



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



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Tese de Doutorado

**Diversidade Populacional de *Lasiodiplodia* patogênica a
coqueiro e ação biocontroladora de leveduras**

Iwanne Lima Coelho

**Recife – PE
2018**

IWANNE LIMA COELHO

**DIVERSIDADE POPULACIONAL DE *Lasiodiplodia* PATOGÊNICA A
COQUEIRO E AÇÃO BIOCONTROLADORA DE LEVEDURAS**

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.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. Dr. Delson Laranjeira

Coorientadores: Dra. Tereza Cristina de Assis e Dr. Valdir de Queiroz Balbino

**RECIFE – PE
ABRIL – 2018**

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

C672d Coelho, Iwanne Lima.
Diversidade populacional de Lasiodiplodia patogênica a coqueiro e ação
Biocontroladora de leveduras / Iwanne Lima Coelho. – Recife, 2018.
110 f.: il.

Orientador(a): Delson Laranjeira.
Coorientadores: Tereza Cristina de Assis, Valdir de Queiroz Balbino.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, BR-PE, 2018.
Inclui referências.

1. Agentes de biocontrole 2. Cocos nucifera 3. Lasiodiplodia pseudotheobromae
4. Lasiodiplodia theobromae 5. Meyerozyma caribbica I. Laranjeira, Delson, orient.
II. Assis, Tereza Cristina de, coorient. III. Balbino, Valdir de Queiroz, coorient.
IV. Título

CDD 632

**DIVERSIDADE POPULACIONAL DE *Lasiodiplodia* PATOGÊNICA A
COQUEIRO E AÇÃO BIOCONTROLADORA DE LEVEDURAS**

IWANNE LIMA COELHO

Tese defendida e aprovada pela banca examinadora em: 26/02/2018

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Delson Laranjeira (UFRPE)

EXAMINADORES:

Dr. Luiz Gonzaga Biones Ferraz (IPA)

Prof. Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara (UFRPE)

Prof. Dra. Rejane Pereira Neves (UFPE)

Dra. Tereza Cristina de Assis (IPA)

**RECIFE – PE
ABRIL – 2018**

*Dedico este trabalho a Deus, o autor da
minha vida, a aquarela dos meus sonhos e
o caminho para os meus passos.*

*Ao meu marido, Gerson Barros, teu
carinho e apoio despertam o meu melhor.*

*Aos meus pais, Ivanildo e Heliane, o meu
bem maior.*

*Aos meus amados irmãos Susianne e
Ivanildo.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo amparo, cuidado, força, amor, direção, paciência e livramentos concedidos e por permitir a finalização de mais uma grande etapa.

Aos meus pais, Ivanildo e Heliane, pelos ensinamentos, amor, incentivo, apoio e confiança, e aos meus irmãos, Susianne e Ivanildo pelo amor, apoio, incentivo e orações.

Aos meus orientadores Dr. Delson Laranjeira, Dra. Tereza Cristina de Assis, Dr. Valdir de Queiroz Balbino, pela orientação, apoio e paciência.

Aos Prof. Dr. Marcos Paz S. Câmara, Prof^a. Dra. Rejane Pereira Neves e Prof^a. Dra. Lilian Guimarães, por todo auxílio, avaliações e orientações nesse processo de doutoramento.

Ao Dr. Luiz Gonzaga Biones Ferraz, por me adotar cientificamente, participar durante as coletas de campo e ser um grande mentor e amigo.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, ao Instituto Agronômico de Pernambuco - IPA e à Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, pelos apoios institucionais, estruturais e analíticos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela concessão da bolsa de estudo e ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, pelas contribuições necessárias à minha formação.

Ao meu esposo, Gerson Barros, por estar ao meu lado em todos os momentos, pelo apoio, carinho e dedicação.

Aos meus estimados alunos de Supervisão Científica Igor Alexsander de Melo Pimentel, Juliane Maria Galindo Bezerra e Sérgio Batista Ramos, pelo apoio incondicional durante a realização das atividades práticas.

À toda a equipe do Laboratório Fungos de Solo – LAFSOL/UFRPE, pelos bons e não tão bons momentos vividos.

Às amigas Danielly da Silva Lucena, Alessandra Moraes, Jéssica Rodrigues, Tarciana Silva dos Santos, Thaís Regina Pintino de Almeida pelo companheirismo e auxílio em muitos momentos, mas principalmente pelas risadas que compartilhamos.

Aos Prof. Dr. Marco Aurélio S. da Gama e Prof. Dr. Herbert Álvaro A. de Siqueira, pelo apoio e disponibilização estrutural durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Técnicos José Carlos Barbosa Nascimento (IPA) e Heidi Lacerda A. da Cruz (UFPE), pelo auxílio nas atividades em campo e análises laboratoriais, respectivamente.

A todos os meus familiares e amigos que sempre demonstraram desejos positivos e torceram pelo meu sucesso.

E se a gente se acostumar?

E se a gente se acostumar a não querer,
A não poder,
A não tentar,
A não sentir,
A não insistir,
A não existir?

Se acostumar a monotonia verbal,
A concordâncias sem sentidos,
A contextos insípidos,
Fundamentos vazios,
Motivos abstratos,
Sentimentos baratos?

Seja o descostume a essência destoante
nesse mundo de costumes tão comuns.

Iwanne Coelho

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	viii
GENERAL ABSTRACT	x
CAPÍTULO I	1
INTRODUÇÃO GERAL	2
1. O PAPEL DO COQUEIRO NA ECONOMIA MUNDIAL	2
2. BARREIRAS FITOSSANITÁRIAS	5
2.1. DOENÇAS INCIDENTES NO COQUEIRO	5
2.2. OCORRÊNCIA DE <i>Lasiodiplodia</i> spp. EM COQUEIRO	6
2.3. MANEJO DA QUEIMA-DAS-FOLHAS E PODRIDÃO BASAL EM COCO	7
3. LEVEDURAS NO CONTROLE BIOLÓGICO	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
CAPÍTULO II	22
Espécies de <i>Lasiodiplodia</i> associadas a queima das folhas e podridão basal dos frutos de coqueiro, no Nordeste do Brasil	23
Resumo	23
Introdução	24
Material e Métodos	27
Resultados	33
Discussão	35
Agradecimentos	38
Referências	39
CAPÍTULO III	57
<i>Meyerozyma caribbica</i>: presente na microbiota de coco e potencialmente biocontroladora da podridão basal em coco-anão-verde	58
Destaques	58
Resumo	58
1. Introdução	60
2. Material e Métodos	63
3. Resultados	70
4. Discussão	72
Agradecimentos	77
Referências	78
CONCLUSÕES GERAIS	98

RESUMO GERAL

A presença de microrganismos é determinante chave à sanidade das plantas e produtividade de cultivos. A incidência de queima-das-folhas ou da podridão basal dos frutos, configura-se um dos maiores problemas fitossanitários da cocoicultura e representa ameaça para toda a cadeia produtiva, principalmente em coco-verde, resultando em perdas significativas inclusive em frutos destinados à produção de água, podendo acometer desde a fase pré até a pós colheita. Sendo um fitopatógeno de distribuição cosmopolita, capaz de sobreviver como endofítico ou saprofítico, o manejo fitossanitário de *Lasiodiplodia* é duplamente complexo e dispendioso. Esse manejo é realizado por aplicação de fungicidas sistêmicos de significativos índices toxicológicos e graves implicações em toda cadeia trófica. Diante dos riscos de contaminação humana/ambiental e ao surgimento de linhagens fitopatogênicas resistentes, relacionados ao uso desses produtos químicos, a adequada identificação do patógeno configura-se essencial à tomada de decisão sobre medidas de manejo cabíveis. Além disso, medidas alternativas agregadas ao manejo convencional, como a prospecção e aplicação de leveduras biocontroladoras, podem representar uma alternativa ecologicamente sustentável, passível de aplicação em sistemas de manejo integrado ao controle de fitopatógenos, principalmente àqueles relacionadas a doenças pós-colheita. Nesse estudo, abordou-se: i) a capacidade patogênica e aspectos de severidade epidemiológica, desempenhados por espécies de *Lasiodiplodia*, provenientes de coqueirais cultivados nas zonas seca, subúmida e úmida do Nordeste brasileiro; ii) a identificação de leveduras, provenientes da microbiota dos tecidos de casca e mesocarpo de coco (frutos); iii) a prospecção biocontroladora dessas leveduras sobre *L. theobromae* e *L. pseudotheobromae* *in vitro*; iv) o potencial biocontrolador de leveduras à podridão basal em coco-anão-verde. A identificação de leveduras e de isolados fitopatogênicos foi determinada por comparação de sequências amplificadas da região ITS e por combinadas das regiões gênicas *tefl- α* , ITS, *tub2* e *rpb2*, respectivamente, com aquelas de espécies de referência, por meio de análises de Máxima Verossimilhança e inferências Bayseana. As prospecções das leveduras, como agentes de biocontrole – BCAs, sobre os isolados fitopatogênicos foram realizados *in vitro*, por ação de metabólitos difundidos em meio de cultivo. Testes de patogenicidade e biocontrole da podridão basal foram realizados em frutos assintomáticos de coqueiro (variedade anão, cultivar verde), com aproximadamente 4 meses do estágio de maturação fisiológica. Identificou-se a abundância natural de três espécies previamente relatadas na

cultura do coqueiro: *L. brasiliensis*, *L. pseudotheobromae* e *L. theobromae*; e uma não relatada: *L. subglobosa*. A espécie *L. theobromae* foi identificada em coqueiras presentes em todas as zonas avaliadas, enquanto *L. pseudotheobromae* foi relatada apenas para a zona seca. Todos os isolados foram patogênicos a coco-anão-verde, sendo que *L. theobromae* e *L. pseudotheobromae* mostraram-se mais virulentos. *In vitro*, das 54 cepas de *Meyerozyma caribbica* avaliadas, 23 destacaram-se significativamente por inibir mais que 73% do crescimento micelial - PIC sobre isolados representativos de *L. theobromae* e *L. pseudotheobromae*. Em coco-anão-verde, as 23 leveduras selecionadas responderam de forma promissora, reduzindo sintomas causados por *L. theobromae* semelhantemente ao fungicidas difenoconazol e tiabendazol e, aos sintomas causados por *L. pseudotheobromae*, algumas leveduras superaram até mesmo o desenvolvimento da doença, observado nos tratamentos com os defensivos químicos. Esse estudo representa os primeiros relatos de: 1) *L. pseudotheobromae* oriundos de coqueirais nordestinos; 2) *L. subglobosa* como agente causal da podridão basal em coco-anão-verde; 3) *M. caribbica*, presente naturalmente na microbiota de coco, e seu potencial como BCAs na inibição *in vitro*, por ação indireta de compostos difundidos em meio de cultivo, e redução dos sintomas da podridão basal em coco-anão-verde, causada por *L. theobromae* e *L. pseudotheobromae*.

Palavras-chaves: Agentes de biocontrole, *Cocos nucifera*, *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Meyerozyma caribbica*

GENERAL ABSTRACT

The presence of microbes is key determinant to sanity of plants and crop productivity. The incidence of leaf blight or stem-end rot represent a large problem phytosanitary of cocoiculture and represent threat for all productive chain, chiefly in green dwarf coconut, resulting in loss significant including fruits intended to water production, can target since the phase pre to postharvest. Be a phytopagen in worldwide, able of survive an endophytic and saprophytic, phytosanitary management of *Lasiodiplodia* is doubly complex and expensive. This management is performed systemic fungicides of toxicity high with hazards to food chain. In view of the risks of contamination to environmental and human health and to rise phytopathogenic lineages strains, related to the use these chemical products, the correct identification of the phytopathogen intended essential to decision making about able management actions. Moreover, alternative actions together to conventional management, a prospection and application of biocontrollers yeast, can represent an alternative sustainable ecologically, applicable in management of systems together for phytopathogens control, chiefly those related to postharvest diseases. In this study, we aimed to i) the pathogenic able and epidemiological severity aspects, perform by *Lasiodiplodia* species, from of coconut trees crops in dry, sub-humid and humid of Northeast Brazil, ii) identification of yeasts from microbiota of the issues of shell and mesocarp of coconut, iii) the prospection biocontrol theses yeasts on *L. theobromae* e *L. pseudotheobromae* *in vitro*, iv) the biocontrol potential of stem-end rot in green dwarf coconut. The identification of yeasts and isolated phytopathogenic were determined by comparation of amplified sequences of ITS region and by combined of regions genics *tef1- α* , ITS, *tub2* and *rpb2*, respectively, with those reference species by Maximum likelihood analyze and Bayesian inference. The prospections of yeasts a biocontrol agents - BCAs about phytopathogenics isolated were perform *in vitro* by widespread metabolites in ground médium. Tests of patogenicity and biocontrol of stem-end rot were performed in no symptoms of coconut trees (green dwarf variety, green cultivate) with about four months of maturation physiological stadium. It was identified the natural abundance of three species before described: *L. brasiliensis*, *L. pseudotheobromae* e *L. theobromae* and a not know: *L. subglobosa*. *L. theobromae* were identified in coconut crops occurrences in all evaluated zones, while *L. pseudotheobromae* were related only for dry zone. All isolated were pathogenic to green dwarf coconut and *L. theobromae* e *L. pseudotheobromae* exhibited more virulent. *In vitro*, of 54 strains of *Meyerozyma caribbica* evaluated, 23 were

significantly to supply percent inhibition of mycelial growth PIC above 73% on isolated of *L. theobromae* e *L. pseudotheobromae*. In green dwarf coconut, these selected yeasts responded a promising way, lower symptoms caused by *L. pseudotheobromae* same way to difenoconazol e tiabendazol fungicides and to symptoms caused by *L. pseudotheobromae*, someone yeasts overcome the development of disease, observed in tratamento with chemical products. This study represents the first reports of: 1) *L. pseudotheobromae* from coconut trees Northeast Brazil; 2) *L. subglobosa* a caused agent of stem-end rot in green dwarf coconut; 3) *M. caribbica*, occurrent naturally in coconut microbiota, and their potential a BCAs in inhibition *in vitro* by action indirect of diffused compounds in growing medium and reduction of symptoms of stem-end rot caused by *L. theobromae* e *L. pseudotheobromae*.

