size of hyphal warts and colony characters and pigment production on MEA, PDA and oatmeal agar (OA, 60 g oatmeal; 12.5 g 16 agar; Difco, Osi, Maurepas, France) (Mostert *et al.*, 2006). *Phaeomoniella chlamydospora* was identified by conidiophore morphology, conidial size and shape, and its cultural characteristics on PDA and MEA (Crous and Gams, 2000).

DNA isolation and sequencing

Fungal mycelium and conidia from pure cultures grown on PDA for 2 to 3 weeks at 25°C in the dark were scraped and mechanically disrupted by grinding to a fine powder under liquid nitrogen using a mortar and pestle. Total DNA was extracted using the E.Z.N.A. Plant Miniprep Kit (Omega Bio-tek, Doraville, GA, USA) following manufacturer's instructions. DNA was visualized on 0.7% agarose gels stained with ethidium bromide and stored at -20°C.

Identification of Botryosphaeriaceae species was confirmed by analysis of elongation factor 1- α gen (EF) amplified using EF1-728F and EF1-986R primers (Carbone and Kohn, 1999). For *Campylocarpon* species identification, the internal transcribed spacer (ITS) region of DNA was amplified using the fungal universal primers ITS1F and ITS4 (Gardes and

Bruns, 1993) and partial sequence of the first part of the β -tubulin gene, BT, were amplified using primers BT1a and BT1b (Petit and Gubler, 2005). PCR products were purified with the High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and sequenced in both directions by Macrogen Inc., Sequencing Center (Seoul, South Korea). *Phaeoacremonium* species were confirmed by sequence analysis of the β -tubulin gene using primer sets T1 (O'Donnell and Cigelnik, 1997) and Bt2b (Glass and Donaldson, 1995), and by comparison with the polyphasic, online identification system for *Phaeoacremonium* species recognition (<http://www.cbs.knaw.nl/phaeoacremonium/biolomics.aspx>) developed by Mostert *et al.* (2006). *Pa. chlamydospora* was identified by PCR using primers Pch1-Pch2 (Tegli *et al.*, 2000), and confirmed by sequencing the ITS region of DNA using the primers ITS1F and ITS4 (Gardes and Bruns, 1993).

Results and discussion

Based on their appearance in culture, the isolates obtained from the margin of dead and healthy tissue, and from internal necroses and brown-black vascular streaking of symptomatic wood fragments of trunks and branches could be assigned to three main fungal groups.

The first group was characterized by dark green or gray to dark gray fast-growing mycelium on PDA. With age, most of these cultures developed single or grouped, black, globose fruiting bodies (pycnidia) on the surface of pine needles on WA releasing either pigmented or hyaline conidia characteristic of Botryosphaeriaceae spp. (Van Niekerk *et al.*, 2004; Phillips, 2006). BLASTn searches in GenBank showed that EF sequences of Botryosphaeriaceae isolates from Northeastern Brazil had 99 to 100% identity with isolates of *Botryosphaeria mamane* CMW 13416 (GU134938), *Lasiodiplodia crassipora* CMW 22653 (FJ888452), *L. parva* CMW 28309 (GQ469904), *L. pseudotheobromae* CMW 26702 (GQ471796), *L. theobromae* CMW 28311 (GQ469898) and *Neofusicoccum parvum* CMW 26718 (FJ900658).

The second group of isolates was characterized by pale to medium brown flat slow-growing cultures on MEA. Different types of phialides that were variable in size and shape were observed in the aerial mycelium, and either discrete or integrated in conidiophores. Sporulation was abundant and conidia were hyaline and aseptate. All morphological characters corresponded to the genus *Phaeoacremonium* (Mostert *et al.* 2006). BLASTn searches showed that BT sequences of these isolates had 99 and 100% identity with isolates

of *Pm. aleophilum* CBS 631.94 (JQ691663) and *Pm. parasiticum* P46 (HQ605022), respectively.

The last fungal group was characterized by grey-olivaceous to olivaceous-black, slow-growing colonies with sparse aerial mycelium. They showed abundant straight, pigmented conidia and dark green-brown conidiophores with light green to hyaline conidiogenous cells. These morphological characters corresponded to the genus *Phaeomoniella* (Crous and Gams, 2000). BLASTn searches showed that the ITS sequences of these isolates had 100% identity with isolates previously identified as *Phaeomoniella chlamydospora* Pach-302 (JQ822210).

Additionally, isolates obtained from the crown area showed colonies with white to off-white or slightly brownish cottony to felty aerial mycelium. Abundant curved macroconidia, up to 6-septate with obtuse apical and basal cells, were observed. Microconidia were absent. These morphological characters corresponded to the genus *Campylocarpon* (Halleen *et al.*, 2004). In this case, BLASTn searches showed that the BT sequences of these isolates had 98 and 100% identity with isolates of *C. fasciculare* CBS 112611 (AY677225) and *C. pseudofasciculare* CBS 112679 (AY677214), respectively, and the ITS sequences of these isolates had 99% identity with isolates of *C. fasciculare* CBS 113559 (AY677303) and *C. pseudofasciculare* FI2034 (GU198190). Sequences and Blast results of representative isolates of each species derived in this study were lodged in GenBank (Table 2).

These results show the high diversity of fungal trunk pathogens found in table grapes in Northeastern Brazil. These include species of Botryosphaeriaceae (*Botryosphaeria mamane*, *Lasiodiplodia crassipora*, *L. parva*, *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae* and *Neofusicoccum parvum*), species belonging to the genera *Campylocarpon* (*C. fasciculare* and *C. pseudofasciculare*) and *Phaeoacremonium* (*Pm. aleophilum* and *Pm. parasiticum*), and *Phaeomoniella chlamydospora*. These are all reported for the first time on grapevine in Brazil, with the exception of *L. theobromae* (Gava *et al.*, 2010), which was the only species present in all production areas surveyed. Moreover, *Botryosphaeria mamane*, *Lasiodiplodia parva* and *L. pseudotheobromae* are reported for the first time on grapevine, and *C. fasciculare* is reported for the first time in the American continent. These species could be distinguished based on their DNA sequence data and unique morphological characters.

The most frequently isolated Botryosphaeriaceae sp. was *L. theobromae*, which is an important pathogen of mango (*Mangifera indica* L.) and papaya (*Carica papaya* L.) crops in Northeastern Brazil (Costa *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2012). *Neofusicoccum parvum* is also prevalent in this region causing tip dieback and stem-end rot symptoms on mango (Costa *et al.*, 2010). Although further research is needed to explain the role that inoculum of

Botryosphaeriaceae spp. From non-grapevine hosts surrounding vineyards has on the disease cycle, the wide host range of this family could potentially provide an important source of primary inoculum in table grapes, due to the numerous fruiting bodies produced on non-grapevine hosts (Úrbez-Torres, 2011).

Regarding the genus *Campylocarpon*, it was established in 2004 with two species *C. fasciculare* and *C. pseudofasciculare* associated with black-foot disease of grapevine in South Africa (Halleen *et al.*, 2004). Subsequently *C. pseudofasciculare* and *C. fasciculare* were reported in Uruguay (Abreo *et al.*, 2010) and Spain (Alaniz *et al.*, 2011), respectively.

Phaeomoniella chlamydospora and *Pm. aleophilum* are species commonly isolated from young vines showing a general decline (Mugnai *et al.*, 1999). Numerous other species of the genus *Phaeoacremonium* have also been associated with grapevine decline in grape-growing regions throughout the world, although their importance is thought to be minor (Mostert *et al.*, 2006; Essakhi *et al.*, 2008; Gramaje *et al.*, 2009). One of these species is *Pm. parasiticum*, which in the American continent had already been reported in Argentina, Chile and Peru (Mostert *et al.*, 2006; Romero-Rivas *et al.* 2009). It is interesting to note that *Pm. parasiticum*, under its original name *Phialophora parasitica*, was the first species of *Phaeoacremonium* reported to cause phaeohyphomycosis in humans (Ajello *et al.*, 1974). This species has also been reported in Brazil causing subcutaneous infections in humans (Guarro *et al.*, 2003; Marques *et al.*, 2006) and is a good example of the wide substrate range of *Phaeoacremonium* spp. (Mostert *et al.*, 2006).

Fungal trunk pathogens are becoming an important problem to the table grape industry in Brazil. Our study improves the knowledge of the fungal species involved in table grape decline in this country and contributes to a better understanding of this complex syndrome under the specific conditions of a developing tropical viticulture.

Acknowledgements

This work was financially supported by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco - FACEPE (APQ 137-5.01/12, IBPG-0674-5.01/09) and by Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (Project 203/2009 - International Cooperation CAPES-Brazil/DGU-Spain). We are thankful to CAPES (Brazil) for the research fellowships granted to K. C. Correia and S. J. Michereff.

Literature cited

- Abreo E., S. Martínez, L. Betucci and S. Lupo, 2010. Morphological and molecular characterization of *Campylocarpon* and *Cylindrocarpon* spp. associated with black foot disease of grapevines in Uruguay. *Australasian Plant Pathology* 39, 446–452.
- Agrianual, 2012. *Anuário da Agricultura Brasileira*. São Paulo: Informa Economics/FNP South America, 474–482.
- Ajello L., L.K. Georg, R.T. Steigbigel and C. J.K. Wang, 1974. A case of phaeohyphomycosis caused by a new species of *Phialophora*. *Mycologia* 66, 490–498.
- Alaniz S., C. Agustí-Brisach, D. Gramaje, M.I. Aguilar, A. Pérez-Sierra. and J. Armengol, 2011. First report of *Campylocarpon fasciculare* causing black foot disease of grapevine in Spain. *Plant Disease* 95, 1028–1029.
- Araújo, J.L.P., P.J.P Ramalho, 2009. Custos de produção. In: *A Viticultura no Semiárido Brasileiro* (J.M. Soares, P.C.S. Leão, ed.). Embrapa Informação Tecnológica, Brasília DF, Brasil, 727–736.
- Camargo U.A., J.F.S. Protas and L.M.R. Mello, 2008. Grape growing and processing in Brazil. *Acta Horticulturae* 785, 51–57.
- Carbone I. and L.M. Kohn, 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91, 553–556.
- Costa V.S.O, S.J. Michereff, R.B. Martins, C.A.T. Gava, E.S.G. Mizubuti and M.P.S. Câmara, 2010. Species of Botryosphaeriaceae associated on mango in Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 127, 509–519.
- Crous P.W. and W. Gams, 2000. *Phaeomoniella chlamydospora* gen. et comb. nov., a causal organism of Petri grapevine decline and esca. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 112–188.
- Dhingra O.D. and J.B. Sinclair, 1995. *Basic Plant Pathology Methods*. 2nd ed., CRC Press. Boca Raton, FL, USA, 434 pp.
- Essakhi S., L. Mugnai, P.W. Crous, J.Z. Groenewald and G. Surico, 2008. Molecular and phenotypic characterization of novel *Phaeoacremonium* species associated with Petri disease and esca of grapevine. *Persoonia* 21, 119–134.
- Gardes M. and T.D. Bruns, 1993. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2, 113–118.
- Gava R., M. Menegotto, A.F. Urben and L.R. Garrido, 2010. Identification of Botryosphaeriaceae anamorphs associated to grapevines in Brazil. *Phytopathologia Mediterranea* 49, 113 (abstract).

- Glass N.L. and G.C. Donaldson, 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous infection due to *Phaeoacremonium* spp. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 1332–1336.
- Gramaje D. and J. Armengol, 2011. Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. *Plant Disease* 95, 1040–1055.
- Gramaje D., J. Armengol, H. Mohammadi, Z. Banihashemi and L. Mostert, 2009. Novel *Phaeoacremonium* species associated with Petri disease and esca of grapevines in Iran and Spain. *Mycologia* 101, 920–929.
- Guarro J., S.H. Alves, J. Gené, N.A. Grazziotin, R. Mazzuco, C. Dalmagro, J. Capilla, L. Zaror and E. Mayayo, 2003. Two cases of subcutaneous infection due to *Phaeoacremonium* spp. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 1332–1336.
- Halleen F., H.J. Schroers, J.Z. Groenewald and P.W. Crous, 2004. Novel species of *Cylindrocarpon* (*Neonectria*) and *Campylocarpon* gen. nov. associated with black foot disease of grapevines (*Vitis* spp.). *Studies in Mycology* 50, 431–455.
- Halleen F., P.H. Fourie and P.W. Crous, 2006. A review of black foot disease of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 45S, 55–67.
- Luque J., S. Martos, A. Aroca, R. Raposo and F. García-Figueres, 2009. Symptoms and fungi associated with declining mature grapevine plants in northeast Spain. *Journal of Plant Pathology* 91, 381–390.
- Marques S.A., R.M. Camargo, R.C. Summerbell, G.S. De Hoog, P. Ishioka, L.M. Chambô-Cordaro, M.E. Marques, 2006. Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Phaeoacremonium parasiticum* in a renal transplant patient. *Medical Mycology* 44, 671–676.
- Moller, W.J. and A.N. Kasimatis, 1981. Further evidence that *Eutypa armeniacae* - not *Phomopsis viticola* - incites dead arm symptoms on grape. *Plant Disease* 65, 429–431.
- Mostert L., J.Z. Groenewald, R.C. Summerbell, W. Gams and P.W. Crous, 2006. Taxonomy and pathology of *Togninia* (Diaporthales) and its *Phaeoacremonium* anamorphs. *Studies in Mycology* 54, 1–115.
- Mugnai L., A. Graniti and G. Surico, 1999. Esca (black measles) and brown wood-streaking: two old and elusive diseases of grapevines. *Plant Disease* 83, 404–416.
- O'Donnell K. and E. Cigelnik, 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7, 103–116.