Keywords: Biocontrol agents, *Cocos nucifera*, *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Meyerozyma caribbica*

CAPÍTULO I

Introdução Geral

TÍTULO DO TRABALHO: DIVERSIDADE POPULACIONAL DE *Lasiodiplodia* PATOGÊNICA A COQUEIRO E AÇÃO BIOCONTROLADORA DE LEVEDURAS

INTRODUÇÃO GERAL

1. O PAPEL DO COQUEIRO NA ECONOMIA MUNDIAL

O coqueiro (*Cocos nucifera* L), também conhecido como coco-da-baía, teve origem no Sudeste asiático e foi introduzido no Brasil, em meados de 1553, durante o período colonial (GOMES, 1977). Os primeiros exemplares introduzidos e disseminados a partir do litoral baiano para toda a faixa costeira nordestina foram da variedade gigante, oriundos da Ilha de Cabo Verde. A partir de 1925 e 1939, por ação atribuída aos Drs. Arthur Neiva e Miguel Calmon, foram introduzidos coqueiros da variedade anã, provenientes de Java e do norte da Malásia, nos Estados do Norte brasileiro (SIQUEIRA et al., 1997, 2002). Sendo uma palmeira de clima tropical, atualmente encontra-se largamente distribuída na Ásia, África, América Latina e região do Pacífico, abrangendo pelo menos 86 países tropicais ao longo da faixa costeira entre os trópicos de Câncer e Capricórnio (FERREIRA NETO et al., 2002; SIQUEIRA et al., 2002).

Essa planta é considerada uma das fruteiras mais importantes do mundo e desempenha elevado papel social e econômico para os países da faixa tropical do globo (CARVALHO et al., 2006; FERREIRA NETO et al.; 2007), especialmente para as populações de baixa renda. Além da geração de fontes financeiras rentáveis, a produção de coco constitui um sistema particular, devido a versatilidade produtiva e de produtos comercializados (PRADES et al., 2016), e autossustentável, no qual as fontes alimentares, ricas em proteínas e calorias, configuram a base alimentar de muitas comunidades produtoras (CUENCA, 1998).

Além da plasticidade agrícola, que favorece a adaptação da planta a muitos tipos de solos e climas, a produção contínua do coqueiro, sem dúvida, é o fator estabilizador no tocante à geração de emprego e renda nos três segmentos da cadeia produtiva do coco (FONTES; WANDERLEY, 2006; WARWICK; PASSOS, 2009). Mesmo em condições desfavoráveis, a palmeira pode produzir inicialmente aos 4 a 7 anos de idade e continuar esse processo produtivo até 60 anos ou mais, contribuindo para o abastecimento ininterrupto do mercado consumidor (PRADES et al., 2016).

Em 2016, segundo dados da Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO, a produção mundial de coco movimentou cerca de 10,6 bilhões de dólares, a partir da produção de 59 milhões de toneladas de frutos, em uma área cultivada de 12,2 milhões de hectares. A Ásia é responsável por 83 % dessa produtividade e o restante está distribuída entre África, América Latina, Oceania e Caribe. A Indonésia continua liderando o ranking produtivo mundial, seguido por Filipinas e Índia, com produção de, aproximadamente, 17,7; 13,8 e 11,1 milhões de toneladas de coco, respectivamente (FAO, 2016).

A América do Sul responde por 60 % da produtividade do Continente Americano, o equivalente a 3,1 milhões de toneladas em 300 mil hectares plantados, e nesse montante, 2,7 milhões pertencem ao Brasil, detentor da quarta posição na produção mundial, com nada menos que 87 % da produção Sul-Americana e pelo menos 703 milhões de dólares, relativos a produção de 2014. Esse posicionamento de destaque internacional é alavancado, principalmente, pela região Nordeste brasileira, que contribui com pelo menos 72 % do coco nacional, proporcional a seus 1,4 milhão de toneladas de frutos colhidos em quase 195 mil hectares plantados (FAO, 2016).

Entre os Estados nordestinos, destacam-se: Bahia, Ceará, Sergipe (três principais produtores) e Pernambuco (quinto lugar), fornecendo 542, 262, 231 e 130 mil toneladas de frutos em 2016, respectivamente. O Norte do país também participa na formação desse valor bruto nacional, incrementando 178 mil toneladas de frutos produzidas no Estado do Pará, o quarto maior produtor no ranking nacional (IBGE, 2016).

Com mais de 360 modalidades de aproveitamento global, grande parte do coco brasileiro é destinada ao consumo *in natura* e/ou industrialização de alimentos (FERREIRA NETO et al., 2007; SOUSA et al., 2007). No Brasil, comercializam-se mais de 100 produtos e subprodutos, tais como o leite de coco e coco ralado, diferentemente de outros países, em que o principal produto é o óleo de coco (CUENCA, 1997; HOLANDA et al., 2008).

Acerca das modalidades de aproveitamento do coco, a potencialidade de exploração econômica não se resume ao aproveitamento da água e do albúmen. Outras partes do coqueiro também são utilizadas, para as mais diversas finalidades, como por exemplo: a casca dos frutos para a extração de fibras de diferentes comprimentos (CORRADINI et al., 2009), utilizadas na fabricação de diversos artigos que variam desde vestuário, peças decorativas a componentes de bancos utilizados na indústria automobilística (CUENCA,

1997) e mesocarpo, raízes, estipe, inflorescência e folhas, como subprodutos ou derivados de interesse econômico, empregados no mercado paisagístico (FERREIRA et al., 1998).

Pode-se dizer que a água de coco é uma estratégia ecofisiológica de sobrevivência da planta, que armazena substâncias nutritivas direcionadas a nutrição embrionária, germinação ou desenvolvimento da plântula, em eventuais condições de estresse ambiental (ARAGÃO et al., 2005). Embora possa ser empregado na agroindústria alimentícia e/ou do fruto seco *in natura* em menor escala (CARVALHO et al., 2006), o coqueiro-anão-verde é recomendado preferencialmente para a produção de água (FERRAZ et al., 2009a), pois apresenta maior precocidade produtiva e qualidades sensoriais superiores em relação à água proveniente de frutos produzidos por outras cultivares.

Esse fruto, colhido em estágio de maturação verde entre seis e sete meses, contém aproximadamente 400 mL de água, com altos teores de potássio, sais minerais e rica em propriedades nutritivas. Nesse estágio, o coco apresenta maiores rendimentos de água e maior valor sensorial ante o sabor adocicado, atribuído aos teores de glicose, frutose e grau brix. (ARAGÃO et al., 2007; MAGALHÃES et al., 2005).

Segundo Prades et al. (2016), o mercado de água de coco surgiu no Brasil, no início dos anos 2000, e ‘ganhou força’ pela aceitação e demanda crescente nos EUA. Referindo-se a dados de 2004 da Associação das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas Não Alcoólicas - ABIR, Martins e Jesus Júnior (2011), informam que o consumo nacional de água de coco envasada industrialmente foi de, aproximadamente, 22 milhões de litros. Em 2014, o EUA importou cerca de 300 mil toneladas de água de coco provenientes do Brasil (38%) e da Ásia (52%).

Segundo Silva (2006), o consumo nacional foi da ordem de 70 milhões de litros de água de coco envasada industrialmente. Carvalho et al. (2006), acusa o progressivo aumento no interesse e investimento de produtores nesse cultivo devido a constante intensificação na procura desse produto pelos países importadores, principalmente nos períodos mais quentes. Entre os anos de 2005 e 2009, os maiores importadores de coco brasileiro - Turquia, Egito e Argentina, importaram uma média de 262,6; 220,8 e 127,4 toneladas, respectivamente, de coco fresco e seco (MARTINS; JESUS JÚNIOR, 2011).

O aumento de áreas de plantio e a implantação de novas áreas, são reflexo desse crescimento de mercado. No Estado de São Paulo, por exemplo, facilmente constata-se os processos de introdução de coqueirais comerciais em regiões não tradicionais a esse cultivo (BRITO et al., 2002) onde, atualmente são colhidas 17 mil toneladas nos 1,5 mil hectares

plantados (IBGE, 2016). A expansão da industrialização de água de coco também constitui comprovação dessa ascensão econômica, uma vez que muitas são as variedades de marcas de água de coco envasada nas mais diversos designers de embalagens (de embalagens plástica a Tetra Pak®) comercialmente disponíveis nos mais simples estabelecimentos alimentícios, como panificadoras, até nas grandes redes de supermercados e *fast food*.

O aquecimento no mercado de água de coco é impulsionado não só pela inclusão de hábitos saudáveis praticados pela população brasileira, como também pelas muitas propriedades benéficas como: repositora eletrolítica, vitamínica, energética e proteica (MARTINS; JESUS JÚNIOR, 2011). Há uma crescente demanda da água de coco nos mercados de bebidas alcólicas, incrementando os mais diversos tipos de drinks tropicais (BRITO et al., 2002), e não alcólicas, servindo como repositivo isotônico para atletas profissionais ou não.

A utilização de água de coco também vem crescendo nos campos da medicina tradicional; microbiologia, compondo meios artificiais para microrganismos (PRADES et al., 2012); na biotecnologia, como diluente, conservante celular ou mesmo formulações de vacinas (CARVALHO et al., 2006); e em muitas outras finalidades. Segundo Martins e Jesus Júnior (2011), esse mercado informal, no Brasil, é responsável por 80% do volume de água de coco consumido no país. Nas áreas de medicina, biotecnologia, nutrição e outras tem-se o registro de consumo em torno de 100 a 350 milhões de litros/ano.

No Brasil, mesmo apresentando fatores favoráveis à produção do coco verde, esta tem sido limitada para cerca de 3.400 frutos por hectare, devido aos baixos índices pluviométricos e à incidência de pragas e doenças (WARWICK; PASSOS, 2009). Este cenário contrasta com o potencial de produção superior a 200 frutos/planta/ano do coqueiro-anão, quando se dispensa ao coqueiral, irrigação e manejos adequados, podendo assim ultrapassar 300 frutos/planta/ano (FERRAZ et al., 2009a, 2009b; PIRES et al., 2004), o equivalente a mais de 40.000 frutos/ha/ano.

2. BARREIRAS FITOSSANITÁRIAS

2.1. DOENÇAS INCIDENTES NO COQUEIRO

O Nordeste, apesar de representar a maior contribuição na produção bruta nacional de coco, possui a menor produtividade em relação às demais regiões produtoras. Em número

de toneladas ha⁻¹, os estados da Bahia (7,8), Ceará (6,7) e Sergipe (6,2) apresentam produtividade inferior à dos Estados do Rio de Janeiro (15,2), Espírito Santo (9,7) e Pará (9,3) (IBGE, 2016).

A baixa produtividade nordestina, bem como a redução da qualidade de frutos colhidos, advém do déficit hídrico, da baixa fertilidade natural dos solos, da não adoção de práticas de manejo cultural e da incidência de pragas e doenças (FONTES; WANDERLEY, 2010; MARTINS; JESUS JÚNIOR, 2011).

Várias doenças incidem sobre a cultura do coqueiro: o amarelecimento letal do coqueiro (Coconut Lethal Yellowing), classificada no Brasil como Praga quarentenária A1 pelo MAPA, é causado por grupos de ‘Candidatus’ Phytoplasma (anteriormente conhecidos como micoplasmas ou MLOs) (BEAKBANE et al., 1972; HARRISON et al., 2014); a lixa grande e lixa pequena, também chamadas de verrugose, são causadas, respectivamente, por *Camarotella costaricensis* (F. Stevens) K.D. Hyde e P.F. Cannon, 1999) (Sinônimo: *Sphaerodothis acrocomiae* (Mont.) Arx e E. Müll. 1954) e *Camarotella torrendiella* (Bat.) J.L. Bezerra e Vitória, 2008 (Sinônimo: *Phyllachora torrendiellae* (Bat.) Subileau, Renard e Denet. 1993) (LEAL; WARWICK, 2000); anel-vermelho, causada pelo nematoide *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb) Baujard, 1989 (WARWICK, 2005); murcha-de-fitomonas, causada pelo protozoário *Phytophthora staheli* McGhee e McGhee (ARAÚJO et al., 2003); a resinose do coqueiro, também conhecida como “stem bleeding”, causada pelo fungo *Ceratocystis paradoxa* (De Seynes) Höhn, (NAMBIAR et al., 1986, 1989); Atrofia-Letal-da-Coroa do Coqueiro – ALCC, com etiologia ainda desconhecida (FERRAZ et al., 2012); Por fim, a queima-das-folhas (CORREIA; COSTA, 2005); e podridão basal dos frutos (HALFELD-VIEIRA; NECHET, 2005; VIANA et al., 2002), causada, principalmente, por *Lasiodiplodia theobromae* Pat., 1892 (Sinônimo: *Botryodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon e Maubl, 1909).

2.2. OCORRÊNCIA DE *Lasiodiplodia* spp. EM COQUEIRO

Embora seja um patógeno oportunista, a incidência de *L. theobromae* resulta em expressivos danos às plantas. No coqueiro, a queima-das-folhas é uma das doenças foliares mais prejudiciais para a planta (MONTEIRO et al., 2013). Estima-se que a ocorrência de doenças na folhagem do coqueiro, como o complexo da queima das folhas e verrugose - CVLB, provoquem perdas de, aproximadamente, 50% da produção brasileira. (BRITO et

al., 2002; SILVA et al., 2017). Assim também progridem as perdas relacionadas a podridão basal em frutos. Em 2001, por exemplo, a ocorrência de podridão basal em coco verde, destinados à exportação, acarretou prejuízos significativos ao Grupo do Coco do Ceará - GCC (VIANA et al., 2002).

O fungo penetra nas folhas através de ferimentos, principalmente os causados por lixas, e provoca sintomas iniciais com lesões necróticas, de coloração marrom-avermelhada, em forma de 'V' invertido na extremidade da folha. Essas lesões necróticas, com arestas definidas, sem áreas de transição entre os tecidos necrótico e saudável, estendem-se por toda a folha, provocando necrose, seca e queda prematura das folhas basais. Consequentemente, sem o apoio das folhas basais, frutos e/ou cachos também sofrem queda prematura (MONTEIRO et al., 2013; SILVA et al., 2017; TALAMINI et al., 2013; WARWICK; TALAMINI, 2009).

Internamente, após atingir o ráquis das folhas, a colonização pelo patógeno causa progressiva necrose interna, capaz de atingir sistemicamente o estipe e provocar o desenvolvimento de rachaduras expostas, que liberam exsudatos, principalmente sobre ráquis e a inserção do pecíolo (MONTEIRO et al., 2013).

Em frutos, a colonização patogênica inicia por formação de anasarca, antecedente a necrose, principalmente na região basal próximo as brácteas. Nessa fase, forma-se uma nítida linha limítrofe entre o tecido afetado e o tecido sadio, posteriormente, o tecido sofre escurecimento, evidenciado pela coloração marrom-clara, até atingir coloração quase preta, enquanto a anasarca avança no tecido sadio. Em estágio avançado da doença, além das lesões de coloração marrom-escura externa e internamente, é comum a ocorrência de exsudação de albúmen líquido na forma de gotas, junto às brácteas, e a presença de sinais do patógeno, na forma de micélio branco-acinzentado na região do cálice ou formação de cirros pcnidiais. Em decorrência da necrose, as brácteas se desprendem dos frutos, provocando queda prematura deles na pré-colheita (HALFELD-VIEIRA; NECHET, 2005; ROSADO et al., 2016; VIANA et al., 2002).