- Pereira A.V.S., R.B. Martins, S.J. Michereff, M.B. Silva and M.P.S. Câmara, 2012. Sensitivity of *Lasiodiplodia theobromae* from Brazilian papaya orchards to MBC and DMI fungicides. *European Journal of Plant Pathology* 132, 489–498.
- Petit E. and W.D. Gubler, 2005. Characterization of *Cylindrocarpon* species, the cause of black foot disease of grapevine in California. *Plant Disease* 89, 1051–1059.
- Phillips A.J.L., 2006. The *Botryosphaeria* site. http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site
- Possingham J.V., 2008. Developments in the production of table grapes, wine and raisins in the tropical regions of the world. *Acta Horticulturae* 785, 45–50.
- Romero-Rivas L.C., L.A. Álvarez, D. Gramaje and J. Armengol, 2009. First report of *Phaeoacremonium parasiticum* causing Petri Disease of grapevine in Perú. *Plant Disease* 93, 200.
- Slippers B., P.W. Crous, S. Benman, T.A. Coutinho, B.D. Wingfield and M.J. Wingfield, 2004. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia* 96, 83–101.
- Tegli S., E. Bertelli and G. Surico, 2000. Sequence analysis of ITS ribosomal DNA in five *Phaeoacremonium* species and development of a PCR-based assay for the detection of *P. chlamydosporum* and *P. aleophilum* in grapevine tissue. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 134–149.
- Úrbez-Torres J. R., 2011. The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 50, S5–S45.
- Van Niekerk J.M., P.W. Crous, J.Z.E. Groenewald, P.H. Fourie and F. Halleen, 2004. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia* 96, 781–98.

Table 1. List of fungal trunk pathogens isolated from table grapes in Northeastern Brazil, with their geographical origin.

Species	Isolate	State/Town		Rootstock/scion ^a
<i>Botryosphaeria mamane</i>	BV1	Rio Grande do Norte	Assú	572/Red Globe
<i>Campylocarpon fasciculare</i>	BV2		Assú	572/Red Globe
	BV3		Assú	572/Red Globe
	BV4		Assú	572/Red Globe
	BV5		Assú	572/Red Globe
	BV6		Assú	572/Red Globe
	<i>Campylocarpon pseudofasciculare</i>	BV7		Assú
<i>Lasiodyplodia crassispora</i>	BV8	Pernambuco	Petrolina	766/nd
<i>Lasiodyplodia parva</i>	BV9		Petrolina	572/nd
<i>Lasiodyplodia pseudotheobromae</i>	BV10		Machados	cv. Isabel
	BV11		Machados	cv. Isabel
	BV12		Machados	cv. Isabel
<i>Lasiodyplodia theobromae</i>	BV13		Machados	cv. Isabel
	BV14		Machados	cv. Isabel
	BV15		Petrolina	572/nd
	BV16		Petrolina	313/nd
	BV17		Petrolina	SO4/nd
	BV18		Machados	cv. Isabel
	BV19		Machados	cv. Isabel
	BV20		Petrolina	420 A/nd
	BV21	Rio Grande do Norte	Assú	572/Red Globe
	BV22		Assú	572/Red Globe
<i>Neofusicoccum parvum</i>	BV23	Pernambuco	Petrolina	313/nd
	BV24		Machados	cv. Isabel
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	BV25		Petrolina	572/nd
	BV26		Petrolina	SO4/nd
	BV27		Petrolina	766/nd
<i>Phaeoacremonium parasiticum</i>	BV28		Machados	cv. Isabel
	BV29		Machados	cv. Isabel
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	BV30		Petrolina	SO4/nd
	BV31		Machados	cv. Isabel
	BV32		Machados	cv. Isabel

^and = not determined, and grapevines cv. Isabel are planted without rootstock.

Table 2. List of fungal trunk pathogens isolated from table grapes in Northeastern Brazil, with their corresponding GenBank accession numbers and data of Blast results obtained from GenBank.

Species	Isolate	GenBank accessions ^a	Blast accessions ^b	Query length	Gaps ^c	Identities ^d	Maximum identity (%)
Elongation factor1-α gen							
<i>Botryosphaeria mamane</i>	BV1	JX521846	GU134938	440	1/425	424/425	99
<i>Lasiodiplodia crassispora</i>	BV8	JX521847	FJ888452	458	0/443	443/443	100
<i>Lasiodiplodia parva</i>	BV9	JX521848	GQ469904	482	0/464	459/464	99
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	BV10	JX521849	GQ471796	480	0/462	462/462	100
	BV11	JX521850	GQ471796	485	0/462	462/462	100
	BV12	JX521851	GQ471796	478	0/457	457/457	100
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	BV13	JX521852	GQ469898	481	1/470	467/470	99
	BV14	JX521853	GQ469898	477	1/468	465/468	99
	BV15	JX521854	GQ469898	476	0/467	464/467	99
	BV16	JX521855	GQ469898	488	0/475	473/475	99
	BV17	JX521856	GQ469898	468	0/454	453/454	99
	BV18	JX521857	GQ469898	488	1/476	473/476	99
	BV19	JX521858	GQ469898	472	1/459	456/459	99
	BV20	JX521859	GQ469898	478	1/467	465/467	99
	BV21	JX521860	GQ469898	481	1/470	467/470	99
	BV22	JX521861	GQ469898	483	0/470	468/470	99
<i>Neofusicoccum parvum</i>	BV23	JX521862	FJ900658	457	0/440	435/440	99
	BV24	JX521863	FJ900658	447	0/431	427/431	99
β-tubulin gene							
<i>Campylocarpon fasciculare</i>	BV2	JX521835	AY677225	244	0/242	238/242	98
	BV3	JX521836	AY677225	212	0/212	208/212	98
	BV4	JX521837	AY677225	250	0/247	243/247	98
	BV5	JX521838	AY677225	227	0/227	223/227	98
	BV6	JX521839	AY677225	249	0/249	244/249	98
<i>Campyl. pseudofasciculare</i>	BV7	JX521840	AY677214	215	0/215	215/215	100
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	BV25	JX521841	JQ691663	651	0/651	650/651	99
	BV26	JX521842	JQ691663	657	0/655	655/655	100
	BV27	JX521843	JQ691663	649	0/649	649/649	100
<i>Phaeoacremonium parasiticum</i>	BV28	JX521844	HQ605022	673	0/673	673/673	100
	BV29	JX521845	HQ605022	694	1/695	694/695	99
Internal Transcribed Spacer region of DNA							
<i>Campylocarpon fasciculare</i>	BV2	JX521864	AY677303	563	0/495	493/495	99
	BV3	JX521865	AY677303	563	0/495	493/495	99
	BV4	JX521866	AY677303	562	0/495	493/495	99
	BV5	JX521867	AY677303	558	0/495	493/495	99
	BV6	JX521868	AY677303	552	0/493	491/493	99
<i>Campyl. pseudofasciculare</i>	BV7	JX521869	GU198190	564	2/510	508/510	99
<i>Phaeoconiella chlamydospora</i>	BV30	JX521870	JQ822210	404	0/404	404/404	100
	BV31	JX521871	JQ822210	383	0/383	383/383	100
	BV32	JX521872	JQ822210	399	0/399	399/399	100

^a Corresponding GenBank accession numbers of fungal trunk pathogens isolated from table grapes in Northeastern Brazil.

^b GenBank accession numbers blasted with the isolates obtained in this study.

^c Number of spaces introduced into the alignment to compensate for insertions and deletions in our sequence relative to blasted sequences.

^d Number of nucleotides of our sequences/Number of nucleotides of blasted sequences.

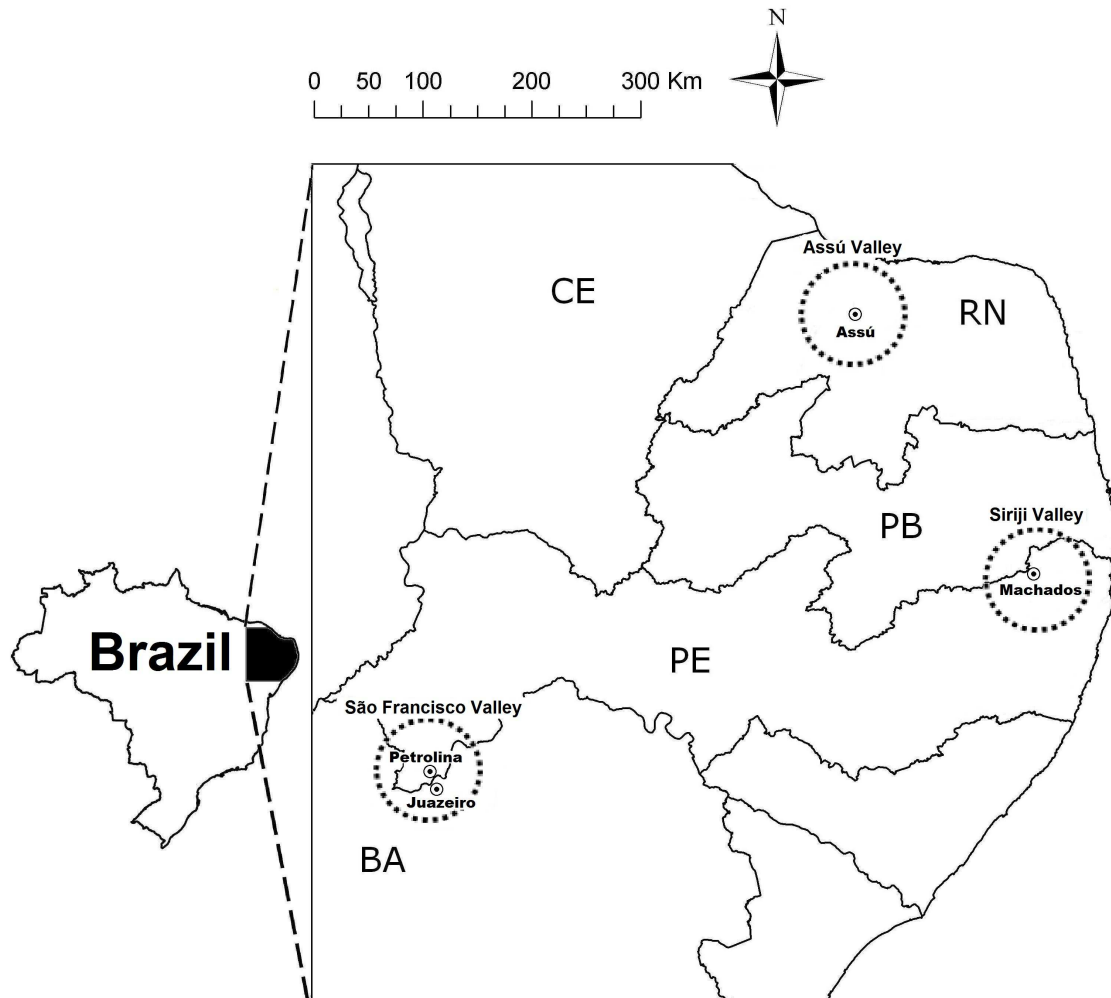


Figure 1. Table grape growing areas surveyed in Northeastern Brazil (the São Francisco, Assú and Siriji Valleys) in 2010.

Capítulo III

Species of *Lasiodiplodia* responsible for table grape dieback in the main Brazilian exporting region

Submissão: **Fungal Diversity**
Kunming, China
JCR = 5,32

Species of *Lasiodiplodia* responsible for table grape dieback in the main Brazilian exporting region

Kamila C. Correia¹, Marcondes A. Silva¹, Marcos A. de Moraes Jr.², Josep Armengol³, Alan J. L. Phillips⁴, Marcos P. S. Câmara¹, Sami J. Michereff^{1*}

¹ Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife, Brazil

² Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, 50732-970 Recife, Brazil

³ Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, 46022 Valencia, Spain

⁴ Centro de Recursos Microbiológicos, Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal

* Corresponding author: S. J. Michereff - e-mail: sami@depa.ufrpe.br

Telephone number: +55 8133206208

Fax number: +55 8133206200

Abstract This study aims to identify and characterize species of *Lasiodiplodia* responsible for table grape dieback in São Francisco Valley, the main Brazilian exporting region. Fungal identifications were made using a combination of morphology together with a phylogenetic analysis based on partial translation elongation factor 1- α sequence (EF1- α) and internal transcribed spacers (ITS). Eight species of *Lasiodiplodia* were identified: *L. brasiliense*, *L. crassispora*, *L. egyptiaca*, *L. euphorbicola*, *L. hormozganensis*, *L. jatrophiicola*, *L. pseudotheobromae* and *L. theobromae*. Only three these species had previously been reported in grapevine, while all the other species are reported for the first time in association with this host in Brazil and worldwide. *Lasiodiplodia theobromae* was the prevalent species. All species of *Lasiodiplodia* were pathogenic on detached green shoots of grapevine, with *L. brasiliense* being the most virulent.