2.3. MANEJO DA QUEIMA-DAS-FOLHAS E PODRIDÃO BASAL EM COCO

Entre os genótipos de coco, há variabilidade quanto a suscetibilidade às doenças foliares, no entanto, essa variabilidade evidencia-se de acordo com a sazonalidade ambiental a qual as plantas estão submetidas. Conforme já mencionado, a cultivar "anão" e variedade

“verde” é a mais comercializada no mercado de água, devido à aceitação do sabor em relação aos frutos das demais variedades, todavia a variedade anão é altamente suscetível a doenças foliares, o que dificulta seu cultivo (SILVA et al., 2017).

Medidas preventivas, baseadas em práticas culturais, como fertilizações equilibrada, irrigação controlada, remoção e queima das folhas basais mortas, podem ser realizadas a fim de reduzir as condições de estresse sobre as plantas. No entanto, o manejo de doenças foliares causadas por *L. theobromae* é realizado largamente e, prioritariamente, por meio de pulverizações de fungicidas foliares (WARWICK; ABAKERLI, 2001; MONTEIRO et al., 2013).

No Brasil, para queima-das-folhas em coqueiro, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA, regulamenta a utilização de produtos à base de dois princípios ativos: difenoconazol e tiabendazol (AGROFIT, 2018). Embora estudos demonstrem a eficácia relativa de dosagens e modos de aplicação de fungicidas dessa natureza, no controle da queima-das-folhas, não há reprodutibilidade desses procedimentos em campo (WARWICK; ABAKERLI, 2001). É comum muitos produtores laçarem mão de conhecimentos empíricos ou de natureza duvidosa, utilizando de forma indiscriminada grande volume de produtos, incluindo, muitas vezes, químicos não recomendados.

A aplicação intervalada de fungicidas, via axila foliar da palmeira, desponta como uma alternativa aplicável, na tentativa de reduzir a quantidade de químicos utilizada no manejo fitossanitário de doenças foliares em coqueirais e, conseqüentemente, reduzir os produtivos. Esse cuidado, contudo, não isenta os possíveis riscos residuais desses produtos na planta e nos frutos (MONTEIRO et al., 2013). Além disso, em boa parte dos cultivos produtivos, principalmente pequenos e médios, essa alternativa é impraticável, diante da falta de recursos financeiros que possam ser direcionados aos custos adicionais de mão-de-obra em campo.

Assim como em outros cultivos, a aparência dos frutos é prioridade máxima em qualquer mercado consumidor, ou seja, os cuidados sanitários desses frutos são prioridade. A podridão basal é a principal doença pós-colheita que afeta coco-verde (VIANA et al., 2002; 2007). De acordo com Viana et al. (2007), as práticas fitossanitárias adequadas à manutenção das qualidades do coco verde, inclusive frutos destinados à exportação e preventivas a ocorrência de podridões, se baseiam no emprego de compostos de fungicidas e cera de carnaúba. Os frutos devem ser desinfestados superficialmente, separados, por corte,

de suas porções polares basais, imersos em solução de cera de carnaúba com o fungicida azoxistrobina e acondicionados em ambientes com temperatura controlada.

Substâncias agrotóxicas, independente da etapa produtiva em que são empregados, representam sérios riscos à poluição ambiental, à saúde animal e humana, bem como à pressão de seleção sobre microrganismos fitopatogênicos (BALLESTER-TOMÁS et al., 2017; TALAMINE et al. 2013). Adicionalmente, diante da crescente demanda no mercado consumidor de água de coco e dos potenciais riscos toxicológicos, agravam-se as preocupações quanto a presença de resíduos de compostos químicos na água de coco (ANJOS; ANDRADE, 2014; BRITO et al., 2002).

Diante dessa situação concreta e grave, atreladas ao uso de defensivos químicos, e das buscas por soluções ambientalmente sustentáveis, as pesquisas direcionadas ao uso de agente de biocontrole - BCAs ganham ênfase (BELLO et al., 2008; DROBY et al., 2009; HERNÁNDEZ-LUZARDO et al., 2007; MAHUNU et al., 2016; SHARMA et al., 2009) e, nesse contexto, leveduras despontam como potenciais biocontroladores a uma ampla gama de fitopatógeno, especialmente àqueles de ocorrência em pós-colheita (BAUTISTA-ROSALES et al., 2013; BALLESTER-TOMÁS et al., 2017; CAMPOS-MARTÍNEZ et al., 2016; CAO et al., 2013; SHARMA et al., 2009; ZENG et al., 2015).

3. LEVEDURAS NO CONTROLE BIOLÓGICO

Mesmo pertencendo aos filos Ascomycota e Basidiomycota, entre os fungos mitospóricos (anteriormente denominados Deuteromycetes) e compondo o grupo de organismos eucarióticos, leveduras possuem muitos hábitos e características similares aos de bactérias. Trata-se de microrganismos unicelulares, que se reproduzem por fissão binária ou brotamento e que não apresentam corpo de frutificação (FUENTEFRÍA, 2007).

Presentes abundantemente em diversos tipos de substratos, elas são comumente encontradas na microbiota epifítica e/ou endofítica de folhas, casca, frutas, flores, tecidos necróticos, solo e na rizosfera.

Leveduras são BCAs promissores, comumente a fungos fitopatogênicos, graças aos seus diversos mecanismos antagônicos (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006; VALDEBENITO-SANHUEZA, 2000) e por isso, podem competir por nutrientes, colonizar fermentos, desempenhar ação micoparasítica, produzir substâncias antibióticas e/ou degradadoras da parede celular e induzir resistência nas plantas contra agentes patogênicos

(DROBY et al., 2009; EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006; PRENDES et al., 2018; SHARMA et al., 2009; VIANA et al., 2012).

Para El-tarabily e Sivasithamparam (2006), em estudos sobre mecanismos de biocontrole de leveduras, destacam-se os gêneros *Debaryomyces*, *Kloeckera*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Sporobolomyces*, *Metschnikowia*, *Tilletiopsis*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Aureobasidium*, *Pichia* e *Candida*. Pertencentes a esses, destacam-se as espécies *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud; *Cryptococcus albidus* (Saito) C.E. Skinner e *Metschnikowia fructicola* Kurtzman e Droby) que são registradas, em muitos países, como agentes de biocontrole de fitopatógenos como *Botrytis*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Monilia*, *Sclerotinia* e *Erwinia amylovorai* (Burrill) Winslow.

Diante dessa diversidade de mecanismos de ação, que podem ser desempenhados por elas, e da redução dos riscos ambientais de indução de resistência de fitopatógenos, associada a pressão de seleção exercida por ação de agrotóxicos (CAMPOS-MARTÍNEZ et al., 2016; CAO et al., 2013, PAIVA et al., 2017), o uso de leveduras como biocontrolador natural representa uma vantagem ambiental indiscutível sobre os fungicidas sintéticos (BAUTISTA-ROSALES et al., 2013; HERNÁNDEZ-LUZARDO et al., 2007).

A ação biocontroladora de leveduras sobre fungos fitopatogênicos envolve, frequentemente, vários modos de ação, incluindo competição por nutrientes e espaço (CHANCHAICHAOVIVAT et al., 2008; DROBY et al., 2009). Assim como a competição, a inibição do crescimento micelial fúngico, por ação de metabolitos difusíveis e/ou voláteis, é um dos valiosos recursos desempenhado pelas leveduras (HUANG et al., 2011; LUTZ et al., 2013) ou, de forma generalizada, a produção e ação de compostos antimicrobianos (CEUGNIEZ et al., 2015; SHARMA et al., 2009; RUIZ-MOYANO et al., 2016).

A competição nutricional e por nichos específicos, diretamente associada às rápidas capacidades de reprodução e assimilação de nutrientes, é um dos mecanismos antagônicos mais importantes desempenhados por leveduras e, por essa razão, é extensamente estudado (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006). Diversos autores demonstram que, além da ação competitiva em relação a fungos fitopatogênicos, principalmente no biocontrole de frutos em pré-colheita (ZHAO et al., 2011) e em pós-colheita (BELLO et al., 2008; CHANCHAICHAOVIVAT et al., 2008; COELHO et al., 2011; HAÏSSAM, 2011; LAHLALI et al., 2011; MASIH et al., 2001; YU et al., 2012b; ZHANG et al., 2011), certos gêneros de leveduras podem se manter viáveis em diversas condições de estresse (ROBIGLIO et al., 2011; VALDEBENITO-SANHUEZA, 2000).

Segundo Droby et al. (2009), a secreção de substâncias antimicrobianas (solúveis em água ou voláteis) e, talvez, a produção de metabolitos específicos ativos, podem ser induzidas após a interação do antagonista com os tecidos de frutos/plantas. Sobre a gama e natureza da maioria das substâncias antibióticas produzidas por leveduras, sabe-se que esses compostos desempenham importante papel no estabelecimento e manutenção de comunidades de leveduras em diversos ambientes, como por exemplo, acetato de etila, produzido por *Pichia anomala* (E.C. Hansen) Kurtzman 1984, capaz de reduzir o crescimento micelial e germinação de esporos de diversos fungos fitopatogênicos (VALDEBENITO-SANHUEZA, 2000).

Para El-Tarabily e Sivasithamparam (2006) e Coelho et al. (2003), determinadas cepas de leveduras, de vários gêneros tais como *Candida*, *Saccharomyces*, *Sporobolomyces* e *Zygosaccharomyces*, podem apresentar o fator “killer”, proteínas ou glicoproteínas tóxicas, de baixa massa molecular (FUENTEFRÍA, 2007), liberadas no meio de cultivo capaz de inibir fungos filamentosos fitopatogênicos, tais como *Rhizoctonia fragariae* S.S. Husain e W.E. McKeen 1963, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary 1884 e *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. 1947 (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006), *Fusarium oxysporum* Schltdl. 1824 e *B. cinérea* (ROSA et al., 2010). Estas substâncias tóxicas atuam na membrana de células sensíveis, por meio da redução do pH intracelular e extravasamento de íons potássio e ATP.

Quanto à produção de enzimas degradadoras, algumas espécies como *P. anomala*, *P. membranifaciens* (E.C. Hansen) E.C. Hansen 1904, *R. glutinis* (Fresen.) F.C. Harrison 1928, *C. laurentii* (Kuff.) C.E. Skinner 1950, *A. pullulans* (de Bary) G. Arnaud 1918, *Tilletiopsis albescens* Gokhale 1973, e *T. pallescens* Gokhale 1973, têm sido relatadas β-1,3- glucanase, na ação antagônica contra *B. cinerea*, *Penicillium expansum* Link 1809, *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill. 1902, *Aspergillus niger* Tiegh. 1867, *Sphaerotheca fuliginea* (Schltdl.) Pollacci 1911, e *P. xanthii*. A produção de quitinases foi observada em isolados de *A. pullulans*, *T. albescens* e *C. saitoana* Nakase e M. Suzuki 1985, contra isolados de *P. expansum*, *P. xanthii* e *B. cinerea*, respectivamente (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006; ROSA et al., 2010; URQUHART; PUNJA, 2002).

Além das substâncias antibióticas e tóxicas, há relatos de produção de sideróforos, compostos quelantes de íons de ferro, por espécies dos gêneros *Candida* e *Rhodotorula*, promovendo a inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos e conferindo, aos isolados

produtores, vantagens competitivas (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006; ROSA et al., 2010).

A ação parasítica de isolados de leveduras contra fungos fitopatogênicos pode ser observada pela ocorrência de adesão e fixação das células leveduriformes em hifas e/ou esporos do patógeno, indicando uma relação hiperparasítica. Este tipo de interação foi observado em isolados dos gêneros *Candida* sobre *P. digitatum* e *Pichia* sobre *P. italicum* e *B. cinerea*, onde se verificou, além de atividades líticas, a atuação da degradação da parede micelial, dilatação do diâmetro das hifas, lesões e degeneração do protoplasma (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006; MASIH, et al., 2001).

Os relatos sobre a produção de quitinases por *C. saitoana* e peroxidases por *A. pullulans*, em fermentos no tecido de maçãs, sugerem que, indiretamente, isolados de levedura podem reduzir a incidência de doenças atuando como agentes indutores de resistência (HAÏSSAM, 2011) por meio da indução da produção de substâncias, tais como fenilalanina amônia liase, fitoalexinas, peroxidases e etileno, em tecidos vegetais (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006). Essa ativação de resistência pode ocorrer em tecidos de folhas e frutos e, possivelmente, em outros tecidos como os de raízes.

Diversas são as características que conferem às leveduras papel importante, útil e eficiente no biocontrole de doenças em plantas: são de fácil produção e manutenção em condições *in vitro*; podem ser manipuladas a fim de melhorar a utilização e eficácia; possuem fácil adaptação nutricional, em condições prevaletentes desfavoráveis; bem como, alta capacidade de proliferação, até mesmo em baixas temperaturas; também são potenciais colonizadoras de fermentos em tecidos de plantas (ROBIGLIO et al., 2011). Além disso, não produzem esporos que podem acarretar ação alergênica, como no caso de muitos fungos filamentosos; podem colonizar superfícies secas por longos períodos e são capazes de crescer em várias fontes de carbono (GOUVEA, 2007).

Diante das abundantes características favoráveis, leveduras receberam o título de BCAs promissores. Muitos produtos biocontroladores, a base de leveduras, foram registrados contra doenças causadas por fungos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Rhizopus* em diversas commodities: Nexy[®], BioNext[®] e Aspire[®] (*Candida oleophila* Montrocher); Shemer[®] (*Metschnikowia fructicola* Kurtzman & Droby), Yield plus[®] (*Cryptococcus albidus* (Saito) Skiner), Boniprotect[®] (*Aureobasidium pullulans* (de Bary & Löwenthal) G. Arnaud) e Candifruit[®] (*Candida sake* (Saito & M. Ota) Uden & H.R.

Buckley ex S.A. Mey. & Ahearn) (CHANCHAICHAOVIVAT et al., 2008; DROBY et al., 2009; SHARMA et al., 2009; SPADARO; DROBY, 2016).

Entre as muitas espécies estudadas atualmente, a *Meyerozyma caribbica* ((Vaughan-Mart., Kurtzman, S.A. Mey. & E.B. O'Neill) Kurtzman & M. Suzuki), ganha destaque por apresentar alto potencial biotecnológico (N'GUESSAN et al., 2011; SAUCEDO-LUNA et al., 2011). Essa espécie compõe o importante grupo de BCAs a doenças pós-colheita (BAUTISTA-ROSALES et al., 2013; MAHUNU et al., 2016; SPADARO; DROBY, 2016; ZHAO et al., 2012). Esse cenário é favorável e tem impulsionado o registro de novas patentes (DAI et al., 2011; LUO et al., 2013; PRABHUNE et al., 2012; ZHANG et al., 2010).