Keywords Botryosphaeriaceae, Phylogeny, Trunk disease, Virulence, *Vitis vinifera*

Introduction

Table grape (*Vitis* spp.) is an important fresh fruit exported by Brazil. In 2011, 59,400 t of table grapes were exported and accounting for US\$ 136 million (FAO 2014). The Northeastern region is responsible for 99% of Brazilian exports of table grapes, where 9,600 ha are cultivated. The São Francisco Valley, located in the semi-arid region of Bahia and Pernambuco States, is the main table grape growing area in the region, accounting for 98% of the production (Lazzarotto and Fioravanço 2013).

Northeastern Brazil is a tropical region, thus the management systems for grapevine production are adapted to the specific environmental conditions of a tropical viticulture. In the dry tropic, the growth and cropping cycle of the vine can be manipulated to extend from 5 to 12 months by a combination of pruning, modifying vine water status and the use of chemical regulators. Thus, it is possible to achieve two and a half to three vegetative cycles per year (Camargo et al. 2008; Possingham 2008).

Table grapes are affected by various pests and pathogens. Among the wide range of diseases that impact on table grape production in Brazil, dieback has become increasingly important (Garrido et al. 2011). The first report of grapevine dieback in Brazil was in 1992 (Ribeiro et al. 1992) and since then the intensity of the disease has increased leading, in some cases, to drastic reductions in longevity and productivity of the plants, greatly increasing production costs (Garrido et al. 2011).

Grapevine dieback is caused by a complex of fungi, but members of the Botryosphaeriaceae are considered to be the most important (Úrbez-Torres 2011; Larignon 2012; Úrbez-Torres et al. 2012). *Lasiodiplodia* Ellis & Everh. is a member of the Botryosphaeriaceae, a genus-rich family in the Dothideomycetes, containing numerous species with a cosmopolitan distribution that occur on a large variety of plant hosts, on which they are found as saprophytes, parasites, and endophytes (Slippers and Wingfield 2007; Liu et al. 2012; Phillips et al. 2013; Wikee et al. 2013). *Lasiodiplodia* species are common, especially in tropical and subtropical regions (Punithalingam 1980; Burgess et al. 2006), where they cause a variety of diseases in up to 650 plant hosts (Farr and Rossman 2014). The fungus has been reported as a grapevine pathogen worldwide associated with several disease symptoms including stunted growth, dieback of shoots, spurs and arms, canker of trunk or arms, wedge-shape cankers in the vascular tissue and mortality (Larignon et al. 2001; van Niekerk et al. 2004; Amponsah et al. 2011; Úrbez-Torres 2011; Úrbez-Torres et al. 2012).

Besides grapevine, several other crops of economic importance are affected by *Lasiodiplodia* in Brazil, especially avocado (*Persea americana* Mill.), banana (*Musa* spp.), barbados cherry (*Malpighia glabra* L.), cacao (*Theobromae cacao* L.), cashew (*Anacardium occidentale* L.), castor bean (*Ricinus communis* L.), citrus (*Citrus* spp.), coconut palm (*Cocos nucifera* L.), custard apple (*Annona squamosa* L.), guarana (*Paullinia cupana* Ducke), guava (*Psidium guajava* L.), mango (*Mangifera indica* L.), muskmelon (*Cucumis melo* L.), papaya (*Carica papaya* L.), passion fruit (*Passiflora edulis* Sims), physic nut (*Jatropha curcas* L.), soursop (*Annona muricata* L.) and watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) (Tavares 2002; Freire et al. 2003; Costa et al. 2010; Muniz et al. 2012; Marques et al. 2013; Machado et al. 2014; Netto et al. 2014).

The main features that distinguish *Lasiodiplodia* from other closely related genera are the presence of pycnidial paraphyses and longitudinal striations on mature conidia (Sutton 1980; Phillips et al. 2008). The taxonomic history of *Lasiodiplodia* is confused, but after 150 years this trend ended with the monograph of Punithalingam (1976), which reduced most species to synonymy with *L. theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl. However, in recent years, the use of molecular tools has been offering meaningful advances at the species identification of *Lasiodiplodia* and 24 new species have been reported since 2004 (Phillips et al. 2013; Machado et al. 2014 ; Netto et al. 2014).

Four species of *Lasiodiplodia* have been found associated with grapevine dieback worldwide: *L. crassispora* T.I. Burgess & Barber, *L. missouriana* J.R. Úrbez-Torres, F. Peduto & W.D. Gubler, *L. theobromae* L. *pseudotheobromae* A.J.L. Phillips, A. Alves &

Crous, *L. parva* A.J.L. Phillips, A. Alves & Crous, and *L. viticola* J.R. Úrbez-Torres, F. Peduto & W.D. Gubler (Phillips 2002; Taylor et al. 2005; Qiu et al. 2011; Úrbez-Torres 2011; Larignon 2012; Úrbez-Torres et al. 2012; Abreo et al. 2013; Bertsch et al. 2013; Billones-Baaijens et al. 2013; Correia et al. 2013; Pitt et al. 2013; Yan et al. 2013). Among these, *L. theobromae* has been reported to be the most prevalent and virulent in grapevine worldwide (van Niekerk et al. 2006; Úrbez-Torres et al. 2008; Qiu et al. 2011; Úrbez-Torres 2011; Pitt et al. 2013; Yan et al. 2013).

In Brazil, thirteen species of *Lasiodiplodia* were reported (Costa et al. 2010; Correia et al. 2013; Marques et al. 2013; Machado et al. 2014; Netto et al. 2014), and only *L. theobromae*, *L. crassispora*, *L. pseudotheobromae* and *L. parva* has been reported on grapevine (Garrido et al. 2011; Correia et al. 2013). However, in some works, identifications of *L. theobromae* from grapevine were based primarily on morphological and cultural data, which is now considered to be unreliable for species discrimination since the morphological characteristics overlap with other species of *Lasiodiplodia* (Costa et al. 2010).

The increasing economic importance of dieback caused by *Lasiodiplodia* in grapevine and the recent discovery of several new species of fungus associated with tropical plants led us to speculate that more than one species of *Lasiodiplodia* may be associated with table grape dieback in São Francisco Valley, Northeastern Brazil. The disease etiology is crucial for epidemiological studies and for a better understanding of the distribution and importance of individual species, as well as finding effective management strategies to each pathogen. Therefore, the objective of this study were (a) to identify species of *Lasiodiplodia* associated with dieback of table grapes in São Francisco Valley, (b) to investigate the prevalence and distribution of the species in the region and (c) to evaluate their pathogenicity and virulence in excised green shoots of table grape.

Materials and methods

Sampling and fungal isolation

During 2012 and 2013, isolates of *Lasiodiplodia* were obtained from 14 vineyards located in São Francisco Valley, Northeastern Brazil. These isolates represented three table grape populations (Casa Nova, Juazeiro and Petrolina) according to their geographical origin (Fig. 1). In each vineyard, 10 grapevines exhibiting dieback symptoms were sampled for tissue isolation. Symptomatic wood fragments taken from the margin of dead and healthy tissue, and

from internal necroses were washed under running tap water, surface-disinfected for 1 min in a 1.5% sodium hypochlorite solution, and washed twice with sterile distilled water. Small pieces (4-5 mm) of tissue were taken from the margin between necrotic and apparently healthy tissue to be plated onto potato dextrose agar (PDA) (Acumedia, Lansing, USA) amended with 0.5 g l⁻¹ streptomycin sulfate (PDAS). Plates were incubated at 25°C in the dark for 3 to 4 days. Fungal colonies emerging from plant tissue pieces that were morphologically similar to species of Botryosphaeriaceae (Sutton 1980; Phillips 2006) were transferred to PDA plates and incubated at 25 °C in the dark, with observation after 3, 7 and 15 days. To obtain single-spore isolates, pycnidia were induced on 2 % water agar (WA) with autoclaved pine needles as a substrate after 3-week incubation at 25 °C under a 12 h daily photoperiod with near-ultraviolet light (Slippers et al. 2004). A single conidium was cut from each isolate under a stereo microscope (Zeiss Stemi DV4; Carl Zeiss, Berlin, Germany) and placed in 250 µl of sterile water to produce a conidial suspension. A 20 µl aliquot was spread on PDAS and incubated at 25 °C in the dark for 24 h. A single-conidia isolate was recovered for an individual sample and transferred to a fresh PDA plate. One-hundred and twelve isolates were morphologically identified as *Lasiodiplodia* based on morphological characteristics typical of the genus, namely conidiomatal paraphyses, conidia that were initially hyaline and aseptate, but in time developed a single median septum, the wall became dark brown and melanin granules deposited longitudinally on the inner surface of the wall giving the conidia a striate appearance (Sutton 1980; Alves et al. 2008). Stock cultures were stored in PDA slants at 5 °C in the dark.

DNA isolation, PCR amplification and sequencing

Using a sterile 10 µl pipette tip, a small amount of aerial mycelium was scraped from the surface of a 7 day old culture on PDA at 25 °C and genomic DNA was extracted using the AxyPrep™ Multisource Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen Scientific Inc., Union City, USA) following the manufacturer's instructions. A portion of the translation elongation factor 1α (EF1-α) gene was sequenced for all the *Lasiodiplodia* isolates collected from vineyards. The internal transcribed spacer (ITS) region of rDNA was sequenced to confirm the identity of 32 representative isolates within EF1-α identified species. The ITS region was amplified using the primers ITS1 and ITS4 (White et al. 1990) as described by Slippers et al (2004) and EF1-α gene was amplified using the primers EF1-688F and EF1-1251R (Alves et al. 2008) as described by Phillips et al. (2005). Each 50 µl polymerase chain reaction (PCR) mixture included 21 µl of PCR-grade water, 1 µl of DNA template, 1.5 µM of each primer, and 1 µl of

PCR Master Mix (2X) (0.05 u μl^{-1} de *Taq* DNA polimerase, reaction buffer, 4 mM MgCl_2 , 0.4 mM of each dNTP; Thermo Scientific, Waltham, USA). PCR reactions were carried out in a thermal cycler (Biocycler MJ 96; Applied Biosystems, Foster City, USA). The PCR amplification products were separated by electrophoresis in 1.5 % agarose gels in 1.0 \times Tris-acetate acid EDTA (TAE) buffer and were photographed under UV light after staining with ethidium bromide (0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) for 1 min. The PCR amplification products were separated by electrophoresis in 1.5% agarose gels in 1.0 \times Tris-acetate acid EDTA (TAE) buffer and were photographed under UV light after staining with ethidium bromide (0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) for 1 min. PCR products were purified using the AxyPrep™ PCR Cleanup Kit (Axygen) following the manufacturer's instructions. ITS and EF1- α regions were sequenced in both directions using an ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) at the Sequencing Platform LABCEN/CCB in the Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Brazil).

Phylogenetic analyses

Sequences were aligned with ClustalX v. 1.83 (Thompson et al. 1997), using the following parameters: pairwise alignment parameters (gap opening = 10, gap extension = 0.1) and multiple alignment parameters (gap opening = 10, gap extension = 0.2, transition weight = 0.5, delay divergent sequences = 25 %). Alignments were checked and manual adjustments were made where necessary. Phylogenetic information contained in indels (gaps) was incorporated into the phylogenetic analyses using simple indel coding as implemented by GapCoder (Young and Healy 2003). Sequences of *Lasiodiplodia* type strains obtained from GenBank were included in the analyses (Table 1). *Diplodia seriata* De Not. (CBS 112555) and *D. mutila* Fr. (CBS 112553) were used as outgroup.

Phylogenetic analyses were performed using PAUP v. 4.0b10 (Swofford 2003) for maximum-parsimony and MrBayes v. 3.0b4 (Ronquist and Huelsenbeck 2003) for Bayesian analyses. Maximum-parsimony analyses were performed using the heuristic search option with 1000 random taxa addition and tree bisection and reconnection (TBR) as the branch-swapping algorithm. All characters were unordered and of equal weight and gaps were treated as missing data. Branches of zero length were collapsed and all multiple, equally parsimonious trees were saved. The robustness of the most parsimonious trees was evaluated from 1000 bootstrap replications (Hillis and Bull 1993). Other measures used were consistency index (CI), retention index (RI) and homoplasy index (HI). In the Bayesian

analysis, the full data set were run twice for 10^6 generations. Trees were sampled every 1000th generation for a total of 10 000 trees. The first 1 000 trees were discarded as the burn-in phase of each analysis. Posterior probabilities (Rannala and Yang 1996) were determined from a majority-rule consensus tree generated with the remaining 9 000 trees. This analysis was repeated four times starting from different random trees to ensure trees from the same tree space were sampled during each analysis

Phylogenetic trees were viewed with Treeview (Page 1996). Sequences generated in this study were deposited in GenBank (Table 1) and the alignment in TreeBase (S14682). Representative isolates of different *Lasiodiplodia* species obtained in this study were deposited in the Culture Collection of Phytopathogenic Fungi “Prof. Maria Menezes” (CMM) at the Universidade Federal Rural de Pernambuco (Recife, Brazil).

Morphology and cultural characteristics

The 32 *Lasiodiplodia* isolates that were identified in the phylogenetic analysis using the combined data set were used to study colony morphology and conidial characteristics. The color and aerial hyphal growth from isolates were recorded during 15 days of growth on 2 % malt extract agar (MEA) (Acumedia) at 25 °C in the dark. Colony colors were recorded as per Rayner (1970). Characteristics of conidial morphology were observed after placing cultures on 2 % WA containing autoclaved pine needles and incubation under near-ultraviolet light, as previously described. Conidia and other structures were mounted in 100 % lactic acid and digital images recorded with a Leica DFC320 camera on a Leica DMR HC microscope fitted with Nomarski differential interference contrast optics (Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Cambridge, UK). The length and width of 50 conidia per isolate were measured with the Leica IM500 measurement module. Mean and standard errors of the conidial measurements, including mean length to width ratio (L/W) of the conidial measurements were calculated. Conidial color, shape, and presence or absence of septa was also recorded.

Isolates were also used to determine the effect of temperature on colony growth of different species. A 3-mm-diameter mycelial plug from the growing margin of a 3-day-old colony was placed in the center of a 90-mm-diameter 2 % MEA plate, and four replicates of each isolate were incubated at temperatures ranging from 10 °C to 40 °C in 5 °C intervals in the dark. After a 2-days incubation period, the colony diameter (mm) was measured in two perpendicular directions. The experiment was done twice. Colony diameters were plotted

against temperature and a curve was fitted by a cubic polynomial regression ($y=a+bx+cx^2+dx^3$). Optimal temperature was estimated from the regression equation and numeric summary with TableCurve™ 2D v. 5.01 (SYSTAT Software Inc., Chicago, USA). Optimum temperature was defined as the temperature that produced the maximum mycelial growth. The colony diameter data at 30 °C were used to calculate the mycelial growth rate (mm/day). One-way analyses of variance (ANOVA) were conducted with data obtained from optimum temperature and mycelial growth rate experiments, and means were compared by Fisher's least significant difference (LSD) test at the 5 % significance level using STATISTIX v. 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, USA).

Distribution and diversity of *Lasiodiplodia* species

Based on the number of isolates of each *Lasiodiplodia* species recorded, it was calculated the relative frequency of each species in relation to overall number of isolates and to the total number of isolates within each table grape population (Zak and Willig 2004). The diversity of *Lasiodiplodia* species was estimated in terms of species richness (number of species in the sample) and evenness (dominance of species in the sample) by the Shannon-Wiener's index $H' = -\sum_j (p_j \ln p_j)$, $j = 1 \dots N_p$, where N_p is the number of species identified among these isolates, and p_j is the proportion of individuals in the j^{th} species. The H' values increases with the number of species in a sample or reduces as one or a few species domain in the sample (Shannon and Weaver 1949). To quantify the degree of overlap between the *Lasiodiplodia* species in the table grape populations, a measure of the similarity between pairs of samples was calculated by the Jaccard's index $JI = a / (a+b+c)$, where a represents the number of species occurring in both samples, b represents the number of species restricted to sample 1, and c represents the number of species restricted to sample 2. The JI values ranges from 0 (no species shared) 1 (all species shared) (Kumar and Hyde 2004).

Pathogenicity and virulence on detached green shoots

Detached green shoots of cultivar Isabel were used to investigate the pathogenicity and virulence of the eight *Lasiodiplodia* species found on grapevines in San Francisco Valley. The isolates were the same used in the morphological characterization. The soft green shoots from unsprayed plants were cut in a commercial vineyard in São Vicente Férrer (Pernambuco), from which Botryosphaeriaceae species were not detected following repeated sampling and

isolation. The shoots were immediately placed into large plastic containers filled with sterile water, with the shoots placed over a plastic grid. The plastic containers were partially sealed with plastic bags and transported to Universidade Federal Rural de Pernambuco. The cut ends were dipped in wax and in the centre of each shoot (30 cm long) a superficial wound (~4-mm length, 2-mm deep) was made using a sterilized scalpel. It was inoculated with a mycelial plug (4 mm in diameter) removed from the margin of a 5-day-old PDA culture of each isolate. Non-colonized PDA agar plugs were used as negative controls. The inoculated area was wrapped with Parafilm (Pechiney Co., Chicago, USA) to prevent rapid dehydration. Inoculated shoots were placed in large plastic containers, as described above, and incubated at 25 °C and 12-h photoperiod in a growth chamber. After 10 days, the Parafilm was removed, the shoots were sliced through lengthwise and the internal lesions visually observed. The isolates were considered pathogenic when the lesioned area advanced beyond the 4-mm diameter inoculated area. The virulence of the isolates was evaluated by measurement of the lesion lengths with a digital calliper (Mitutoyo Co., Kanagawa, Japan). The experiment was arranged in a completely randomized design with ten replicates per treatment (isolate) and one shoot per replicate. The experiment was conducted twice. Differences in virulence caused by *Lasiodiplodia* species were determined by one-way ANOVA and means were compared by LSD test at the 5 % significance level using STATISTIX.

Results

DNA sequencing and phylogenetic analyses

A total of 112 isolates of *Lasiodiplodia* spp. were obtained from table grape plants. All the isolates were identified based on phylogenetic analysis of the partial translation elongation factor 1 α (EF1- α) gene. To confirm the identity of the isolates, the internal transcribed spacer (ITS) sequence was obtained for 32 isolates representing each putative species. The combined ITS and EF1- α data set consists of 83 taxa, including two outgroup. The alignment contained 746 characters, of which 579 were constant while 33 were variable and parsimony uninformative. A heuristic search of the remaining 134 parsimony-informative characters generated 8 equally parsimonious trees with (TI=284; CI=0.739; RI=0.900; HI=0.261). Maximum-parsimony and Bayesian inference produced nearly identical topologies (Bayesian tree not shown). Sequences of ex-type isolates of *Lasiodiplodia* species from GenBank were included in the analysis together with isolates obtained in this study (Table 1). The combined

dataset resulted in 25 well supported clades of which 23 clades corresponded to previously described *Lasiodiplodia* species. Six isolates clustered with clade containing *L. jatrophiicola* (CMM 3610). The second group with five isolates clustered with *L. theobromae*. Four isolates clustered with *L. euphorbicola* (CMM 3651, CMM 3609 and CMM 3652) and *L. marypalme* (CMM 2173, CMM 2275 and CMM 2272). In clades *L. crassispora* and *L. brasiliense* (CMM 4011, CMM 4015) four isolates were clustered in each. Three isolates clustered with *L. egyptiacea* and other three isolates clustered with *L. pseudotheobromae*. In clade *L. hormozganensis* three isolates clustered (Fig. 2).

Morphology and cultural characteristics

The 32 *Lasiodiplodia* isolates [*L. brasiliense* (4), *L. crassispora* (4), *L. egyptiacea* (3), *L. euphorbicola* (4), *L. hormozganensis* (3), *L. jatrophiicola* (6), *L. pseudotheobromae* (3) and *L. theobromae* (5)] that were identified based in the phylogenetic analysis using the combined data were further characterized by colony morphology and conidial characteristics. All isolates produced anamorph structures on the pine needles on WA within 2–4 wk. No teleomorph structures were observed during this study. All species showed morphological features typical of the genus, namely slowly maturing conidia with thick walls and longitudinal striations (Punithalingam 1976, 1980). All isolates grew rapidly on PDA, covering the entire surface of the Petri dishes within 3 days. The aerial mycelium was initially white, turning dark greenish-grey or greyish after 4–5 days at 25 °C in the dark. The species of *Lasiodiplodia* found in this study show differences in conidial size. The conidial dimensions found in *L. euphorbicola* and *L. jatrophiicola* are outside of the range previously described for these species in the literature (Table 2). All species of *Lasiodiplodia* used in this study grew at 10 °C. There were significant differences ($P \leq 0.05$) in growth rate among the *Lasiodiplodia* species and differences in the optimum temperature for mycelial growth. The optimum temperature for growth of *L. egyptiacea* (29.9 °C) was significantly lower than that of *L. euphorbicola* (32.6 °C). The other species (*L. brasiliense*, *L. crassispora*, *L. hormozganensis*, *L. jatrophiicola*, *L. pseudotheobromae* and *L. theobromae*) presented intermediate values of optimum temperature for growth, without differing of observed extremes. The mycelial growth rate of *L. jatrophiicola* (43.5 mm/day) was significantly higher than *L. brasiliense*, *L. euphorbicola* and *L. hormozganensis*, which varied from 36.9 to 39.8 mm/day. The other species (*L. crassispora*, *L. egyptiacea*, *L. pseudotheobromae* and *L.*

theobromae) presented intermediate values of mycelial growth rate, without differing of *L. jatrophicola*, *L. euphorbicola* and *L. hormozganensis* (Table 3).

Taxonomy

Lasiodiplodia euphorbicola A.R. Machado & O.L. Pereira. Fungal Divers (DOI 10.1007/s13225-013-0274-1)

= *Lasiodiplodia marypalme* M.S.B. Netto, M.W. Marques, A.J.L. Phillips & M.P.S. Câmara. Fungal Divers (DOI 10.1007/s13225-014-0279-4)

Placed as synonymy with *L. euphorbicola*, the species *L. marypalme* was described by Netto et al. (2014) causing stem-end rot of papaya in Northeastern Brazil. The authors described this species by multi-locus phylogeny using the EF1- α and ITS genes. Machado et al. (2014) early described the species *L. euphorbicola* using sequence data of EF1- α , β T and ITS genes. Since the molecular data of *L. euphorbicola* were not available in public database, Netto et al. (2014) described *L. marypalme* as a new species. We sequenced the EF1- α and ITS genes for some isolates first described as *L. marypalme* (including the ex-type) and included them in our analysis. Morphological characteristics are similar for both species, differing only in the size of conidia (Table 1). The phylogenetic tree generated showed that this isolate nested with the ex-type of *L. euphorbicola* in a well supported clade.

Distribution and diversity of *Lasiodiplodia* species

Lasiodiplodia theobromae was the predominant species isolated from table grape plants (46.4 %) followed by *L. brasiliense* (15.2 %), *L. jatrophicola* (11.6 %), *L. hormozganensis* (7.1 %), *L. crassispora* (7.1 %), *L. egyptiacae* (5.4 %), *L. euphorbicola* and *L. pseudotheobromae* (3.6 %). The distribution of *Lasiodiplodia* species differed between the three table grape populations of São Francisco Valley. Only in the population of Casa Nova all *Lasiodiplodia* species were found. In Petrolina population the only species that was not present was *L. crassispora*. *Lasiodiplodia jatrophicola*, *L. hormozganensis* and *L. theobromae* were found in all populations. *Lasiodiplodia theobromae* was the predominant species in all populations. *Lasiodiplodia brasiliense*, *L. egyptiacae*, *L. euphorbicola* and *L. pseudotheobromae* were found in populations of Casa Nova and Petrolina. *Lasiodiplodia crassispora* was found only in population of Casa Nova, where it was the second most prevalent species (Fig. 1).

A comparison of the Shannon-Wiener's diversity index (H') showed that populations of Casa Nova and Petrolina are similar in diversity of *Lasiodiplodia* species causing dieback in table grapes ($H' = 1.55$ and $H' = 1.56$, respectively), while the population of Juazeiro had the lowest diversity ($H' = 0.90$) (Fig. 1).

The comparison between the *Lasiodiplodia* species recovered from different table grape populations was computed using a Jaccard's index for possible pairs of populations. The highest overlap ($JI = 0.89$) was observed for the *Lasiodiplodia* species from populations of Casa Nova and Petrolina, followed by populations of Juazeiro and Petrolina ($JI = 0.43$). The lowest value of similarity ($JI = 0.38$) was observed between populations of Casa Nova and Juazeiro.

Pathogenicity and virulence in detached green shoots

All isolates of *Lasiodiplodia* were pathogenic to detached green shoots of table grape, resulting in visible lesions 10 days after inoculation. The symptoms observed both on the surface and internally were dark brown necrotic lesions which extended upward and downward from the point of inoculation. There were significant differences ($P \leq 0.05$) in internal lesion lengths produced by the different *Lasiodiplodia* species. The longest lesions were produced by *L. brasiliense* (253.0 mm), wherein was most virulent, followed by *L. theobromae* (197.6 mm). The small lesions were produced by *L. egyptiacae* and *L. euphorbicola* (<20 mm), than did not differ significantly from each other and were considered the less virulent species. The others species (*L. crassispora*, *L. hormozganensis*, *L. jatrophicola* and *L. pseudotheobromae*) presented intermediate virulence, with lesions varying from 109.3 mm to 148.1 mm (Fig. 3).