Essas potencialidades biotecnológicas, a versatilidade adaptativa, bem como a abundância natural, conferem às leveduras posição de destaque, em relação aos demais BCAs. Todo esse potencial tem incrementado substancialmente o interesse ao desenvolvimento de novas pesquisas, a partir de leveduras. A aplicabilidade desses microrganismos é uma realidade, principalmente como alternativa ecologicamente sustentável, passível de aplicação em sistemas de manejo integrado ao controle de fitopatógenos, particularmente àqueles relacionadas a doenças pós-colheita.

Diante da escassez de informações acerca do uso de leveduras como BCAs a doenças que acometem o coqueiro, o presente trabalho possui caráter pioneiro, ao abordar questões sobre o potencial biocontrolador e a aplicação de leveduras no controle de doenças causadas por *Lasiodiplodia* spp. Ele representa base científica relevante para futuras investigações relacionadas aos mecanismos de ação específica, à produção de compostos de interesse biotecnológico, às associações com produtos químicos e formulações, assim como à sua aplicabilidade efetiva nos manejos fitossanitários, em diversos sistemas produtivos e sob diferentes condições ambientais.

Objetivou-se nesse estudo: i) Caracterizar a capacidade patogênica e aspectos epidemiológicos de severidade de espécies de *Lasiodiplodia*, provenientes de coqueirais cultivados nas zonas seca, subúmida e úmida do Nordeste brasileiro; ii) identificar leveduras, provenientes da microbiota dos tecidos de casca e mesocarpo de coco (frutos); iii) investigar os potenciais biocontroladores dessas leveduras sobre *L. theobromae* e *L. pseudotheobromae* *in vitro* e sobre a podridão basal em coco-anão-verde.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANJOS, J. P.; ANDRADE, J. B. Determination of nineteen pesticides residues (organophosphates, organochlorine, pyrethroids, carbamate, thiocarbamate and strobilurin) in coconut water by SDME/GC–MS. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 112, p. 119–126, 2014.
- ARAGÃO, F. B.; LOIOLA, C. M.; CAMBUI, E. V. F.; ARAGÃO, W. M. **Produção de Água de Coco de Cultivares de Coqueiro Verde**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2005. 2 p. (Comunicado Técnico, 42).
- ARAGÃO, W. M. Cultivares de coqueiros. In: FONTES, H. R.; FERREIRA, J. M. S.; SIQUEIRA, L. A. (Ed.). **A cultura do coqueiro**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2007. (Sistemas de Produção, 1).
- ARAÚJO, J. C. A.; PEREIRA, J. C. R.; GASPAROTTO, L. **Murcha-de-Phytopomonas do Coqueiro no Amazonas**. Manaus: EMBRAPA-CPAA, 2003. 6 p. (Circular Técnica, 17).
- BALLESTER-TOMÁS, L., PRIETO, J. A., GIL, J. V., BAEZZA, M., RANDEZ-GIL, F. The Antarctic yeast *Candida sake*: Understanding cold metabolism impact on wine. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 245, p. 59-65, 2017.
- BAUTISTA-ROSALES, P. U.; CALDERON-SANTOYO, M.; SERVÍN-VILLEGAS, R.; OCHOA-ÁLVAREZ, N. A.; RAGAZZO-SÁNCHEZ, J. A. Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. **Biological Control**, San Diego, v. 65, p. 293-301, 2013.
- BEAKBANE, A. B.; SLATER, C. H. W.; POSNETTE, A. F. Mycoplasmas in the phloem of coconut *Cocos nucifera* L. with lethal yellowing disease. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Kent, v. 47, p. 265, 1972.
- BELLO, G. D.; MÓNACO, C.; ROLLAN, M. C.; LAMPUGNANI, G.; ARTETA, N.; ABRAMOFF, C.; RONCO, L.; STOCCO, M. Biocontrol of postharvest grey mould on tomato by yeasts. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 156, p. 257-263, 2008.
- BRITO, N. M.; NAVICKIENE, S.; POLESE, L.; JARDIM, E. F. G.; ABAKERLI, R. B.; RIBEIRO, M. L. Determination of pesticide residues in coconut water by liquid–liquid extraction and gas chromatography with electron-capture plus thermionic specific detection and solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 957, p. 201–209, 2002.
- CAMPOS-MARTÍNEZ, A.; VELÁZQUEZ-DEL VALLE, M. G.; FLORES-MOCTEZUMA, H. E.; SUÁREZ-RODRÍGUEZ, R.; RAMÍREZ-TRUJILLO, J. A.; HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A. N. Antagonistic yeasts with potential to control *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. and *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds on avocado fruits. **Crop Protection**, Oxon, v. 89, p. 101-104, 2016.

- CAO, J.; ZHANG, H.; YANG, Q.; REN, R. Efficacy of *Pichia caribbica* in controlling blue mold rot and patulin degradation in apples. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 162, p. 167-173, 2013.
- CARVALHO, J. M.; MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; MAIA JR, G. A. Água-de-coco: Propriedades nutricionais, funcionais e processamento. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 3, p. 437-452, 2006.
- CEUGNIEZ, A.; DRIDER, D.; JACQUES, P.; COUCHENEY, F. Yeast diversity in a traditional French cheese “Tomme d'orchies” reveals infrequent and frequent species with associated benefits. **Food Microbiology**, Amsterdam, v. 52, p. 177-184, 2015.
- CHANCHAICHAOVIVAT, A.; PANIJPAN, B.; RUENWONGSA, P. Putative modes of action of *Pichia guilliermindii* strain R13 in controlling chilli anthracnose after harvest. **Biological Control**, San Diego, v. 47, p. 207-215, 2008.
- COELHO, A. R.; HOFFMANN, F. L.; HIROOKA, E. Y. biocontrole de doenças pós-colheita de frutas por leveduras: perspectivas de aplicação e segurança alimentar. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 337-358, jul./dez.2003.
- COELHO, A. R.; NÓBREGA, G. M. de A.; PAGNOCCA, F. C.; HOFFMANN, F. L.; HARADA, K.; HIROOKA, E. Y. Avaliação do potencial antagônico de leveduras, visando biocontrole de deterioração por *Penicillium expansum*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, supl. 1, p. 1879-1892, 2011.
- CORRADINI, E.; ROSA, M. F.; MACEDO, B. P.; PALADIN, P. D.; MATTOSO, L. H. C. Composição química, propriedades mecânicas e térmicas da fibra de frutos de cultivares de coco verde. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 3, p. 837-846, 2009.
- CORREIA, M. S.; COSTA, J. L. DA S. Dispersão Anemófila do Fungo *Lasiodiplodia theobromae* em Plantações de Coqueiro. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 30, n. 2, p. 150-154, 2005.
- CUENCA, M. A. G. Importância econômica do coqueiro. In: FERREIRA, J. M. S.; WARWICK, D. R. N.; SIQUEIRA, L. A. **A cultura do coqueiro no Brasil**. Brasília: Embrapa-SPI, 1997. cap.4, p. 73-98.
- DAI, C.; LIU, W.; REN, X.; ZHANG, H.; ZHANG, X.; ZHAO, L.; ZHU, S. Univ Jiangsu (Uyji-non-standard). Improving efficacy of *Pichia pastoris* on disease biological control involves activating *Pichia caribbica* yeast, culturing by nutrient yeast trehalose broth culture medium, centrifuging, and putting fruit in bacterial suspension. China patente [CN102283281-A](#). Jun 2011.
- DROBY, S.; WISNIEWSKI, M.; MACARISIN, D.; WILSON, C. Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 52, p. 137-145, 2009.

EL-TARABILY, K. A.; SILVASITHAMPARAM, K.; Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plants growth promoters. **Mycoscience**, Tokyo, v. 47, p. 25-35, 2006.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOStats. Acesso em: 10 de janeiro de 2018. <http://www.FAOStats.org/FAOStatsstat/en/#data/QC>

FERRAZ, L. G. B.; ARAGÃO, W. M.; SILVA, D. A.; NASCIMENTO, J. C. B.; SILVA FFILHO, J. S. Coqueiro ‘anão-verde’ (*Cocos nucifera* L.). In: Instituto Agrônômico de Pernambuco. **Cultivares recomendadas pelo IPA para a Zona da Mata de Pernambuco**. Recife: Instituto de Pesquisa Agropecuária de Pernambuco, 2009a. p. 99-106.

FERRAZ, L. G. B.; SILVA, A. B.; NUNES FILHO, J.; SOUSA, A. R.; SANTOS, V. F. Sugar cane cake and mineral fertilizers on coconut (*Cocos nucifera* Linn.) seedlings. **Cord**, Jakarta, v.25, n.2, p.45-55, 2009b.

FERRAZ, L. G. B.; COELHO, R. S. B.; CAVALCANTI, V. A. L. B.; ASSIS, T. C., ANDRADE, D. E. G. T.; LACERDA, F. F. Nova doença letal ao coqueiro no Brasil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 38, (Suplemento), p. 583, 2012.

FERREIRA NETO, M.; GHEYI, H. R.; HOLANDA, J. S.; MEDEIROS, J. F.; FERNANDES, P. D. Qualidade do fruto verde de coqueiro em função da irrigação com água salina. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.6, n.1, p.69-75, 2002.

FERREIRA, J. M. S.; LIMA, M. F.; SANTANA, D. L. Q.; MOURA, J. I. L.; Pragas do Coqueiro. In: WARWICK, D.R.N.; SIQUEIRA, L.A.; (eds.). **Cultura do coqueiro no Brasil**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 1998. p. 205-280.

FERREIRA NETO, M.; GHEYI, H. R.; FERNANDES, P. D.; HOLANDA, J. S.; BLANCO, F. F. Emissão foliar, relações iônicas e produção do coqueiro irrigado com água salina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 6, p. 1675-1681, 2007.

FONTES, H. R.; WANDERLEY, M. **Situação atual e perspectivas para a cultura do coqueiro no Brasil**. Aracajú: EMBRAPA-CPATC, 2006. 16 p.

FUENTEFRÍA, A. M. **Bioprospeção de leveduras *killer* com potencial para aplicação em biotipagem de microrganismos patogênicos humanos**. 2007, 144 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2007.

GOMES, R.P. **O coqueiro-da-baía**. 2ª ed., São Paulo: Nobel, 1977. 111 p.

GOUVEA, A. **Controle em campo e pós-colheita de doenças e metabolismo do morangueiro após tratamento com *Saccharomyces cerevisiae***. 2007, 85 f. Tese (Doutorado em fitotecnia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

- HAÏSSAM, J. M. *Pichia anomala* in biocontrol for apples: 20 years of fundamental research and practical applications. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 99, p. 93-105, 2011.
- HALFELD-VIEIRA, B.; NECHET, K. L. Queda de Frutos em Coqueiro Causada por *Lasiodiplodia theobromae* em Roraima. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 2, p. 203, 2005.
- HARRISON, N. A.; DAVIS, R. E.; OROPEZA, C.; HELMICK, E. E.; NARVÁEZ, M.; EDEN-GREEN, S.; DOLLET, M.; DICKINSON, M. 'Candidatus Phytoplasma palmicola', associated with a lethal yellowing-type disease of coconut (*Cocos nucifera* L.) in Mozambique. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 64, p. 1890–1899, 2014.
- HERNÁNDEZ-LUZARDO, A. N.; BAUTISTA-BAÑOS, S., VELÁZQUEZ-DEL-VALLE, M. G., HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, A. Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. **Revista Mexicana de Fitopatología**, Montecillo, v. 25, p. 66–74, 2007.
- HOLANDA, J. S.; ALVES, M. C. S.; CHAGAS, M. C. M. **Cultivo do coqueiro no Rio Grande do Norte**. Natal: EMPARN, 2008. 27 p.
- HUANG, R.; LI, G. Q.; ZHANG, J.; YANG, L.; CHE, H. J.; JIANG, D. H.; HUANG, H. C. Control of postharvest *Botrytis* fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of *Candida intermedia*. **Phytopathology**, St Paul, v. 101, p. 859–869, 2011.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. SIDRA 2016: Sistema IBGE de recuperação automática [on line]. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2016. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613>>. Acesso em: 20 jan. 2018.
- LAHLALI, R.; HAMADI, Y.; EL GUILLI, M.; JIJAKLI, M. H. Efficacy assessment of *Pichia guilliermondii* strain Z1, a new biocontrol agent, against citrus mold in Morocco under the influence of temperature and relative humidity. **Biological Control**, Orlando, v. 56, p. 217-224, 2011.
- LEAL, M. L. S.; WARWICK, D. R. N. A amostragem na avaliação das lixas-do-coqueiro. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 35, n. 9, p. 1717-1723, 2000.
- LUO, X.; WANG, Y.; SHEN, Y.; ZHENG, Y.; CHENG, J. Univ Zhejiang Ind (UYZI). New microbial strain, preferably *Pichia caribbica* ZJB-09225 having high stereoselective carbonyl reduction enzyme activity, useful for preparing tert-butyl-6-cyano-(3R,5R)-dihydroxy-t-butyl hexanoate. China patente [CN103122320-A](https://patents.google.com/patent/CN103122320-A). Jan 2013.
- LUTZ, M. C.; LOPES, C. A.; RODRIGUEZ, M. E.; SOSA, M. C.; SANGORRÍN, M. P. Efficacy and putative mode of action of native and commercial antagonistic yeasts against postharvest pathogens of pear. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 164, p. 166–172, 2013.

MAGALHÃES, M. P.; GOMES, F. S.; MODESTA, R. C. D.; MATTA, V. M.; CABRAL, L. M. C. Conservação de água de coco verde por filtração com membrana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 72-77, 2005.

MAHUNU, G. K.; ZHANG, H.; YANG, Q.; ZHANG, X.; LI, D.; ZHOU, Y. Improving the biocontrol efficacy of *Pichia caribbica* with phytic acid against postharvest blue mold and natural decay in apples. **Biological Control**, San Diego, v. 92, p. 172-180, 2016.

MARTINS, C. R.; JESUS JÚNIOR, L. A. **Evolução da produção de coco no Brasil e o comércio internacional: panorama 2010**. Aracajú: EMBRAPA-CPATC, 2011. 28 p. (Documentos, 164).

MASIH, E. I.; SLEZACK-DESCHAUMES, S.; MARMARAS, I.; AIT BARKA, E.; VERNET, G.; CHARPENTIER, C.; ADHOLEYA, A.; PAUL, B. Characterization of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*, causing the grey mold disease of grapevine. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 202, p. 227-232, 2001.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários: AGROFIT**. Brasília, 2018. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 10 Jan. 2018.