Discussion

This study represents the first survey of species of *Lasiodiplodia* associated with table grape dieback in the main Brazilian exporting region with an extensive collection of isolates, and integrating morphology, pathology and molecular data. Eight species of *Lasiodiplodia* were identified as causing table grape dieback: *L. brasiliense*, *L. crassispora*, *L. egyptiacae*, *L. euphorbicola* (*L. marypalme*), *L. hormozganensis*, *L. jatrophicola*, *L. pseudotheobromae*, and *L. theobromae*. Except for *L. crassispora*, *L. pseudotheobromae*, and *L. theobromae*, all the other species are reported for the first time on grapevine worldwide.

In this work, *L. theobromae* was the most frequently isolated species associated with table grape dieback (46.4 %), and also the most widespread species in vineyards of São Francisco Valley, Northeastern Brazil. Similar results were obtained when the frequency of *Lasiodiplodia* species associated with dieback and stem-end rot of mango (Marques et al. 2013) and stem-end rot of papaya (Netto et al. 2014) was investigated in the semi-arid region of Northeastern Brazil. This species is considered a pantropical pathogen occurring in a wide range of hosts (Punithalingam 1980; Burgess et al. 2006; Farr and Rossman 2014). In Brazil, *L. theobromae*, *L. crassispora*, *L. parva* and *L. pseudotheobromae* had been reported in grapevine (Gava et al. 2010; Correia et al. 2013). In this work, five more species were found in this host.

Worldwide, several species have been described in the *L. theobromae* complex, mostly due to the increase in the application of DNA sequence data, but also because of the increased sampling of relatively unexplored areas, including Venezuela (Burgess et al. 2006), Australia (Pavlic et al. 2008), Iran (Abdollahzadeh et al. 2010), Egypt (Ismail et al. 2012), Brazil (Marques et al. 2013; Machado et al. 2014; Netto et al. 2014), Oman and United Arab Emirates (Al-Sadi et al. 2013).

Lasiodiplodia hormozganensis was described in Iran associated with mango and *Olea* sp. (Abdollahzadeh et al. 2010), in Australia associated with *Adansonia digitata* L. (Sakalidis et al. 2011), in Brazil associated with mango (Marques et al. 2013) and papaya (Netto et al. 2014) and in Oman associated with *Citrus*, date palm (*Phoenix dactylifera* L.) and mango (Al-Sadi et al. 2013). This work represents the first report of this species causing table grape dieback worldwide. In this study, *L. hormozganensis* presented intermediate virulence in detached green shoots of table grape. This result differs from that found by Sakalidis et al. (2011), Marques et al. (2013) and Netto et al. (2014) where *L. hormozganensis* isolates produced the largest lesions in mango branches, mango fruits and papaya fruits, respectively.

Another species associated with table grape dieback in Brazil was *L. pseudotheobromae*. This species was described from *Acacia*, *Citrus*, *Coffea*, *Gmelina* and *Rosa* species, and differs from *L. theobromae* in its bigger conidia that are more ellipsoid and do not taper as strongly towards the base (Alves et al. 2008). Worldwide, *L. pseudotheobromae* has been reported on numerous hosts (Alves et al. 2008, Phillips et al. 2008, Begoude et al. 2010, Perez et al. 2010, Wright and Harmon 2010, Zhao et al. 2010, Abdollahzadeh et al., 2010, Sakalidis et al. 2011, Ismail et al. 2012), but in Brazil it has been reported only on grapevine (Correia et al. 2013), mango (Marques et al. 2013), physic nut (Machado et al. 2014) and papaya (Netto et al. 2014). This shows an increase in the spread of

the fungus, suggesting that *L. pseudotheobromae*, like *L. theobromae*, has a worldwide distribution and a wide host range. Regarding the pathogenicity, *L. pseudotheobromae* was the most virulent species in mango fruits in Australia (Sakalidis et al. 2011), in mango seedlings in Egypt (Ismail et al. 2012) and in young trees of *Terminalia catappa* L. in Cameroon (Begoude et al. 2011). However, in the present work, *L. pseudotheobromae* had relatively low level of virulence in detached green shoots of table grape, similar to that observed when this species was inoculated in mango fruits (Marques et al. 2013) and papaya fruits (Netto et al. 2014) in Brazil. The divergent results indicate that there is a great variability in virulence within this species and that the Brazilian isolates might represent a population with low virulence.

Lasiodiplodia crassispora was described in Australia causing canker in *Santalum album* L. (Burgess et al. 2006). In terms of morphology, *L. crassispora* resembles *L. pseudotheobromae* and the only feature that distinguishes the two species is that in *L. crassispora* the pseudoparaphyses are mostly septate, while in *L. pseudotheobromae* they are mostly aseptate (Phillips et al. 2013). In 2010 it was described in *Eucalyptus urophylla* L. (Perez et al. 2010) and grapevine (Úrbez-Torres et al 2010; van Niekerk et al. 2010). In 2013, *L. crassispora* was described in Brazil associated with trunk disease in grapevine (Correia et al. 2013), and dieback and stem-end rot of mango (Marques et al. 2013). In this study, *L. crassispora* showed low prevalence and low virulence.

Other species found in this work associated with table grape dieback was *L. egyptiaca*. This species was described first on mango in Egypt (Ismail et al. 2012), and recently was reported in Brazil in the same host (Marques et al, 2013) and physic nut (Machado et al, 2014). This species is morphologically and phylogenetically closely related to other previously reported species previously associated with table grape dieback in Brazil, *L. pseudotheobromae* and *L. parva* (Correia et al. 2013), but it can be distinguished based on the dimensions of conidia and paraphyses. In this study, *L. egyptiaca* showed low levels of virulence in detached green shoots of table grape compared to other *Lasiodiplodia* species. Similar results were obtained in mango fruits (Ismail et al. 2012; Marques et al. 2013) and in physic nut plants (Machado et al., 2014). More sampling is necessary to understand the host range, distribution and variability of this species. This work represents the first report of this species causing dieback in table grape worldwide.

Lasiodiplodia jatrophicola and *L. euphorbicola* were recently described in Brasil associated with physic nut. *L. jatrophicola* is phylogenetically close but clearly separate from *L. iraniensis* and the new species has larger conidia and smaller paraphyses. *L. euphorbicola*

is phylogenetically close but clearly separate from *L. parva*. The two taxa have several similar morphological characteristics, but the proposed new species has smaller paraphyses (Machado et al. 2014). In this work, *L. jatrophiicola* was the third most prevalent species with moderate virulence, whereas *L. euphorbicola* showed low levels of virulence and low prevalence. Machado et al. (2014) found only one isolate of *L. jatrophiicola* and three of *L. euphorbicola* associated with physic nut. This work is the first report of these species causing table grape dieback worldwide, identifying one second host of these species, which may indicate that these species are distributed in the country. The species were identified in regions distant from one another and under different climatic conditions.

Other species described in Brazil in 2014, but associated with stem-end rot of papaya, were *L. brasiliense* and *L. marypalme*. Phylogenetically *L. brasiliense* is closely related to *L. viticola*, but conidia of *L. brasiliense*, $22.7\text{--}29.2 \times 11.7\text{--}17.0 \mu\text{m}$, are longer and wider than those of *L. viticola* $18.2\text{--}20.5 \times 8.8\text{--}10.1 \mu\text{m}$. *L. brasiliense* differs from its closest phylogenetic neighbor, *L. viticola*, by unique fixed alleles in one loci. In this work *L. brasiliense* was the most virulent species in detached green shoots from table grape and second species most prevalent in São Francisco Valley. Netto et al. (2014) it also showed that *L. brasiliense* was the second prevalent species associated with stem-end rot of papaya in São Francisco Valley, but the virulence of this species did not differ significantly from *L. marypalme*, *L. pseudotheobromae* and *L. theobromae*. This is the first world record of *L. brasiliense* causing dieback in grapevine.

Phylogenetically, *L. marypalme* is closely related to *L. pseudotheobromae* and *L. citricola*, but conidia of *L. citricola*, $22.5\text{--}26.6 \times 13.6\text{--}17.2 \mu\text{m}$, and *L. pseudotheobromae*, $23.5\text{--}32 \times 14\text{--}18$, are longer and wider than those of *L. marypalme*, $18.0\text{--}24.4 \times 9.8\text{--}15.3 \mu\text{m}$. *L. marypalme* differs from its closest phylogenetic neighbor, *L. pseudotheobromae* and *L. citricola*, by unique fixed alleles in two loci (Netto et al. 2014). In this study, we observed that *L. marypalme* is synonymy of *L. euphorbicola*. The phylogenetic tree generated showed that this isolate nested within the former type of *L. euphorbicola* in a well-supported clade. Therefore, the 24 species reported *Lasiodiplodia* (Phillips et al. 2013; Machado et al. 2014; Netto et al. 2014), 23 may be considered valid species.

Regarding cultural characteristics, the optimum temperature for mycelial growth for *Lasiodiplodia* species from table grape varied between $29.9 \text{ }^\circ\text{C}$ and $31.2 \text{ }^\circ\text{C}$. In addition, all the species in this study grew at $10 \text{ }^\circ\text{C}$. This growth at low temperature corroborates the work of Abdollahzadeh et al. (2010), Marques et al. (2013) and Netto et al (2014) and is in contrast to other studies that show only *L. pseudotheobromae* as capable of growing at this

temperature (Alves et al. 2008; Ismail et al. 2012). As can be observed, cultural characteristics may vary widely among isolates of the same species and therefore are of limited value in the determination of species.

Regarding the distribution of species in the sampled populations, a greater diversity of *Lasiodiplodia* species was observed in populations of Petrolina and Casa Nova, while population of Juazeiro presented lower species diversity. *Lasiodiplodia theobromae* was the predominant species in all populations and it was the species that had the largest number of isolates (52). *Lasiodiplodia crassispora* was found only in population of Casa Nova, where was the second most prevalent species.

This paper reports eight species of the genus *Lasiodiplodia* associated with table grape dieback in São Francisco Valley, the main Brazilian exporting region. *L. theobromae*, despite being the most frequent species, is not the only etiologic agent and neither the most virulent. All the species found in in São Francisco Valley have potential to cause table grape dieback, but *L. brasiliense* was the most virulent species. Information about this species is scarce due to its recent description (Netto et al. 2014). Studies are needed on the epidemiology and impact on table grape production together with information referring to ecology, distribution, host range and fungicide sensitivity of all species of *Lasiodiplodia* found in this study. The results of this study will certainly be crucial to a better formulation of dieback control strategies and genetic improvement programs for the table grape.

Acknowledgments This work was financed by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE APQ 137-5.01/12, IBPG-0674-5.01/09). M. P. S. Câmara, and S. J. Michereff also acknowledge the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq research fellowship. A. J. L. Phillips thanks Fundação para a Ciência e a Tecnologia (Portugal) for financial support through grant PEst-OE/BIA/UI0457/2011.