MONTEIRO, C. M.; CARON, E. S.; SILVEIRA, S. F.; ALMEIDA, AL. M.; SAOUZA-FILHO, G. R.; SOUZA, A. L. Control of foliar diseases by the axillary application of systemic fungicides in Brazilian coconut palms. **Crop Protection**, Oxon, v. 52, p. 78-83, 2013.

NAMBIAR, K. K. N.; JOSHI, Y.; VENUGOPAL, M. N.; MOHAN, D. R. C. Stem bleeding disease of coconut: reproduction of symptoms by inoculation with *Thielaviopsis paradoxa*. **Journal of Plantation Crops**, Kerala, v. 14, n. 2, p. 130-133, 1986.

NAMBIAR, K. K. N.; KUMAR, A.; SASTRY, K.; JOSHI, Y. Seasonal effect on infestation by coconut stem bleeding pathogen. *Thielaviopsis paradoxa*. **Current Science**, Bangalore, v. 58, n. 1, p. 34-35, 1989.

N'GUESSAN, K. F.; BROU, K.; JACQUES, N.; CASAREGOLA, S.; DJE, K. M. Identification of yeast during alcoholic fermentation of tchapalo, a traditional sorghum beer from Côte d'Ivoire. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 99, p. 855-864, 2011.

PAIVA, E.; SERRADILLA, M. J.; RUIZ-MOYANO, S.; CÓRDOBA, M. G.; VILLALOBOS, M. C. Combined effect of antagonistic yeast and modified atmosphere to control *Penicillium expansum* infection in sweet cherries cv. Ambrunés. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 241, p. 276-282, 2017.

PARAFATI, L.; VITALE, A.; RESTUCCIA, C. CIRVILLERI, G. Biocontrol ability and actions mechanism of food-isolates yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. **Food Microbiology**, Amsterdam, v. 47, p. 85-92, 2015.

PIRES, M. M.; COSTA, R. S.; SÃO JOSÉ, A. R.; MIDDLEJ, M. M. B. C.; ALVES, J. M. A. CULTURA DO COCO: UMA ANÁLISE ECONÔMICA. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 173-176, 2004.

PRABHUNE, A. A.; JOSHI, K. L.; MUKHERJI, R. A. Council Sci & Ind Res India (COUI). Room temperature fermentation to synthesize crystalline xylitol which acts as quorum sensing inhibitor, comprises e.g. inoculating cells of strain *Pichia caribbica* BY2 in malt extract xylose yeast extract and peptone medium and incubating. Índia patentes [WO2014013506-A1 e IN201202190-II](#). Jul 2012

PRADES, A.; DORNIER, M.; DIOP, N.; PAIN, J. Coconut water uses, composition and properties: a review. **Fruits**, Leuven, v. 67, n. 2, p. 87-107, 2012.

PRADES, A.; SALUM, U. N.; PIOCH, D. New era for the coconut sector. What prospects for research? **Oilseeds and fats, Crops and Lipids**, Les Ulis, v. 23, n. 6, p. D607, 2016.

PRENDES, L. P.; MERÍNA, M. G.; FONTANAC, A. R.; BOTTINIC, R. A.; RAMIREZ, M. L.; AMBROSINIA, V. I. M. Isolation, identification and selection of antagonistic yeast against *Alternaria alternata* infection and tenuazonic acid production in wine grapes from Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 266, p. 14-20, 2018.

ROBIGLIO, A.; SOSA, M. C.; LUTZ, M. C.; LOPES, C. A.; SANGORRÍN, M. P. Yeast biocontrol of fungal spoilage of pears stored at low temperature. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 147, p. 211-216, 2011.

ROSA, M. M.; TAU-K-TORNISIELO, S. M.; RAMPAZZO, P. E.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Evaluation of the biological control by yeast *Torulasporea globosa* against *Colletotrichum sublineolum* in sorgum. **World Journal Microbiol Biotechnol**, Berlin, v. 26, p. 1491-1502, 2010.

ROSADO, A. W. C.; MACHADO, A. R.; FREIRE, F. C.; PEREIRA, O. L. Phylogeny, identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia* associated with postharvest stem-end rot of coconut in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 100, n. 3, p. 561-568, 2016.

RUIZ-MOYANO, S.; MARTÍN, A.; VILLALOBOS, M. C.; CALLE, A.; SERRADILLA, M. J.; CÓRDOBA, M. G.; HERNÁNDEZ, A. Yeasts isolated from figs (*Ficus carica* L.) as biocontrol agents of postharvest fruit diseases. **Food Microbiology**, London, v. 57, p. 45-53, 2016.

SAUCEDO-LUNA, J.; CASTRO-MONTOYA, A. J.; MARTÍNEZ-PACHECO, M. M.; SOSA-AGUIRRE, C. R.; CAMPOS-GARCÍA, J. Efficient chemical and enzymatic saccharification of the lignocellulosic residue from Agave tequilana bagasse to produce ethanol by *Pichia caribbica*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 38, p. 725-732, 2011.

SHARMA, R. R.; SINGH, D.; SINGH, R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review. **Biological Control**, San Diego, v. 50, p. 205-221, 2009.

- SILVA, G. G. **Desenvolvimento e qualidade da água de frutos de cultivares de coqueiro anão**. 2006, 124 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Federal da Paraíba, Areia.
- SILVA, J. M.; TALAMINI, V.; RAMOS, S. R. R.; FERREIRA, J. M. S. SANTOS, J. M. S. M.; FERNANDES, M. F. Evaluation of dwarf coconut (*Cocos nucifera* L.) germplasm to the damage intensity caused by foliar diseases. **Australian Journal of Crop Science**, Lismore, v. 11, n. 10, p. 1374-1380, 2017.
- SIQUEIRA, L. A.; ARAGÃO, W. M.; TUPINAMBÁ, E. A. **A Introdução do coqueiro no Brasil, importância histórica e agrônômica**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2002. 24 p. (Documentos, 47).
- SIQUEIRA, E. R.; RIBEIRO, F. E.; ARAGÃO, W. M.; TUPINAMBÁ, E. A. Melhoramento genético do coqueiro. In: FERREIRA, J. M. S.; WARWICK, D. R. N.; SIQUEIRA, L. A. **A cultura do coqueiro no Brasil**. Brasília: Embrapa-SPI, 1997. cap.4, p. 73-98.
- SOUSA, F. W.; MOREIRA, S.; OLIVEIRA, A. G.; CAVALCANTE, R. M.; NASCIMENTO, R. F.; ROSA, M. F. Uso da casca de coco verde como adsorvente na remoção de metais tóxicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1153-1157, 2007.
- SPADARO, D.; DROBY, S. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 47, p. 39-49, 2016.
- TALAMINI, V.; FERREIRA, J. M. S.; RAMOS, S. R. R. **Incidência e severidade da queima das folhas em cultivares de coqueiro em Pernambuco**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2013. 14 p. (Circular Técnica 81).
- VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. Leveduras para o biocontrole de fitopatógenos. In: MELO, I.S. de; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle biológico**, Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. p.41-55.
- VIANA, F. M. P.; FREIRE, F. C. O.; BARGUIL, B. M.; ALVES, R. E.; SANTOS, A. A.; CARDOSO, J. E.; VIDAL, J. C. Podridão basal pós-colheita do coco verde no estado do Ceará. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 5, p. 545, 2002.
- VIANA, F. M. P.; UCHÔA, C. N.; FREIRE, F. C. O.; VIEIRA, I. G. P.; MENDES, F. N. P.; SARAIVA, H. A. O. **Tratamento do coco verde para exportação com ênfase no controle da podridão-basal-pós-colheita**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 30 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 29).
- WARWICK, D. R. N. **Principais Características do Anel-vermelho e Murcha-de-fitomonas**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2005. 8 p. (Comunicado Técnico 38).
- WARWICK, D. R. N.; ABAKERLI, R. B. Chemical control of Lixas and leaf blight disease of coconut. **Palms**, Austin, v.45, n. 4, p. 168-170, 2001.

WARWICK, D. R. N.; PASSOS, E. E. M. Outbreak of stem bleeding coconuts caused by *Thielaviopsis paradoxa* in Sergipe, Brazil. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 34, n. 3, p. 175-177, 2009.

WARWICK, D. R.; TALAMINI, V. Doenças e métodos de controle ajustados à baixa capacidade de investimento dos pequenos produtores rurais. In: CINTRA, F. L. D.; FONTES, H. R.; PASSOS, E. E. M.; FERREIRA, J. M.S. (Org.). **Fundamentos tecnológicos para a revitalização das áreas cultivadas com coqueiro gigante no Nordeste do Brasil**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2009. p. 157-190.

YU, T.; YU, C.; CHEN, F.; SHENG, K.; ZHOU, T.; ZUNUN, M.; ABUDU, O.; YANG, S. Integrate control of blue mold in pear fruit by combined application of chitosan, a biocontrol yeast and calcium chloride. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 69, p. 49-53, 2012.

ZENG, L.; YU, C.; FU, D.; LU, H.; ZHU, R.; LU, L.; ZHENG, X.; YU, T. Improvement in the effectiveness of *Cryptococcus laurentii* to control postharvest blue mold of pear by its culture in β -glucan amended nutrient broth. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 104, p. 26-32, 2015.

ZHANG, X.; ZHANG, H.; REN, X.; PANG, S. Univ Jiangsu (Uyji-non-standard). New *Pichia caribbica* useful for preventing the plant disease after harvesting the fruits, and storing and retaining the freshness of pear, peach, strawberry and apple. China patents CN101899400-A e CN101899400-B. Jun 2010.

ZHANG, D.; SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L. Potential biocontrol activity of a strain of *Pichia guilliermondii* against grey mold of apples and its possible modes of action. **Biological Control**, Orlando, v. 57, p. 193-201, 2011.

ZHAO, Y.; WANG, R. TU, K.; LIU, K. Efficacy of preharvest spraying with *Pichia guilliermondii* on postharvest decay and quality of cherry tomato fruit during storage. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 47, p. 9613-9622, 2011.

CAPÍTULO II

Espécies de *Lasiodiplodia* associadas a queima das folhas de coqueiro e podridão basal de coco, no Nordeste do Brasil

1 **Espécies de *Lasiodiplodia* associadas a queima das folhas de coqueiro e podridão basal**
2 **de coco, no Nordeste do Brasil**

3

4 Iwanne Lima Coelho^{1,*}, Tereza Cristina de Assis², Luiz Gonzaga Biones Ferraz², Moisés
5 Thiago de Souza Freitas³, Valdir de Queiroz Balbino³, Willie Anderson dos Santos Vieira¹,
6 Marcos Paz Saraiva Câmara¹ e Delson Laranjeira^{1,*}

7

8 ¹Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,
9 Dois Irmãos, CEP: 52171-900, Recife-PE, Brasil.

10 ²Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA), Av. General San Martin, 1371, Bongi, CEP:
11 50761-00, Recife-PE, Brasil.

12 ³Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade
13 Universitária, CEP: 50670-901, Recife-PE, Brasil.

14 *Autores correspondentes: Endereço de E-mail: iwannecoelho@gmail.com (Iwanne Lima
15 Coelho) e delson.laranjeira@ufrpe.br (Delson Laranjeira).

16

17 **Resumo** O crescente aumento na demanda do mercado de água de coco tem alavancado a
18 nucicultura brasileira. No tocante à exploração do coqueiro-anão-verde, elevadas perdas
19 econômicas, decorrentes da queima das folhas e podridão basal de frutos, causadas por
20 *Lasiodiplodia* spp, são fatores prejudiciais à essa exploração. Devido à distribuição
21 cosmopolita e capacidades patogênicas, endofíticas e saprofíticas de *Lasiodiplodia* spp, o
22 manejo fitossanitário dessas doenças é bastante complexo, dispendioso e depende,
23 prioritariamente, do uso massivo de produtos químicos. A tomada de decisão sobre medidas
24 de manejo cabíveis depende da adequada identificação do patógeno alvo. Neste trabalho, a
25 capacidade patogênica e aspectos de severidade epidemiológica, desempenhados por

26 isolados de *Lasiodiplodia*, provenientes de coqueirais cultivados nas zonas seca, subúmida
27 e úmida dos estados de Paraíba e Pernambuco, Nordeste brasileiro, foram abordados da
28 inoculação direta de estruturas fúngica em coco-anão-verde. As relações filogenéticas entre
29 esses isolados, foi determinada por comparação de sequências amplificadas e combinadas
30 das regiões gênicas *tefl-α*, ITS, *tub2* e *rpb2*. Patogênicas ao coqueiro, constatou-se a
31 abundância natural de três espécies previamente relatadas: *L. brasiliensis*, *L.*
32 *pseudotheobromae* e *L. theobromae*; e de *L. subglobosa*, relatada neste trabalho. *L.*
33 *theobromae* foi identificada em cultivos presentes em todas as três zonas avaliadas, enquanto
34 *L. pseudotheobromae* foi relatada apenas na zona seca de Pernambuco. Todos os isolados
35 foram patogênicos a coco-anão-verde, sendo que *L. theobromae* e *L. pseudotheobromae*
36 mostraram-se mais virulentos. Estes resultados representam o primeiro relato de *L.*
37 *pseudotheobromae* oriundos de coqueirais nordestinos e de *L. subglobosa* como agente
38 causal da podridão basal em coco-anão-verde.

39

40 Palavras-chave: Botryosphaeriaceae, *Cocos nucifera*, coco-anão-verde, doenças do
41 coqueiro, filogenia multilocus, severidade

42

43 **Introdução**

44 Distribuído em todas as regiões tropicais do planeta, em área explorada de
45 aproximadamente 12 milhões de hectares, o coqueiro (*Cocos nucifera* L.) pode ser
46 considerado economicamente a palmeira mais importante (Monteiro et al. 2013). Em 2014,
47 a produção mundial de coco gerou renda de, aproximadamente, 10 bilhões de dólares, deles
48 703 milhões foram atribuídos aos 2,9 milhões de toneladas de coco produzidos no Brasil
49 (FAOStats 2016). Em 2016, mesmo após leve declínio, estima-se que a renda proveniente
50 da produtividade mundial, cerca de 59 milhões de toneladas de coco, tenha sido superior e

51 que o Brasil, responsável por aproximadamente 4,5% dessa produção mundial, deteve
52 rendimentos equivalentes a produção de 2,6 milhões de toneladas de frutos (FAOStats
53 2016), destinados, em grande parte, ao consumo *in natura* e/ou industrialização de
54 alimentos, com mais de 100 produtos e subprodutos (Holanda et al. 2008, Prades et al. 2016).