References

- Abdollahzadeh J, Javadi A, Mohammadi EG, Zare R, Phillips AJL (2010) Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia* 25:1–10
- Abreo E, Martinez S, Bettucci L, Lupo S (2013) Characterization of Botryosphaeriaceae species associated with grapevines in Uruguay. *Australas Plant Pathol* 42:241-249

- Al-Sadi AM, Al-Wehaibi AN, Al-Shariqi RM, Al-Hammadi MS, Al-Hosni IA, Al-Mahmooli IH, Al-Ghaithi AG (2013) Population genetic analysis reveals diversity in *Lasiodiplodia* species infecting date palm, *Citrus*, and mango in Oman and the UAE. *Plant Dis* 97:1363–1369
- Alves A, Crous PW, Correia A, Phillips AJL (2008) Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Divers* 28:1–13
- Amponsah NT, Jones EE, Ridgway HJ, Jaspers MV (2011) Identification, potential inoculum sources and pathogenicity of botryosphaeriaceous species associated with grapevine dieback disease in New Zealand. *Eur J Plant Pathol* 131:467–482
- Begoude BAD, Slippers B, Wingfield MJ, Roux J (2010) Botryosphaeriaceae associated with *Terminalia catappa* in Cameroon, South Africa and Madagascar. *Mycol Prog* 9:101–123
- Begoude BAD, Slippers B, Wingfield MJ, Roux J (2011) The pathogenic potential of endophytic Botryosphaeriaceous fungi on *Terminalia* species in Cameroon. *Forest Pathol* 41:281–292
- Bertsch C, Ramírez-Suero M, Magnin-Robert M, Larignon P, Chong J, Abou-Mansour E, Spagnolo A, Clément C, Fontaine F (2013) Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathol* 62:243–265
- Billones-Baaijens R, Ridgway HJ, Jones EE, Jaspers M (2013) Inoculum sources of Botryosphaeriaceae species in New Zealand grapevine nurseries. *Eur J Plant Pathol* 135:159–174
- Burgess TI, Barber PA, Mohali S, Pegg G, de Beer W, Wingfield MJ (2006) Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia* 98:423–435
- Camargo UA, Protas JFS, Mello LMR (2008) Grape growing and processing in Brazil. *Acta Hort* 785:51–57
- Correia KC, Câmara MPS, Barbosa MAG, Sales R Jr, Agustí-Brisach C, Gramaje D, García-Jiménez J, Abad-Campos P, Armengol J, Michereff SJ (2013) Fungal trunk pathogens associated with table grape decline in Northeastern Brazil. *Phytopathol Mediterr* 52:380–387
- Costa VSO, Michereff SJ, Martins RB, Gava CAT, Mizubuti ESG, Camara MPS (2010) Species of Botryosphaeriaceae associated on mango in Brazil. *Eur J Plant Pathol* 127:509–519
- FAO (2014) FAOSTAT. <http://faostat3.fao.org/home/index.html>. Accessed 18 Jan 2014

- Farr DF, Rossman AY (2014) Fungal database: Fungus-host distributions. <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/fungushost/fungushost.cfm>. Accessed 18 Jan 2014
- Freire FCO, Cardoso JE, Viana FMP (2003) Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 687 p
- Garrido LR, Gava R, Urben AF, Ritschel PS (2011) Podridão-descendente da videira no Brasil. *Tropical Plant Pathology* 36:33–34
- Gava R, Menegotto M, Urben AF, Garrido LR (2010) Identification of Botryosphaeriaceae anamorphs associated to grapevines in Brazil. *Phytopathol Mediterr* 49:113
- Hillis DM, Bull JJ (1993) An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biol* 42:182–192
- Ismail AM, Cirvilleri G, Polizzi G, Crous PW, Groenewald JZ, Lombard L (2012) *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica*) in Egypt. *Australas Plant Pathol* 41:649–660
- Kumar DSS, Hyde KD (2004) Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. *Fungal Divers* 17:69–90
- Larignon P (2012) Maladies cryptogamiques du bois de la vigne: symptomatologie et agents pathogènes. Institut Français de la Vigne et du Vin, Grau du Roi dans le Gard, 74 p
- Larignon P, Fulchic R, Cere L, Dubos B (2001) Observation on black dead arm in French vineyards. *Phytopathol Mediterr* 40:336–342
- Lazzarotto JJ, Fioravanço JC (2013) Tendências e sazonalidades nas exportações e importações brasileiras de uva de mesa. *Inform Econ* 43:43–58
- Liu JK, Phookamsak R, Doilom M, Wikee S, Li YM, Ariyawansa H, Boonmee S, Putarak Chomnunti P, Dai DQ, Bhat JD, Romero AI, Zhuang WY, Monkai J, Jones EBG, Chukeatirote E, Thida Win Ko Ko, TW, Zhao YC, Wang Y, D. Hyde, KD (2012) Towards a natural classification of Botryosphaeriales. *Fungal Divers* 57:149–210
- Machado AR, Pinho DB, Pereira OL (2014) Phylogeny, identification and pathogenicity of the Botryosphaeriaceae associated with collar and root rot of the biofuel plant *Jatropha curcas* in Brazil, with a description of new species of *Lasiodiplodia*. *Fungal Divers* Accepted for publication. <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13225-013-0274-1/fulltext.html>
- Marques MW, Lima NB, Morais Junior MA, Barbosa MAG, Souza BO, Michereff SJ, Phillips AJL, Câmara MPS (2013) Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. *Fungal Divers* 61:181–193

- Muniz CR, Freire FCO, Viana FMP, Cardoso JE, Correia D, Jalink H, Kema GHJ, Silva GF (2012) Polyclonal antibody-based ELISA in combination with specific PCR amplification of internal transcribed spacer regions for the detection and quantitation of *Lasiodiplodia theobromae*, causal agent of gummosis in cashew nut plants. *Ann Appl Biol* 160:217–224
- Netto MSB, Assunção IP, Lima GSA, Marques MW, Lima WG, Monteiro JHA, Balbino VQ, Michereff SJ, Phillips AJL, Câmara MPS (2014) Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. *Fungal Divers* Accepted for publication. <http://link.springer.com/article/10.1007/s13225-014-0279-4/fulltext.html>
- Page RDM (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12:357–358
- Pavlic D, Wingfield MJ, Barber P, Slippers B, Harder GES, Burgess TI (2008) Seven new species of the Botryosphaeriaceae from baobab and other native trees in Western Australia. *Mycologia* 100:851–866
- Pérez CA, Wingfield MJ, Slippers B, Altier NA, Blanchette RA (2010) Endophytic and canker-associated Botryosphaeriaceae occurring on non-native *Eucalyptus* and native Myrtaceae trees in Uruguay. *Fungal Divers* 41:53–69
- Phillips AJL (2002) *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopathol Mediterr* 41:3–18
- Phillips AJL (2006) The Botryosphaeria site. http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site. Accessed 08 April 2012
- Phillips AJL, Alves A, Correia A, Luque J (2005) Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. *Mycologia* 97:513–529
- Phillips AJL, Alves A, Pennycook SR, Johnston PR, Ramaley A, Akulov A, Crous PW (2008) Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the Botryosphaeriaceae. *Persoonia* 21:29–55
- Phillips AJL, Alves A, Abdollahzadeh J, Slippers B, Wingfield MJ, Groenewald JZ., Crous PW (2013) The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. *Stud Mycol* 76:51–167
- Pitt WM, Huang R, Steel CC, Savocchia S (2013) Pathogenicity and epidemiology of Botryosphaeriaceae species isolated from grapevines in Australia. *Australas Plant Pathol* 42: 573–582
- Possingham JV (2008) Developments in the production of table grapes, wine and raisins in the tropical regions of the world. *Acta Hort* 785: 45–50

- Punithalingam E (1976) *Botryodiplodia theobromae*. CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria, No. 519. Commonwealth Mycological Institute, Kew, 2 p
- Punithalingam E (1980) Plant diseases attributed to *Botryodiplodia theobromae* Pat. Cramer, Vaduz, 123 p
- Qiu Y, Steel CC, Ash GJ, Savocchia S (2011) Survey of Botryosphaeriaceae associated with grapevine decline in the Hunter Valley and Mudgee grape growing regions of New South Wales. *Australas Plant Pathol* 40:1–11
- Rannala B, Yang Z (1996) Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *J Mol Evol* 43:304–311
- Ribeiro IJA, Paradela Filho O, Terra MM, Pires EJP (1992) Uma nova doença da videira (*Vitis vinifera*) causada por *Botryodiplodia theobromae*. *Summa Phytopathol* 18:30
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572–1574
- Sakalidis ML, Ray JD, Lanoiselet V, Hardy GESJ, Burgess TI (2011) Pathogenic Botryosphaeriaceae associated with *Mangifera indica* in the Kimberley Region of Western Australia. *Eur J Plant Pathol* 130:379–391
- Shannon CE, Weaver W (1949) The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana, 144 p
- Slippers B, Wingfield MJ (2007) Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biol Rev* 21:90–106
- Slippers B, Crous PW, Denman S, Coutinho TA, Wingfield BD, Wingfield MJ (2004) Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia* 96: 83–101
- Sutton BC (1980) The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Commonwealth Mycological Institute, Kew, 696 p
- Swofford DL (2003) PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods) Version 4. Sinauer Associates, Sunderland
- Tavares SCCH (2002) Epidemiologia e manejo integrado de *Botryodiplodia theobromae* - situação atual no Brasil e no mundo. *Fitopatol Bras* 27:46–52
- Taylor JW, Hardy GES, Wood P, Burgess T (2005) Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* species concepts in fungi. *Australas Plant Pathol* 34:187–195
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25:4876–4882

- Urbéz-Torres JR (2011) The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines
Phytopathol Mediterr 50:5–45
- Urbéz-Torres JR, Battany M, Bettiga LJ, Gispert C, MCGourty G, Roncoroni J, Smith RJ, Verdegaal P, Gubler WD (2010) *Botryosphaeriaceae* species spore-trapping studies in California vineyards Plant Dis 94:717–724
- Urbéz-Torres JR, Leavitt GM, Guerrero JC, Guevara J, Gubler WD (2008) Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. Plant Dis 92:519–529
- Urbéz-Torres JR, Peduto F, Striegle RK, Urrea-Romer JEO, Rupe JC, Cartwright RD, Gubler WD (2012) Characterization of fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Arkansas and Missouri. Fungal Divers 52:169–189
- van Niekerk JM, Crous PW, Groenewald JZ, Fourie PH, Halleen F (2004) DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species on grapevines. Mycologia 96:781–798
- van Niekerk JM, Fourie PH, Halleen F, Crous P (2006) *Botryosphaeria* spp. as grapevines trunk disease pathogens. Phytopathol Mediterr 45:43-54
- van Niekerk JM, Calitz FJ, Halleen F, Fourie P (2010) Temporal spore dispersal patterns of grapevine trunk pathogens in South Africa. Eur J Plant Pathol 127:375–390
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR protocols, a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, pp 315–322
- Wikee S, Lombard L, Nakashima C, Motohashi K, Chukeatirote E, Cheewangkoon R, McKenzie EHC, Hyde KD, Crous PW (2013) A phylogenetic re-evaluation of Phyllosticta (Botryosphaeriales) Stud Mycol 76:1–29
- Wright AF, Harmon PF (2010) Identification of species in the Botryosphaeriaceae family causing stem blight on southern highbush blueberry in Florida. Plant Dis 94:966–971
- Yan J-Y, Xie Y, Zhang W, Wang Y, Liu J-K, Hyde KD, Seem RC, Zhang G-Z, Wang Z-Y, Yao S-W, Bai X-J, Dissanayake AJ, Peng Y-L, Li X (2013) Species of Botryosphaeriaceae involved in grapevine dieback in China. Fungal Divers 61:221–236
- Young ND, Healey J (2003) GapCoder automates the use of indel characters in phylogenetic analysis. BMC Bioinformatics 4:6, <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2105-4-6.pdf>

- Zak JC, Willig MR (2004) Fungal biodiversity patterns. In: Mueller GM, Bills GF, Foster MS (ed) Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods. Elsevier Academic, Amsterdam, pp 59–75
- Zhao JP, Lu Q, Liang J, Decock C, Zhang XY (2010) *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, a new record of pathogenic fungus from some subtropical and tropical trees in southern China. *Cryptogamie Mycol* 31:431–439

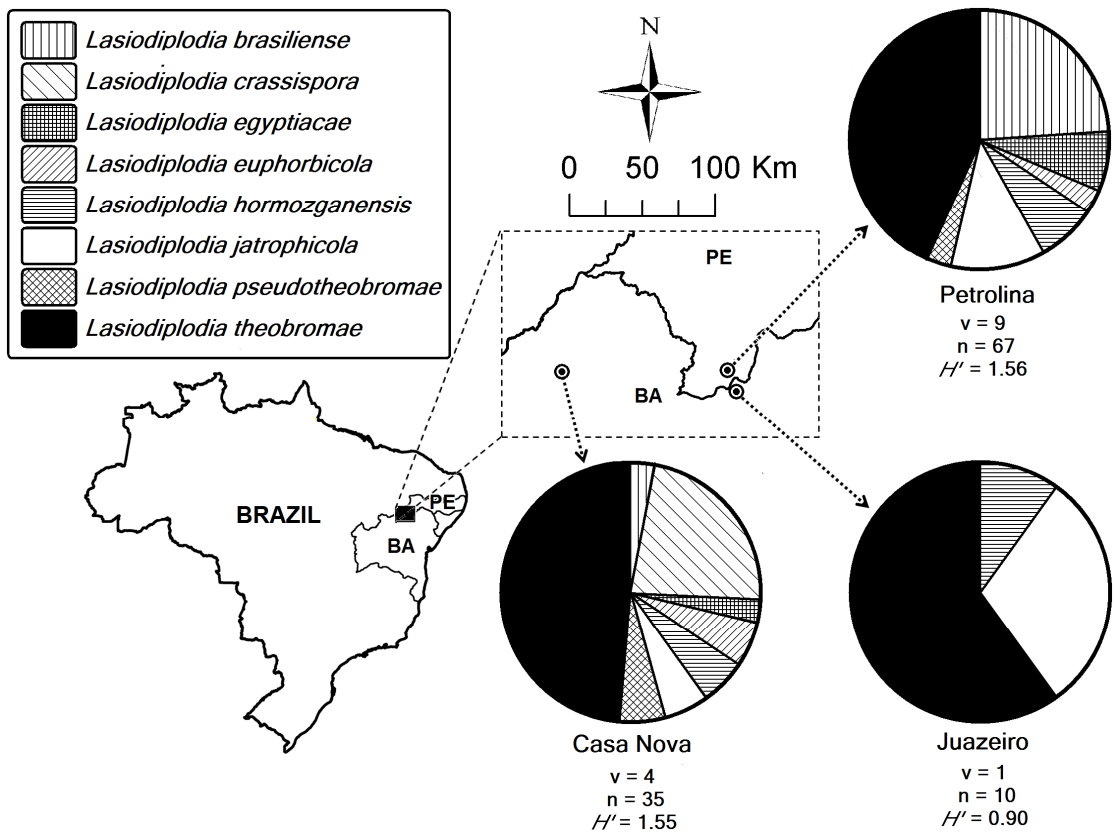


Fig. 1 Collection sites of *Lasiodiplodia* isolates associated with grapevine dieback in three different populations located in São Francisco Valley (Casa Nova, Juazeiro and Petrolina), Northeastern Brazil. Circles represent association frequency of each species with plants exhibiting symptoms of dieback in each population sampled, v is the number of vineyards sampled in each population, n is the number of isolates analyzed in each population, and H' is the Shannon-Wiener's diversity index