55 A região Nordeste, responde por aproximadamente 1,36 milhão de toneladas de frutos
56 produzidos, equivalente a 76,7% da produção nacional, liderada pelos Estados da Bahia,
57 Ceará e Sergipe. No cenário produtivo, Pernambuco tem ganhado destaque, com
58 rendimentos produtivos quase três vezes maiores, comparados a média regional nordestina
59 de 6960 kg de frutos ha⁻¹ (IBGE 2016).

60 Nos últimos anos, o crescente aumento na demanda no mercado de água de coco
61 motivado, principalmente, pela injeção de investimentos feitos por grandes empresas
62 agrícolas e agroindustriais nesse setor (Cavalcante 2015), é um dos principais fatores que
63 alavancaram a cocoicultura brasileira (Martins e Jesus Jr. 2011, Prades et al. 2016), que
64 apresentou na última década, um incremento na economia nacional de aproximadamente 212
65 milhões de dólares (FAOStats 2016).

66 Nesse contexto, o coqueiro-anão-verde alcança destaque por ser preferencialmente
67 recomendado à produção de água, em virtude da precocidade produtiva e das qualidades
68 sensoriais superiores em relação à água proveniente de frutos das demais cultivares (Ferraz
69 et al. 2009a, Silva et al. 2017).

70 Apesar dos notáveis rendimentos, a produtividade de coco-verde, em cultivos de
71 coqueiro anão, pode ser considerada limitada (Warwick e Passos 2009), quando comparada
72 ao potencial produtivo dessa cultivar aos sete anos de idade sob condições de irrigação e
73 manejo adequado de doenças (Ferraz et al. 2009a, b).

74 *Lasiodiplodia* spp. (Ascomycota, Pezizomycotina, Dothideomycetes, Dothid. Incertae
75 sedis Botryosphaerales, Botryosphaeriaceae) é um dos fitopatógenos de maior importância

76 ao coqueiro. Relatado no Brasil pela primeira vez em 1975, associada a queima das folhas
77 em coqueirais no estado de Sergipe (Sousa Filho et al. 1979), esse fungo está associado a
78 elevadas perdas econômicas decorrentes da queima das folhas (Monteiro et al. 2013,
79 Talamini et al. 2013) e podridão basal de frutos (Rosado et al. 2016, Viana et al. 2002).

80 Sem os devidos manejos fitossanitários, a queima das folhas progride de lesões
81 necróticas iniciais até a necrose foliar completa, culminando com a morte e queda precoce
82 dessas folhas e, conseqüentemente, dos cachos de frutos imaturos sustentados por elas (Silva
83 et al. 2017). Em contrapartida, nos frutos de cachos remanescentes, o fungo pode apresentar-
84 se colaescente, e causar podridões necróticas em pré e pós-colheita (Halfeld-Vieira e Nechet
85 2005).

86 O gênero *Lasiodiplodia* tem distribuição cosmopolita, relatado como agente causal de
87 muitas doenças e com ampla gama de hospedeiros, capaz de colonizar praticamente todos
88 os tipos de tecidos vegetais (Alves et al. 2008, Cruywagen et al. 2017) e ainda sobreviver,
89 em alguns casos, como endofítico ou saprofítico (Yang et al. 2017). Logo, o
90 desenvolvimento de medidas de controle eficientes configura-se umas das maiores barreiras
91 para o manejo fitossanitário dessas espécies.

92 A aplicação de técnicas, ferramentas moleculares e uso de marcadores apropriados,
93 além de elucidar adequadamente as relações filogenéticas em *Lasiodiplodia*, associada aos
94 mais diversos patossistemas, têm possibilitado a identificação e descrição de novas espécies
95 (Alves et al. 2008, Cruywagen et al. 2017, Dissanayake et al. 2016, Netto et al. 2014, Poletto
96 et al. 2016). No Brasil, estudos recentes revelaram o envolvimento de quatro espécies de
97 *Lasiodiplodia* responsáveis pela podridão basal de coco, antes atribuída apenas a *L.*
98 *theobromae*, (Rosado et al. 2016).

99 Considerando-se os sistemas de manejo baseados no uso massivo de produtos
100 químicos, como no caso da nucicultura brasileira (Monteiro et al. 2013, Warwick e Abakerli

101 2001), e os problemas fitossanitários, como o surgimento de resistência microbiológica
102 provocados pelo uso de dosagem imprópria de agrotóxicos (Cavalcante et al. 2014, Talamine
103 et al. 2013), a tomada de decisão sobre possíveis medidas de manejo parte, primordialmente,
104 da identificação correta do organismo patogênico alvo (Rosado et al. 2016).

105 Diante da expressão produtiva do Nordeste no mercado nacional de coco, das perdas
106 econômica causadas por *Lasiodiplodia* spp. em cultivos comerciais e da pequena
107 representatividade de isolados nordestinos pertencentes a esse gênero e fitopatogênicos ao
108 coqueiro, esse trabalho aborda aspectos relacionados a filogenia e epidemiologia de isolados
109 de *Lasiodiplodia* provenientes de coqueirais do Nordeste brasileiro.

110

111 **Material e Métodos**

112 **Obtenção de isolados.** Folhas e frutos sintomáticos foram coletados durante o período de
113 fevereiro de 2015 a fevereiro de 2016 em cultivos comerciais de coqueiro estabelecidos em
114 diferentes zonas climáticas (Köppen 1931) nos estados de Pernambuco: municípios: Goiana,
115 Ilha de Itamaracá, Igarassu e Vitória de Santo Antão (zona úmida), Bonito e Bom Jardim
116 (zona subúmida) e Petrolina (zona seca) e municípios na Paraíba: Pitimbu e Lucena (zona
117 úmida) e Sousa (zona seca), localizados na região Nordeste do Brasil (Fig. 1).

118 No laboratório de Fungos de Solo - LAFSOL (Departamento de Agronomia/Setor
119 Fitossanidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco) fragmentos de tecidos (7 mm),
120 retirado da transição entre tecido assintomático e necrótico, foram desinfestados
121 superficialmente utilizando álcool 70% por 30 seg, seguido de NaOCl 1% por 1 min e
122 remoção de resíduos em água destilada esterilizadas – ADE por duas vezes. Os fragmentos
123 foram secos em papel filtro qualitativo estéril (Ø 9 cm, 80 g de gramatura) e plaqueados em
124 meio de cultivo batata dextrose agar – BDA (Kasvi[®], São José dos Pinhais, Brasil) acrescido
125 de Cloranfenicol 5 mg l⁻¹.

126 Após incubação a 28 ± 2 °C por quatro dias, colônias que apresentaram características
127 típicas de Botryophaeiaceae (Phillips 2004) foram repicadas (discos cilíndricos Ø 5 mm),
128 transferidas para novas placas contendo BDA e incubadas por 15 dias. Posteriormente,
129 fragmentos cilíndricos do novo cultivo foram incubados por 24 h em meio ágar-água - AA
130 e, com auxílio de hematorite capilar (CNWTC[®], Chongqing, China), sob estereomicroscópio
131 (Carl Zeiss, Berlim, Germany), micro fragmentos da ponta de hifa das estruturas fúngicas
132 foram removidos e depositados em placas de Petri BDA para obtenção de cultivos puros,
133 com características morfológicas típicas do gênero.

134 Todos os isolados obtidos foram acondicionados a 10 °C em tubos criogênicos
135 graduados de rosca externa (Kasvi[®], São José dos Pinhais, Brasil), preservados pelo método
136 Castellani (1963) e depositados na Coleção de Fungos de Solo - CFS do Laboratório Fungos
137 de Solo – LAFSOL da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE e, as culturas
138 representativas, depositadas na Coleção de Culturas Pe. Herbário Camille Torrand (URM)
139 da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE.

140 **Extração de DNA, PCR e sequenciamento.** Os isolados foram cultivados em BDA
141 por oito dias a 28 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 12 h. Todo o material de crescimento micelial
142 foi raspado da superfície do meio e o DNA genômico foi extraído utilizando o protocolo
143 descrito por Murray e Thompson (1980), com pequenas modificações. As concentrações de
144 DNA foram quantificadas em espectrofotômetro NanoPhotometer UV/Vis (IMPLEN,
145 Korea) e diluídas para 25 ng / µL para reações de PCR.

146 A região de Fator de Elongação 1- α (*tefl- α*), utilizando primers EF1-688F (5'-
147 CGGTCACCTTGATCTACAAGTGC-3') e EF1-1251R (5'-
148 CCTCGAACTCACCAGTACCG-3'), foi amplificada para todos os isolados utilizados
149 (Alves et al. 2008). Essa região é indicada à identificação preliminar das espécies
150 pertencentes ao gênero *Lasiodiplodia* e para estimar a diversidade de haplótipos entre os

151 isolados, utilizando o Software DnaSP 4.0 (Rozas et al. 2003). Após agrupamento de
152 isolados segundo seus haplótipos, selecionou-se representantes de cada grupo, segundo
153 critério de origem geográfica dos isolados, e amplificou-se a região do espaço de transcrição
154 interna 1 e 2, incluindo o gene 5.8S rRNA (ITS), com ITS1 (5'-
155 TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White
156 et al. 1990), marcador indicado, concatenado aos marcadores de *tef1- α* , para distinguir
157 espécies de *Lasiodiplodia*, em análises multilocus.

158 Objetivando-se de reduzir o número final de isolados, realizou-se nova seleção de
159 isolados, escolhidos ao acaso a partir das análises concatenando-se de *tef1- α* e ITS, para
160 amplificação das regiões β -tubulina (*tub2*) e RNA polimerase subunidade II (*rpb2*). As
161 últimas foram amplificadas utilizando os primers Bt2a (5'-
162 GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') e Bt2b (5'-
163 ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3') (Glass e Donaldson 1995) e *rpb2*-LasF (5'-
164 GGTAGCGACGTCACCTCCT-3') e *rpb2*-LasR (5'-GCGCAAATACCCAGAATCAT-3')
165 (Cruywagen et al. 2016), respectivamente, e as sequencias obtidas utilizadas em nova análise
166 multilocus, totalizando quatro regiões gênicas.

167 As ampliações via PCR foram preparadas em reações com volume final de 25 μ l
168 contendo: 2 μ l de DNA tamplate, 1 U Platinum® Taq DNA Polymerase; 2,5 μ l 10X PCR
169 Buffer; 2 μ l magnesium chloride 50 mM; 2,5 μ l nucleotídeo mix (Thermo Scientific,
170 Waltham, USA); 2 μ l de cada primer forward e reverse, a 10 μ M (sintetizados por
171 Invitrogen™, Carlsbad, USA), 1 μ l de dimethyl sulfoxide - DMSO (Synth, São Paulo, BR)
172 e 10,85 μ l de água ultrapura.

173 As ciclagens térmicas das PCR foram realizadas em SimpliAmp™ Thermal Cycler
174 (Thermo Scientific, Waltham, USA) com desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguida
175 por 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 53 a 55 °C por 1min (53 °C para *rpb2*, 55 °C para *tef1- α* e

176 *tub2*; 57 °C para ITS) e 72 °C por 1 min, com extensão final de 72 °C por 10 min. Os produtos
177 de PCR foram corados com SYBR[®] green (Thermo Scientific, Waltham, USA), e
178 visualizados em gel de agarose (1%).

179 Os produtos de PCR bem-sucedidos foram purificados com kit de purificação
180 PureLink[™] PCR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA), de acordo com as
181 especificações do fabricante. As sequências gênicas foram obtidas por eletroforese capilar
182 em sequenciador automático ABI3500, utilizando polímero POP7 e BigDye Terminator 3.1
183 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e os mesmos conjuntos de iniciadores
184 utilizados para amplificação por PCR.

185 **Análises filogenéticas.** As sequências gênicas foram montadas em contigs, editadas
186 usando MEGA 6.06 (Tamura et al. 2013) e as sequências consenso comparadas com as
187 sequências referências de *Lasiodiplodia* ex-tipo recuperadas do GenBank
188 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) de acordo nas análises descritas abaixo. Novas sequências
189 incluídas nesse estudo foram depositadas no GenBank (Tabela 1).

190 A determinação de haplótipos foi realizada no software DNA sequence polymorphism
191 – Dnasp versão 6.10.04 (<http://www.ub.es/dnasp>). Os alinhamentos múltiplos de sequências
192 (MSAS) foram realizados no MAFFT versão 7 (Kato e Toh 2013) usando ferramentas de
193 ajuste de direção das sequências e estratégia automática, seguido por novo alinhamento no
194 portal GUIDANCE2 server (<http://guidance.tau.ac.il/ver2/>) (Sela et al. 2015).

195 A filogenia foi inferida comparando-se os agrupamentos filogenéticos individuais e
196 concatenados (lôcus ITS, *tef1- α* , *rpb2* e *tub2*) por Análise de Máxima Verossimilhança - MV
197 e Inferência Bayesiana - IB aproximada no portal CIPRES (<https://www.phylo.org>). As
198 análises de ML foram estimadas com a ferramenta RAxML-HPC2 on XSEDE, modelo GTR
199 GAMMA, e a melhor topologia de árvore atrelada aos valores de Bootstrap em 1000
200 pseudoreplicatas.

201 Para as análises IB, determinou-se os melhores modelos de substituição de
202 nucleotídeos para cada gene com o software MrMODELTEST 2.3 (Posada e Buckley, 2004),
203 de acordo com o Critério de Informação Akaike (AIC). O modelo de evolução HKY+I+G
204 foi utilizado para *tefl- α* , SYM+I para ITS, GTR+I foi usado para *tub2* e GTR+G foi usado
205 para *rpb2*. As estimativas filogenéticas BI foram inferidas empregando-se o método da
206 Cadeia de Markov e Monte Carlo-MCMC para ITS, e *tefl- α* , *rpb2* e *tub2*, concatenados pela
207 ferramenta MrBayes on XSEDE no portal web CIPRES. Quatro cadeias MCMC foram
208 executadas simultaneamente, a partir de árvores aleatórias para 50 milhões de gerações,
209 amostradas a cada 1.000 gerações, totalizando 50.000 árvores. As probabilidades
210 posteriores-PP foram calculadas após o descarte dos primeiros 25% das gerações como burn-
211 in e seleção de uma árvore de consenso, gerada a partir das árvores restantes. As árvores
212 enraizadas com *Lasiodiplodia crassispora* (CBS 118741 e CMW 13488) foram visualizadas
213 utilizando a ferramenta FigTree Versão 1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>), exportadas e
214 editadas no software PowerPoint (Office - Microsoft ©).

215 Com base nos resultados comparativos das filogenias obtidas por MV e IB, dos genes
216 individuais e multiocus, os agrupamentos filogenéticos específicos foram determinados
217 segundo o conceito de Reconhecimento de Espécies Filogenéticas Genealógicas e os
218 critérios de concordância e não discordância entre genealogias (Taylor et al. 2000).

219 **Patogenicidade e epidemiologia comparativa.** A patogenicidade e a epidemiologia
220 comparativa foram avaliadas em frutos de coqueiro (variedade anão, cultivar verde), com
221 aproximadamente 4 meses do estágio de maturação fisiológica e assintomáticos (Fig. 2C),
222 provenientes da Estação Experimental de Itapirema, do Instituto Agrônomo de
223 Pernambuco, em Goiana, PE.

224 Para remoção de resíduos ambientais, todos os frutos foram desinfestados
225 superficialmente, por meio de lavagem com detergente neutro comercial e água corrente.

226 Posteriormente, os frutos foram imersos em solução de NaOCl 0,5% por 20 min, lavados em
227 água corrente e secos a temperatura ambiente por 24 h.

228 Os isolados de *Lasiodiplodia* foram cultivados em BDA por 10 dias a 28 ± 2 °C sob
229 fotoperíodo de 12 h. Cada fruto (3 frutos/isolado) foi perfurado, em quatro pontos
230 equidistantes, a aproximadamente 4 mm de profundidade com auxílio de um agulhão
231 pontiagudo estéril de 3 mm de diâmetro. Discos cilíndricos de BDA (\emptyset 6 mm), contendo
232 estruturas reprodutivas do fungo foram depositados sobre o ponto de perfuração. No controle
233 o patógeno foi substituído por discos cilíndricos de BDA, sem estruturas fúngicas. A área
234 inoculada foi recoberta por fita adesiva crepe (fragmentos de 5 cm x 50 mm, marca 3M[®]) e
235 os frutos foram acondicionados sob câmara úmida, utilizando-se plásticos transparentes
236 (30x40 cm) em blocos casualizados, a 28 ± 2 °C e 55 ± 4 % de umidade.

237 Após 48 h de incubação em câmara úmida, os frutos foram mantidos em temperatura
238 ambiente, sendo a avaliação realizada a cada dois dias, durante onze dias. A patogenicidade
239 foi verificada pela presença ou não de sintomas típicos e a virulência foi quantificada de
240 acordo com a profundidade e o diâmetro das lesões, pela média de dois eixos perpendiculares
241 da lesão superficial e profundidade da lesão por corte transversal do mesocarpo.

242 Foram determinados o período de incubação – PI, de acordo com intervalo de tempo
243 entre a inoculação e o surgimento dos primeiros sintomas, e a taxa de progresso da doença
244 – r foi calculada segundo a equação linear $Y_t = Y_0 + Y_0 \cdot r \cdot t$ (onde Y = diâmetro de lesão, r =
245 taxa de progresso da doença e t = tempo de avaliação). A área abaixo da curva de progresso
246 da doença – AACPD foi calculada pela soma das médias de severidade em cada intervalo de
247 avaliação. Diferenças de r e AACPD entre os isolados de *Lasiodiplodia* foram determinadas
248 por ANOVA e as médias comparadas pelo teste Scott knott a 5 % utilizando software
249 Assistat v 7.7 (Silva 2016a, b).

250

251 **Resultados**

252 **Obtenção de isolados.** Foram obtidos 61 isolados a partir de folíolos sintomáticos a
253 queima das folhas (Fig. 2A) e 10 isolados de frutos sintomáticos a podridão basal de coco
254 (Fig. 2B), com características fenotípicas semelhantes a *Lasidiplodia*, totalizando 71
255 isolados, selecionados para os testes de patogenicidade e caracterização epidemiológica.

256 **Extração de DNA, PCR e sequenciamento.** A partir dos *amplicons* sequenciados,
257 obteve-se 71, 22, 10 e 10 sequências para *tef1- α* , ITS, *tub2* e *rpb2*, respectivamente,
258 posteriormente depositadas no GenBank (Tabela 1).

259 **Análises filogenéticas.** Baseado nas sequências de *tef1- α* , os 71 isolados foram
260 separados em quatro haplotipos (hap): 1 isolado hap1, 1 isolado hap2, 3 isolados hap3 e 66
261 hap4. Foram selecionados 22 isolados representativos, segundo critério de origem
262 geográfica, dos quatro haplótipos: 1 isolado hap1; 1 isolado hap2; 3 isolados hap3 e 17 hap4,
263 para amplificação, sequenciamento da região ITS e, posteriormente, análise filogenéticas
264 concatenada (*tef1- α* e ITS).

265 As análises de ML e IB revelaram a presença de quatro espécies agrupadas em
266 diferentes clados de *Lasiodiplodia*: *L. theobromae* (17 isolados), *L. pseudotheobromae* (3
267 isolados), *L. brasiliensis* (1 isolado) e *L. subglobosa* (1 isolado) suportados por valores de
268 Bootstrap ≥ 70 e probabilidade posterior $\geq 0,95$ (dados não mostrados).

269 Após redução de isolados representativos das quatro espécies previamente indicadas
270 (17 isolados) 11 foram amostrados aleatória: *L. theobromae* (8), *L. pseudotheobromae* (2),
271 *L. brasiliensis* (1) e *L. subglobosa* (1), e comparados por análises ML e BI multilocus de
272 ITS, *tef1- α* , *rpb2* e *tub2* com os representantes de referência.

273 Nos resultados obtidos verificou-se a permanência, assim como na análise utilizando
274 ITS e *tef1- α* , de quatro agrupamentos dos isolados amostrados, em relação as espécies
275 *Lasiodiplodia* de referência: 7 isolados agrupados em *L. theobromae*, 2 isolados em *L.*

276 *pseudotheobromae*, 1 isolado em *L. brasiliensis* e 1 isolado em *L. subglobosa*, suportados
277 por valores de Bootstrap e probabilidade posterior ≥ 70 e 0,95, respectivamente (Fig. 3). Em
278 suma, para os 71 isolados identificados, cada haplótipo correspondeu a um agrupamento
279 específico: *L. brasiliensis* (1 isolado), *L. subglobosa* (1 isolado), *L. pseudotheobromae* (3
280 isolados) e *L. theobromae* (66 isolados), com discrepantes distribuições geográficas
281 populacional e associação sintomatológica (Fig. 4).

282 **Patogenicidade e epidemiologia comparativa.** Todos os isolados foram patogênicos
283 aos frutos de coqueiro-anão-verde, com sintomas iniciais visíveis, a partir de 24 h após a
284 inoculação (Tabela 2). Aos sete dias após a inoculação, por toda a região inoculada, haviam
285 lesões necróticas de coloração marrom escura e expansão longitudinal, em direção a região
286 peduncular (Fig. 2D, G), recoberta por crescimento micelial acinzentado e apresentando
287 pontos de exsudação de líquido marrom translucido (Fig. 2E, H). Internamente, as lesões
288 atingiam a região do mesocarpo, em feixes de manchas longitudinais ascendentes a região
289 peduncular e também o tecido do endocarpo (Fig. 2F, I). Os respectivos isolados foram
290 recuperados dos tecidos sintomáticos, cumprindo os postulados de Koch.

291 Valores médios de profundidade de lesão não foram representativos quanto ao
292 agrupamento ou classificação de severidade epidemiológica (dados não mostrados). No
293 tecido do mesocarpo, a evolução da lesão interna permaneceu uniforme até o terceiro dia de
294 inoculação (Fig. 5A), tornando-se aparentemente não progressiva em relação ao ponto de
295 inoculação após cinco (Fig. 5B) e nove dias (Fig. 5C). No entanto, em regiões distanciadas
296 do ponto de inoculação no mesocarpo e no endocarpo, próximo a região peciolar, observou-
297 se a presença de manchas lesionais escurecidas (Fig. 5D) em relação ao mesmo tipo de tecido
298 no terceiro dia após a inoculação.

299 Em relação as espécies identificadas nesse trabalho, *L. theobromae* foi a de maior
300 frequência, ocorrente em cultivos presentes nas três zonas climáticas abrangidas, e obtida a

301 partir de sintomas de queima das folhas e de podridão de coco. Isolados de *L.*
302 *pseudotheobromae* foram recuperados apenas na região de zona seca de Pernambuco e a
303 presença de *L. brasiliensis* e *L. subglobosa*, em baixa frequência, limitou-se a zona úmida
304 da Paraíba e Pernambuco, respectivamente (Fig. 6A).

305 Baseado nos dados de análise de severidade, onze dias após a inoculação de
306 *Lasiodiplodia* em coco-anão-verde, os isolados apresentaram variação de um a três dias
307 quanto ao PI e diferiram ($p \leq 0,01$) em *r* e AACPD, formando grupos de médias independentes
308 para cada um desses parâmetros e da espécie. Médias de AACPD, calculadas a partir do
309 diâmetro média das lesões, foram eleitas como parâmetro para agrupar os isolados, segundo
310 grau de severidade a frutos de coqueiro-anão-verde (Tabela 2). Os isolados foram
311 distribuídos, sem distinção específica, em seis grupos comparativos de severidade, com
312 intervalo de AACPD de 27 a 83 mm². Aproximadamente 80% deles apresentaram entre 45
313 e 68 mm² e apenas três isolados (2 de *L. theobromae* e 1 de *L. pseudotheobromae*)
314 destacaram-se com valores de AACPD acima de 78 mm², sendo considerados os isolados
315 mais agressivos (Fig. 6B).

316

317 **Discussão**

318 Inferências filogenéticas revelam que alguns isolados de *L. theobromae*, descritos
319 morfológicamente e /ou baseadas na amplificação da região ITS até 2004, possivelmente
320 podem ser reclassificados como outra espécie (Cruywagen et al. 2017). Por meio de
321 aplicações delas aos estudos convencionais sobre a etiologia da queima das folhas e da
322 podridão basal de coco, antes atribuída *L. theobromae* (Halfeld-Vieira e Nechet 2005, Silva
323 et al. 2017, Viana et al. 2002), novas pesquisas, com isolados de diferentes áreas geográficas
324 brasileiras, apontaram quatro espécies envolvidas nesse patossistema: *L. brasiliensis*, *L.*
325 *egyptiaceae*, *L. theobromae* e *L. pseudotheobromae* (Rosado et al. 2016).

326 Observando-se a quantidade de espécies descritas a partir do uso de marcadores
327 moleculares como *tef1- α* , (Alves et al. 2008, Marques et al. 2013, Netto et al. 2014, Wang
328 et al. 2011) e *rpb2* e *tub2* (Cruywagen et al. 2017, Diddier et al. 2014, Rosado et al. 2016),
329 assim como de ferramentas bioinformativas (Katoh e Toh 2013, Nylander 2004, Sela et al.
330 2015, Tamura et al. 2013), nota-se um incremento significativo na descrição de novas
331 espécies em diversos hospedeiros (Abdallahzadeh et al. 2010, Machado et al. 2014, Osorio
332 et al. 2017, Rodríguez-Gálvez et al. 2017, Trakunyingcharoen et al. 2015), bem como melhor
333 elucidação das relações filogenéticas entre táxons.

334 Todas as espécies identificadas nesse estudo enquadraram-se em clados filogenéticos
335 bem suportados com os demais táxons de mesma espécie, descritos em estudos anteriores,
336 tanto nas análises concatenadas com dois, quanto na concatenada com quatro genes
337 (Machado e Pereira 2014, Netto et al. 2014, Phillips et al. 2006, 2013, Rosado et al. 2016).
338 Estudos de diversidade de espécies fúngicas patogênicas ao coqueiro, principalmente sobre
339 o gênero *Lasiodiplodia*, são escassas, sendo esse o primeiro estudo envolvendo,
340 exclusivamente, isolados de *Lasiodiplodia* associados a queima das folhas e podridão basal,
341 oriundos de cultivos de coqueiro no Nordeste brasileiro.

342 Assim como relatado na maioria dos trabalhos que abordam identificação de espécies
343 de *Lasiodiplodia*, *L. theobromae* mantém-se como a espécie de maior frequência e
344 distribuição geográfica (Netto et al. 2014, Rosado et al. 2016, Marques et al. 2013).
345 Considerando-se a frequência de *L. brasiliense* e *L. pseudotheobromae* em estudos
346 anteriores, esperava-se que esses resultados fossem semelhantemente baixos em relação ao
347 complexo de espécies do coqueiro, no entanto *L. pseudotheobromae* superou as expectativas,
348 pois sua frequência, mesmo restrita a zona seca de Pernambuco, ganhou destaque
349 equiparando-se com a frequência de *L. theobromae* provenientes nessa mesma região. Esses
350 resultados divergem das frequências mostradas por Marques et al. (2013), onde apenas 13%

351 dos isolados obtidos na região Nordeste brasileira, especificamente a compreendida pelo
352 Vale do Assú e Vale do São Francisco, foi atribuído a *L. pseudotheobromae* e por Rosado et
353 al. (2016), que apontou a ocorrência de um único isolado proveniente do Sul brasileiro.

354 Estudos recentes sinalizam a ocorrência de hibridização entre isolados de
355 *Lasiodiplodia*, destacando o híbrido *Lasiodiplodia*×*brasiliense*, possivelmente formado
356 com *L. theobromae* ou até mesmo com uma espécie não conhecida, e assumem essa
357 ocorrência como fenômeno provável, principalmente durante processo de reprodução sexual
358 entre fungos estreitamente relacionados, favorecido pela ampla gama de hospedeiros e
359 natureza endofítica desse fungo, (Cruywagen et al. 2017). Essas proposições podem explicar
360 a estreita relação filogenética entre os isolados de *L. theobromae* e *L. brasiliense*,
361 identificados nesse estudo.

362 Consoante aos resultados de patogenicidade mostrados por Rosado et al. (2016), todos
363 os isolados inoculados foram patogênicos, promoveram sintomas típicos da podridão basal
364 em coco, incluindo lesões internas no tecido do mesocarpo e endocarpo, que visivelmente
365 comprometem o endosperma e a reserva de água dos frutos. Sendo *L. theobromae* a espécie
366 de maior frequência apontada em vários estudos relacionados ao gênero *Lasiodiplodia*, não
367 surpreende que isolados pertencentes a essa espécie tenham se destacado por apresentar
368 maior severidade e, portanto, mais virulência.

369 No entanto, o destaque de um dos isolados de *L. pseudotheobrome*, como um dos mais
370 virulentos, equiparado a *L. theobromae*, em relação a severidade das lesões em coco-anão-
371 verde, promove grande incremento aos conhecimentos sobre o desenvolvimento
372 epidemiológico das espécies de *Lasiodiplodia* em coco-anão-verde, principalmente no
373 tocante as condições edafoclimáticas do Nordeste brasileiro.