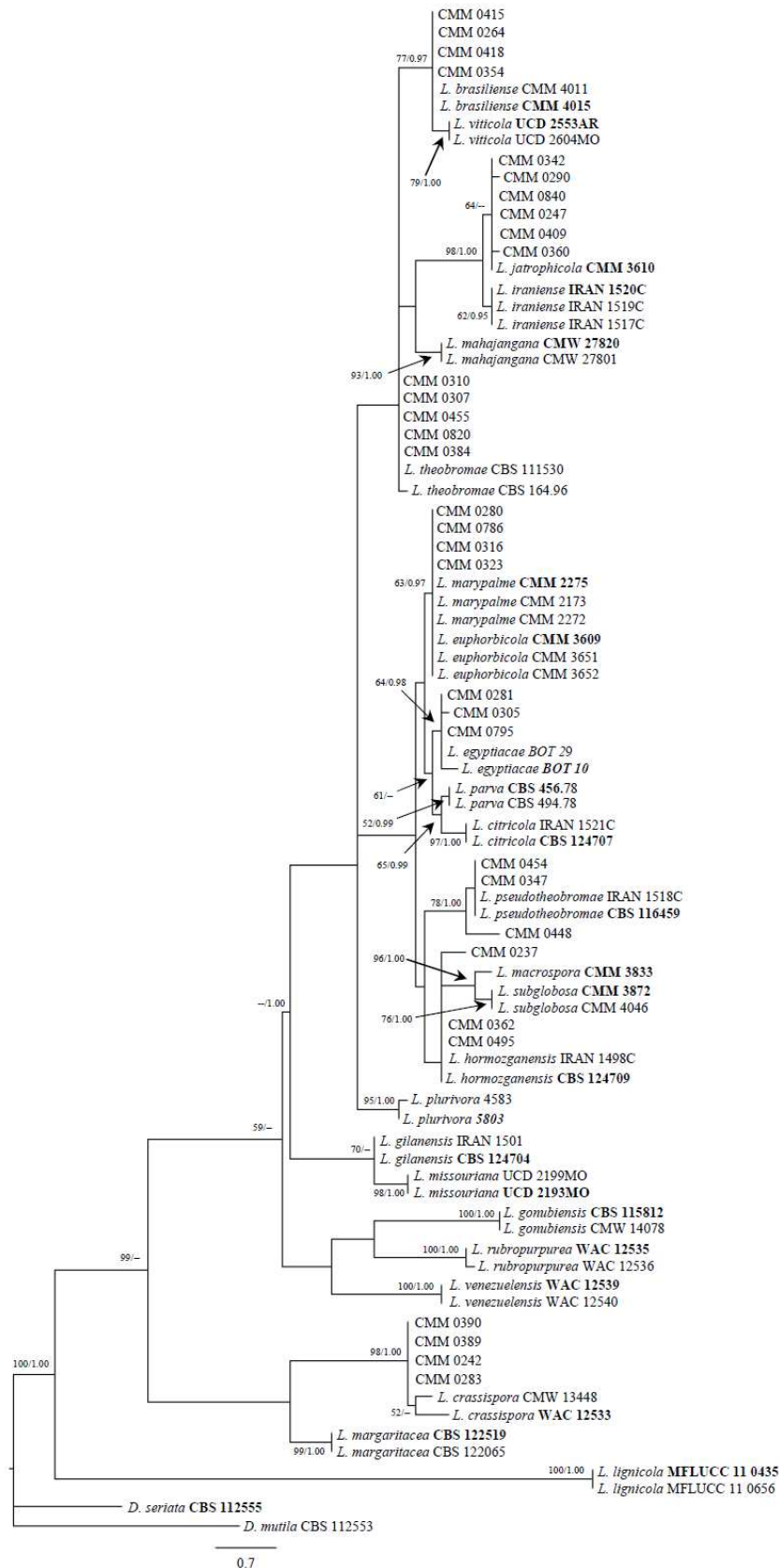


Fig. 2 One of 8 most parsimonious trees (TI=284; CI=0.739; RI=0.900; HI=0.261) obtained from combined ITS and EF1- α sequence data. Maximum parsimony bootstrap support values from 1000 replications and Bayesian posterior probability scores are shown at the nodes. Ex-type isolates are in **bold**

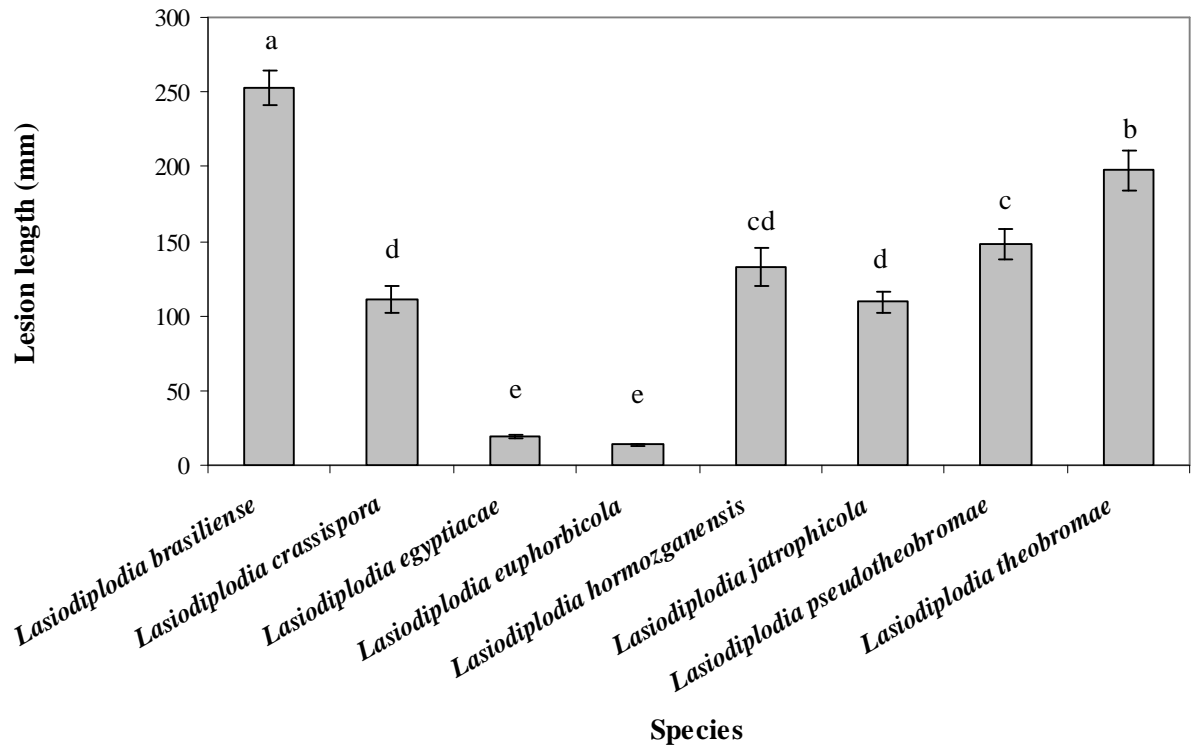


Fig. 3 Mean internal lesion lengths (mm) caused by eight *Lasiodiplodia* species associated with grapevine dieback in São Francisco Valley (Northeastern Brazil), 10 days after inoculation with mycelium colonized agar plugs onto wounded detached green shoots of Isabel cultivar. Bars above columns are the standard error of the mean. Columns with same letter do not differ significantly according to Fisher's LSD test ($P \leq 0.05$)

Table 1 Isolates of *Lasiodiplodia* species used in this study

Taxon	Culture Accession No. ^a	Host	Location	Collector	GenBank Accession No. ^b	
					ITS	EF1- α
<i>Diplodia mutila</i>	CBS 112553	<i>Vitis vinifera</i>	Portugal	A.J.L. Phillips	AY259093	AY573219
<i>D. seriata</i>	CBS 112555	<i>V. vinifera</i>	Portugal	A.J.L. Phillips	AY259093	AY573220
<i>Lasiodiplodia brasiliense</i>	CMM 4011	<i>Mangifera indica</i>	Brazil	M.W. Marques	JX464074	JX464037
<i>L. brasiliense</i>	CMM 0418	<i>V. vinifera</i>	Brazil	M.A. Silva	KJ417850	KJ417846
<i>L. brasiliense</i>	CMM 0354	<i>V. vinifera</i>	Brazil	M.A. Silva	KJ417849	KJ417845
<i>L. brasiliense</i>	CMM 0415	<i>V. vinifera</i>	Brazil	M.A. Silva	KJ417852	KJ417848
<i>L. brasiliense</i>	CMM 0264	<i>V. vinifera</i>	Brazil	M.A. Silva	KJ417851	KJ417847
<i>L. brasiliense</i>	CMM 4015	<i>M. indica</i>	Brazil	M.W. Marques	JX464063	JX464049
<i>L. citricola</i>	CBS 124707	<i>Citrus sp.</i>	Iran	J. Abdollahzadeh & A. Javadi	GU945354	GU945340
<i>L. citricola</i>	IRAN 1521C	<i>Citrus sp.</i>	Iran	A. Shekari	GU945353	GU945339
<i>L. crassispota</i>	CMW 13448	<i>Eucalyptus urophylla</i>	Venezuela	S. Mohali	DQ103552	DQ103559
<i>L. crassispota</i>	CMM 0390	<i>V. vinifera</i>	Brazil	M.A. Silva	KJ417881	KJ417856
<i>L. crassispota</i>	CMM 0389	<i>V. vinifera</i>	Brazil	M.A. Silva	KJ417882	KJ417855
<i>L. crassispota</i>	CMM 0242	<i>V. vinifera</i>	Brazil	M.A. Silva	KJ417883	KJ417854
<i>L. crassispota</i>	CMM 0283	<i>V. vinifera</i>	Brazil	M.A. Silva	KJ417884	KJ417853
<i>L. crassispota</i>	WAC 12533	<i>Santalum album</i>	Australia	T.I. Burgess & G. Pegg	DQ103550	DQ103557
<i>L. egyptiaca</i>	BOT 29	<i>M. indica</i>	Egypt	A.M. Ismail	JN814401	JN814428
<i>L. egyptiaca</i>	CMM 0305	<i>V. vinifera</i>	Brazil	M.A. Silva	KJ417885	KJ417858
<i>L. egyptiaca</i>	CMM 0281	<i>V. vinifera</i>	Brazil	M.A. Silva	KJ417886	KJ417859
<i>L. egyptiaca</i>	CMM 0795	<i>V. vinifera</i>	Brazil	M.A. Silva	KJ417887	KJ417857

<i>L. egyptiaca</i>	BOT 10	<i>M. indica</i>	Egypt	A.M. Ismail	JN814397	JN814424
<i>L. euphorbicola</i>	CMM 3651	<i>Jatropha curcas</i>	Brazil	A.R. Machado & O.L. Pereira	KF234553	KF226711
<i>L. euphorbicola</i>	CMM 3609	<i>J. curcas</i>	Brazil	A.R. Machado & O.L. Pereira	KF234543	KF226689
<i>L. euphorbicola</i>	CMM 0323	<i>V. vinifera</i>	Brazil	M.A. Silva	KJ417888	KJ417860
<i>L. euphorbicola</i>	CMM 0280	<i>V. vinifera</i>	Brazil	M.A. Silva	KJ417889	KJ417863
<i>L. euphorbicola</i>	CMM 0316	<i>V. vinifera</i>	Brazil	M.A. Silva	KJ417890	KJ417861
<i>L. euphorbicola</i>	CMM 0786	<i>V. vinifera</i>	Brazil	M.A. Silva	KJ417891	KJ417862
<i>L. euphorbicola</i>	CMM 3652	<i>J. curcas</i>	Brazil	A.R. Machado & O.L. Pereira	KF234554	KF226715
<i>L. gilaniensis</i>	CBS 124704	<i>Unknown</i>	Iran	J. Abdollahzadeh & A. Javadi	GU945351	GU945342
<i>L. gilaniensis</i>	IRAN 1501C	<i>Unknown</i>	Iran	J. Abdollahzadeh & A. Javadi	GU945352	GU945341
<i>L. gonubiensis</i>	CBS 115812	<i>Syzigium cordatum</i>	South Africa	D. Pavlic	DQ458892	DQ458860
<i>L. gonubiensis</i>	CMW 14078	<i>S. cordatum</i>	South Africa	D. Pavlic	AY639594	DQ103567
<i>L. hormozganensis</i>	CBS 124709	<i>Olea sp.</i>	Iran	J. Abdollahzadeh & A. Javadi	GU945355	GU945340
<i>L. hormozganensis</i>	CMM 0495	<i>V. vinifera</i>	Brazil	M.A. Silva	KJ417892	KJ417865
<i>L. hormozganensis</i>	CMM 0362	<i>V. vinifera</i>	Brazil	M.A. Silva	KJ417893	KJ417864
<i>L. hormozganensis</i>	CMM 0237	<i>V. vinifera</i>	Brazil	M.A. Silva	KJ417894	KJ417866
<i>L. hormozganensis</i>	IRAN 1498C	<i>M. indica</i>	Iran	J. Abdollahzadeh & A. Javadi	GU945356	GU945344
<i>L. iraniensis</i>	IRAN 1520C		Iran	A. Javadi	GU945346	GU945334
<i>L. iraniensis</i>	IRAN 1519C	<i>M. indica</i>	Iran	A. Javadi	GU945350	GU945338
<i>L. iraniensis</i>	IRAN 1517C	<i>Citrus sp.</i>	Iran	A. Javadi	GU945349	GU945337
<i>L. jatrophicola</i>	CMM 3610	<i>J. curcas</i>	Brazil	A.R. Machado & O.L. Pereira	KF234544	KF226690
<i>L. jatrophicola</i>	CMM 0247	<i>V. vinifera</i>	Brazil	M.A. Silva	KJ417895	KJ417870
<i>L. jatrophicola</i>	CMM 0360	<i>V. vinifera</i>	Brazil	M.A. Silva	KJ417896	KJ417867
<i>L. jatrophicola</i>	CMM 0409	<i>V. vinifera</i>	Brazil	M.A. Silva	KJ417897	KJ417868
<i>L. jatrophicola</i>	CMM 0342	<i>V. vinifera</i>	Brazil	M.A. Silva	KJ417898	KJ417872

<i>L. jatrophicola</i>	CMM 0290	<i>V. vinifera</i>	Brazil	M.A. Silva	KJ417899	KJ417871
<i>L. jatrophicola</i>	CMM 0840	<i>V. vinifera</i>	Brazil	M.A. Silva	KJ417900	KJ417869
<i>L. lignicola</i>	MFLUCC 11 0435	Dead wood of unknown host	Thailand	A.D. Ariyawansa	GU945346	GU945334
<i>L. lignicola</i>	MFLUCC 11 0656	Dead wood of unknown host	Thailand	A.D. Ariyawansa	JX646798	JX646863
<i>L. macrospora</i>	CMM 3833	<i>J. curcas</i>	Brazil	A.R. Machado & O.L. Pereira	KF234557	KF226718
<i>L. mahajangana</i>	CMW 27820	<i>Terminalia catappa</i>	Madagascar	J. Roux	FJ900597	FJ900643
<i>L. mahajangana</i>	CMW 27801	<i>T. catappa</i>	Madagascar	J. Roux	FJ900595	FJ900641
<i>L. margaritaceae</i>	CBS 122065	<i>Adansonia gibbosa</i>	Western Australia	T.I. Burgess	EU144051	EU144066
<i>L. margaritaceae</i>	CBS 122519	<i>A. gibbosa</i>	Western Australia	T.I. Burgess	EU144050	EU144065
<i>L. marypalme</i>	CMM 2173	<i>C. papaya</i>	Brazil	J.H.A. Monteiro	KC484839	KC481563
<i>L. marypalme</i>	CMM 2272	<i>C. papaya</i>	Brazil	J.H.A. Monteiro	KC484842	KC481566
<i>L. marypalme</i>	CMM 2275	<i>C. papaya</i>	Brazil	J.H.A. Monteiro	KC484843	KC481567
<i>L. missouriana</i>	UCD 2193MO	<i>V. vinifera</i>	Missouri, USA	K. Striegler & G.M. Leavitt	HQ288225	HQ288267
<i>L. missouriana</i>	UCD 2199MO	<i>V. vinifera</i>	Missouri, USA	K. Striegler & G.M. Leavitt	HQ288226	HQ288268
<i>L. parva</i>	CBS 456.78	<i>Cassava-field soil</i>	Colombia	O. Rangel	EF622083	EF622063
<i>L. parva</i>	CBS 494.78	<i>Cassava-field soil</i>	Colombia	O. Rangel	EF622084	EF622064
<i>L. plurivora</i>	STE-U 5803	<i>Prunus salicina</i>	South Africa	U. Damm	EF445362	EF445395
<i>L. plurivora</i>	STE-U 4583	<i>V. vinifera</i>	South Africa	F. Halleen	AY343482	EF445396
<i>L. pseudotheobromae</i>	CBS 116459	<i>Gmelina arborea</i>	Costa Rica	J. Carranza-Velásquez	EF622077	EF622057
<i>L. pseudotheobromae</i>	CMM 0454	<i>V. vinifera</i>	Brazil	M.A. Silva	KJ417901	KJ417875
<i>L. pseudotheobromae</i>	CMM 0448	<i>V. vinifera</i>	Brazil	M.A. Silva	KJ417902	KJ417873
<i>L. pseudotheobromae</i>	CMM 0347	<i>V. vinifera</i>	Brazil	M.A. Silva	KJ417903	KJ417874
<i>L. pseudotheobromae</i>	IRAN 1518C	<i>Citrus sp.</i>	Iran	J. Abdollahzadeh/A. Javadi	GU973874	GU973866
<i>L. rubropurpurea</i>	WAC 12535	<i>E. grandis</i>	Queensland	T.I. Burgess & G. Pegg	DQ103553	DQ103571

<i>L. rubropurpurea</i>	WAC 12536	<i>E. grandis</i>	Queensland	T.I. Burgess & G. Pegg	DQ103554	DQ103572
<i>L. subglobosa</i>	CMM3872	<i>J. curcas</i>	Brazil	A.R. Machado & O.L. Pereira	KF234558	KF226721
<i>L. subglobosa</i>	CMM 4046	<i>J. curcas</i>	Brazil	A.R. Machado & O.L. Pereira	KF234560	KF226723
<i>L. theobromae</i>	CBS 111530	<i>Unknown</i>	Unknown	Unknown	AY622074	AY622054
<i>L. theobromae</i>	CMM 0384	<i>V. vinifera</i>	Brazil	M.A. Silva	KJ417904	KJ417876
<i>L. theobromae</i>	CMM 0820	<i>V. vinifera</i>	Brazil	M.A. Silva	KJ417905	KJ417877
<i>L. theobromae</i>	CMM 0307	<i>V. vinifera</i>	Brazil	M.A. Silva	KJ417906	KJ417879
<i>L. theobromae</i>	CMM 0310	<i>V. vinifera</i>	Brazil	M.A. Silva	KJ417907	KJ417880
<i>L. theobromae</i>	CMM 0455	<i>V. vinifera</i>	Brazil	M.A. Silva	KJ417908	KJ4177878
<i>L. theobromae</i>	CBS 164.96	<i>Fruit on coral reef coast</i>	New Guinea	A. Aptroot	AY640255	AY640258
<i>L. venezuelensis</i>	WAC 12539	<i>Acacia mangium</i>	Venezuela	S. Mohali	DQ103547	DQ103568
<i>L. venezuelensis</i>	WAC 12540	<i>A. mangium</i>	Venezuela	S. Mohali	DQ103548	DQ103569
<i>L. viticola</i>	UCD 2553AR	<i>V. vinifera</i>	USA	K. Striegler & G.M. Leavitt	HQ288227	HQ288269
<i>L. viticola</i>	UCD 2604MO	<i>V. vinifera</i>	USA	K. Striegler & G.M. Leavitt	HQ288228	HQ288270

^a *CBS* Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands; *CMW* Forestry and Agricultural Biotechnology Institute, University of Pretoria, South Africa; *WAC* Department of Agriculture Western Australia Plant Pathogen Collection, University of Western Australia, Perth, Australia; *CMM* Culture Collection of Phytopathogenic Fungi "Prof. Maria Menezes", Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil; *STE-U* Culture Collection of the Department of Plant Pathology, University of Stellenbosch, Stellenbosch, South Africa; *UCD* Phaff Yeast Culture Collection, Department of Food Science and Technology, University of California, Davis, USA; *BOT* A. M. Ismail, Plant Pathology Research Institute, Giza, Egypt; *IRAN* Culture Collection of the Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran

^b Sequence numbers in *bold* were obtained in the present study

Table 2 Comparison of conidial size of *Lasiodiplodia* species examined in this study and previous studies

Species	Conidial size (μm)	L/W ratio	References
<i>Lasiodiplodia brasiliense</i>	22.3–28.7 \times 11.9–16.7	1.8	This study
	22.7–29.2 \times 11.7–17.0	1.8	Netto et al. 2014
<i>L. crassispora</i>	27.2–29.6 \times 15.3–16.9	1.8	This study
	27–30 \times 14–17	1.8	Burgess et al. 2006
<i>L. egyptiaca</i>	20.4–23.1 \times 11.2–13.1	1.8	Present study
	20–24 \times 11–13	1.8	Ismail et al. 2012
<i>L. euphorbicola</i>	18.0–24.4 \times 9.8–15.3	1.8	This study
	15–23 \times 9–12	1.7	Machado et al. 2014
<i>L. hormozganensis</i>	19.8–22.7 \times 11.8–13.2	1.8	This study
	19.6–23.4 \times 11.7–13.3	1.7	Abdollahzadeh et al. 2010
<i>L. jatrophiicola</i>	23.6–28.5 \times 11.0–14.8	1.9	This study
	22–26 \times 14–17	1.6	Machado et al. 2014
<i>L. pseudotheobromae</i>	25.3–29.6 \times 14.7–16.8	1.8	This study
	25.5–30.5 \times 14.8–17.2	1.7	Alves et al. 2008
<i>L. theobromae</i>	24.5–28.2 \times 13.3–15.1	1.8	This study
	23.6–28.8 \times 13–15.4	1.9	Alves et al. 2008

Table 3 Optimum temperature for mycelial growth and mycelial growth rate at 30 °C of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of table grape in São Francisco Valley, Northeastern Brazil

Species	n	Optimum temperature (°C) ± SE	Mycelial growth rate (mm/day) ± SE
<i>Lasiodiplodia brasiliense</i>	4	31.2 ± 0.43 ab	36.9 ± 2.11 c
<i>L. crassispora</i>	4	30.3 ± 0.40 b	40.6 ± 1.10 ab
<i>L. egyptiaca</i>	3	29.9 ± 0.86 b	41.5 ± 3.18 ab
<i>L. euphorbicola</i>	4	32.6 ± 0.71 a	39.8 ± 1.93 bc
<i>L. hormozganensis</i>	3	30.9 ± 0.59 ab	39.9 ± 1.57 bc
<i>L. jatrofiphicola</i>	6	30.8 ± 0.60 ab	43.5 ± 2.16 a
<i>L. pseudotheobromae</i>	3	30.1 ± 0.55 b	40.3 ± 1.86 ab
<i>L. theobromae</i>	5	30.0 ± 0.33 b	41.1 ± 0.74 ab

Mean ± standard error. Values within columns followed by the same letter do not differ significantly according to Fisher's LSD test ($P \leq 0.05$)

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

1. Uma grande diversidade de espécies fúngicas está associada ao declínio da videira no Nordeste brasileiro, incluindo *Botryosphaeria mamane*, *Campylocarpon fasciculare*, *C. pseudofasciculare*, *Lasiodiplodia crassipora*, *L. parva*, *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae*, *Neofusicoccum parvum*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Pm. parasiticum* e *Phaeomoniella chlamydospora*;
2. Todas as espécies são registradas pela primeira vez em videira no Brasil, com exceção de *L. theobromae*;
3. Dentre as espécies constatadas, *B. mamane*, *L. parva* e *L. pseudotheobromae* são registradas pela primeira vez em videira no mundo e *C. fasciculare* é registrada pela primeira vez em videira no continente americano;
4. Nove espécies de *Lasiodiplodia* causam a morte descendente da videira no Vale do São Francisco, incluindo *L. brasiliense*, *L. crassipora*, *L. egyptiaca*, *L. euphorbicola*, *L. hormozganensis*, *L. jatrophiicola*, *L. parva*, *L. pseudotheobromae* e *L. theobromae*;
5. *Lasiodiplodia theobromae* foi a espécie mais prevalente associada à morte descendente da videira no Vale do São Francisco;
6. *Lasiodiplodia brasiliense* foi a espécie mais virulenta à videira.