374 A identificação de *L. subglobosa* entre os isolados obtidos nesse estudo, bem como a
375 confirmação de sua patogenicidade, causando sintomas de podridão basal em coco, mostrou-

376 se surpreendente, uma vez que só existem relatos dessa espécie associada a
377 noqueira-pecã (*Carya illinoensis* K.) e ao pinhão manso (*Jatropha curcas* L.),
378 provenientes da região Sul brasileira (Machado et al 2014, Poletto et al. 2016).

379 Os primeiros relatos de obtenção de isolados de *L. pseudotheobromae*, representativos
380 da região Nordeste brasileira, e de *L. subglobosa* patogênica ao coqueiro, causando podridão
381 basal em coco-anão-verde são representados nesse trabalho. Por meio deles, ampliamos o
382 leque da diversidade de espécies de *Lasiodiplodia* associadas a doenças em coqueiro, como
383 queima das folhas e podridão basal de frutos, conhecidas atualmente.

384 Os resultados observados no presente estudo representam relevantes informações à
385 comunidade científica e podem ser utilizados como base em novas pesquisas, principalmente
386 relacionados a fatores epidemiológicos, resistência fúngica, manejo fitossanitário e
387 melhoramento genético.

388

389 **Agradecimentos**

390 Esse trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
391 Tecnológico (CNPq-Brasil). Os autores agradecem ao Assistente de Pesquisa José Carlos
392 Barbosa Nascimento, a Estação Experimental de Itapirema do Instituto Agrônomo de
393 Pernambuco, ao Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de
394 Pernambuco – LAFBAC e ao Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva da
395 Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, pelo auxílio durante as coletas em campo,
396 disponibilização de material vegetal utilizado nos experimentos, disponibilização de
397 estrutura física e pelos serviços de análises genéticas, respectivamente.

398

399

400

401 **Referências**

- 402 Abdollahzadeh, J., Javadi, A., Goltapeh, E. M., Zare, R. e Phillips, A. J. L. 2010. Phylogeny
403 and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia*. 25:1-10.
404 <https://doi.org/10.3767/003158510X524150>
- 405 Alves, A., Crous, P. W., Correia, A. e Phillips, A. J. L. 2008. Morphological and molecular
406 data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Divers.* 28:1-13.
- 407 Begoude, B. A. D., Slippers, B., Wingfield, M. J. e Roux, J. 2010. Botryosphaeriaceae
408 associated with *Terminalia catappa* in Cameroon, South Africa and Madagascar.
409 *Mycol. Prog.* 9:101-123. <https://doi.org/10.1007/s11557-009-0622-4>.
- 410 Camargo, F. A. O., Silva, L. S., Merten, G. H., Carlos, F. S., Baveye, P. C. e Triplett E. W.
411 2017. Agriculture brazilian in perspective: great expectations vs reality. *Adv. Agron.*
412 141: 53-114. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2016.10.003>
- 413 Castellani, A. 1963. The “water cultivation” of pathogenic fungi. *Ann. Soc. Belg. Med. Tr.*
414 44:217-220.
- 415 Cavalcante, L. V. 2015. A nova geografia da produção de coco no Brasil. In: XI Encontro
416 Nacional da ANPEGE.
- 417 Cavalcante, R. D., Lima, W. G., Martins, R. B., Tovar-Pedraza, J. M., Michereff S. J. e
418 Câmara, M. P. S. 2014. Thiophanate-methyl sensitivity and fitness in *Lasiodiplodia*
419 *theobromae* populations from papaya in Brazil. *Eur. J. Plant. Pathol.* 140(2):251-259.
420 <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0459-9>
- 421 Cruywagen, E. M., Slippers, B., Roux, J. e Wingfield, M. J. 2017. Phylogenetic species
422 recognition and hybridization in *Lasiodiplodia*: A case study on species from baobabs.
423 *Fungal Biol.* 121:420-436. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.07.014>

- 424 Dissanayake, A. J., Phillips, A. J. L., Li, X. H. e Hyde, K. D. 2016. *Botryosphaeriaceae*:
425 Current status of genera and species. *Mycosphere*. 7(7):1001-1073.
426 <https://doi.org/10.5943/mycosphere/si/1b/13>
- 427 FAOStats - Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOStats. Acesso
428 em: 10 de janeiro de 2018. <http://www.FAOStats.org/FAOStatsstat/en/#data/QC>
- 429 Ferraz, L. G. B., Aragão, W. M., Silva, D. A., Nascimento, J. C. B. e Silva Filho, J. S. 2009a.
430 Coqueiro ‘anão-verde’ (*Cocos nucifera* L.). In: Instituto Agrônômico de Pernambuco.
431 Cultivares recomendadas pelo IPA para a Zona da Mata de Pernambuco. Recife:
432 Instituto de Pesquisa Agropecuária de Pernambuco: 99-106.
- 433 Ferraz, L. G. B., Silva, A. B., Nunes Filho, J., Sousa, A. R. e Santos, V. F. 2009b. Sugar
434 cane cake and mineral fertilizers on coconut (*Cocos nucifera* Linn.) seedlings. *R&D*
435 *Journal*. 25(2):45-55.
- 436 Glass, N. e Donaldson, G. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR
437 to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.*
438 61: 1323-1330.
- 439 Halfeld-Vieira, B. e Nechet, K. L. 2005. Queda de Frutos em Coqueiro Causada por
440 *Lasiodiplodia theobromae* em Roraima. *Fitopatol. Bras.* 30 (2):203.
- 441 Holanda, J. S., Alves, M. C. S. e Chagas, M. C. M. 2008. Cultivo do coqueiro no Rio Grande
442 do Norte. Natal: EMPARN. 27 p.
- 443 IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Acesso em: 20
444 janeiro 2018. <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613>
- 445 Katoh, K. e Toh, H. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7:
446 improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30: 772–780.
447 <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- 448 Köppen, W. P. 1931. *Grundriss der Klimakunde*. 2 nd. Berlin: Walter de Gruyter, 388p.

- 449 Machado, A. R., Pinho, D. B. e Pereira, O. L. 2014. Phylogeny, identification and
450 pathogenicity of the Botryosphaeriaceae associated with colas and root of the biofuel
451 plant *Jatropha curcas* in Brazil, with a description of new species of *Lasiodiplodia*.
452 Fungal Divers. 67(1):231-247. <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0274-1>
- 453 Marques, M. W., Lima, N. B., Morais, Jr M. A., Barbosa, M. A. G., Souza, M. O.,
454 Michereff, S. J., Phillips, A. J. L. e Câmara, M. P. S. 2013. Species of *Lasiodiplodia*
455 associated with mango in Brazil. Fungal Divers. 61(1):181-193.
456 <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0231-z>
- 457 Martins, C. R. e Jesus Júnior, L. A. 2011. Evolução da produção de coco no Brasil e o
458 comércio internacional: panorama 2010. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 28
459 p.
- 460 Monteiro, C. M., Caron, E. S., Silveira, S. F., Almeida, Al. M., Souza-Filho, G. R. e Souza,
461 A. L. 2013. Control of foliar diseases by the axillary application of systemic
462 fungicides in Brazilian coconut palms. Crop Prot. 52:78-83.
463 <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.05.013>
- 464 Murray, M. A. S. e Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight
465 DNA. Nucleic Acids Res. 8:4321-4325. <https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>
- 466 Netto, M. S. B., Assunção, I. P., Lima, G. S. A., Marques, M. W., Lima, W. G., Monteiro,
467 J. H. A., Balbino, W. Q., Michereff, S. J., Phillips, A. J. L. e Câmara, M. P. S. 2014.
468 Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. Fungal
469 Divers. 67(1):127-141. <https://doi.org/10.1007/s13225-014-0279-4>
- 470 Nylander, J. A.A. (2004). MrModeltest v2. Program distributed by the author.
471 Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- 472 Osorio, J. A., Crous, C. J., Beer, Z. W., Wingfield, M. J. e Roux, J. 2017.
473 Endophytic *Botryosphaeriaceae*, including five new species, associated with

- 474 mangrove trees in South Africa. *Fungal Biol.* 121(4):361-393.
475 <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.09.004>
- 476 Phillips, A. J. L. 2004. The Botryosphaeria site.
477 https://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site
- 478 Phillips, A. J. L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald,
479 J. Z. e Crous, P. W. 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from
480 culture. *Stud. Mycol.* 76:151-167. <https://doi.org/10.3114/sim0021>
- 481 Phillips, A. J. L., Oudemans, P. V., Correia, A. e Alves, A. 2006. Characterization and
482 epitypification of *Botryosphaeria corticis*, the cause of blueberry cane canker. *Fungal*
483 *Divers.* 21:141-155.
- 484 Poletto, T., Gonzatto Maciel, C., Muniz, M., Blume, E. e Briosso, P. 2016. First report of
485 stem canker caused by *Lasiodiplodia subglobosa* on *Carya illinoensis* in Brazil.
486 *Plant Dis.* 100:1016–1017. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-15-0948-PDN>
- 487 Posada, D. e Buckley, T. R. 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics:
488 advantages of Akaike Information Criterion and Bayesian approaches over likelihood
489 ratio tests. *Syst. Biol.* 53:793-808. <https://doi.org/10.1080/10635150490522304>
- 490 Prades, A., Salum, U. N. e Pioch, D. 2016. New era for the coconut sector. What prospects
491 for research? Oilseeds and fats, *OCL.* 23(6):D607.
492 <https://doi.org/10.1051/ocl/2016048>
- 493 Rodríguez-Gálvez, E., Guerrero, P., Barradas, C., Crous, P. W. e Alves, A. 2017. Phylogeny
494 and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of mango in Peru.
495 *Fungal Biol.* 121(4):452-465. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.06.004>
- 496 Rosado, A. W. C. R., Machado, A. R., Freire, F. C. e Pereira, O. L. 2016. Phylogeny,
497 identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia* associated with postharvest stem-end

- 498 rot of coconut in Brazil. *Plant Dis.* 100(3):561-568. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03->
499 [15-0242-RE](https://doi.org/10.1094/PDIS-03-15-0242-RE)
- 500 Rozas, J., Sánchez-Delbarrio, J. C., Messeguer, X., Rozas, R. 2003. DnaSP, DNA
501 polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19:
502 2496–2497. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg359>
- 503 Sela, I., Ashkenazy, H., Katoh, K. e Pupko, T. 2015. GUIDANCE2: accurate detection of
504 unreliable alignment regions accounting for the uncertainty of multiple parameters.
505 *Nucleic Acids Res.* 43:W7–W14. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv318>
- 506 Silva, F. A. S. e Azevedo, C. A. V. 2016a. The Assistat Software Version 7.7 and its use in
507 the analysis of experimental data. *Afr. J. Agric. Res.* 11(39): 3733-3740.
508 <https://doi.org/10.5897/AJAR2016.11522>
- 509 Silva, F. A. S. e Azevedo, C. A. V. 2016b. Comparison of means of agricultural
510 experimentation data through different tests using the software Assistat. *Afr. J. Agric.*
511 *Res.* 11(37):3527-3531. <https://doi.org/10.5897/AJAR2016.11523>
- 512 Silva, J. M., Talamini, V., Ramos, S. R. R., Ferreira, J. M. S., Santos, J. M. S. M. e Fernandes,
513 M. F. 2017. Evaluation of dwarf coconut (*Cocos nucifera* L.) germplasm to the damage
514 intensity caused by foliar diseases. *Aust. J. Crop Sci.* 11(10):1374-1380
515 <https://doi.org/10.21475/ajcs.17.11.10.pne748>
- 516 Souza Filho, B. F., Santos Filho, H. P., Robbs C. R. 1979. Etiologia da queima-das-folhas
517 do coqueiro. *Fitopatol. Bras.* 4: 4-10.
- 518 Talamini, V., Ferreira, J. M. S. e Ramos, S. R. R. 2013. Incidência e severidade da queima
519 das folhas em cultivares de coqueiro em Pernambuco. Aracaju: Embrapa Tabuleiros
520 Costeiros, 2013. 14 p.

- 521 Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A. e Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular
522 Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725–2729.
523 <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- 524 Taylor, J. W., Jacobson, D. J., Kroken S., Kasuga, T., Geiser, D. M., Hibbett, D. S. e Fisher,
525 M.C. 2000. Phylogenetic Species Recognition and species concepts in fungi. *Fungal*
526 *Genet. Biol.* 31:21-32. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1228>
- 527 Trakunyingcharoen, T., Lombard, L., Groenewald, J. Z., Cheewangkoon, R., To-Anun, C. e
528 Crous, P. W. 2015. Caulicolous *Botryosphaeriales* from Thailand. *Persoonia.* 34:87–
529 99. <https://doi.org/10.3767/003158515X685841>
- 530 Viana, F. M. P., Freire, F. C. O., Barguil, B. M., Alves, R. E., Santos, A. A., Cardoso, J. E.
531 e Vidal, J. C. 2002. Podridão basal pós-colheita do coco verde no estado do Ceará.
532 *Fitopatol Bras.* 27(5):545. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582002000500020>
- 533 Wang, F., Zhao, L., Li, G., Huang, J. e Hsiang, T. 2011. Identification and Characterization
534 1 of *Botryosphaeria* spp. Causing Gummosis of Peach Trees in Hubei Province,
535 Central China. *Plant Dis.* 95(11):1378-1384. [https://doi.org/10.1094/PDIS-12-10-](https://doi.org/10.1094/PDIS-12-10-0893)
536 [0893](https://doi.org/10.1094/PDIS-12-10-0893)
- 537 Warwick, D. R. N. e Abakerli, R. B. 2001. Chemical control of Lixas and leaf blight disease
538 of coconut. *Palms.* 45:168-170.
- 539 Warwick, D. R. N. e Passos, E. E. M. 2009. Outbreak of stem bleeding coconuts caused by
540 *Thielaviopsis paradoxa* in Sergipe, Brazil. *Trop. Plant Pathol.* *34(3):175-177.*
541 <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762009000300007>
- 542 White, T. J., Bruns, T., Lee, S. e Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of
543 fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, A. M., Gelfard, D. H.,
544 Snindky, J. J. e White, T. J. (eds) *PCR Protocols: A Guide to Methods and*
545 *Applications.* Academic Press, San Diego, 315-322.

- 546 Yang, T., Groenewald, J. Z., Cheewangkoon, R., Jami, F., Abdollahzadeh, J., Lombard, L.
547 e Crous, P. W. 2017. Families, genera, and species of Botryosphaerales. *Fungal Biol.*
548 121:322-346. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.11.001>

Tabela 1 Espécies de *Lasiodiplodia* incluídas nas análises filogenéticas

Táxon	N. Isolado ^e	Hospedeiro	Local	NBCI número de acesso ^d			
				ITS	<i>tefl-α</i>	<i>tub2</i>	<i>rpb2</i>
<i>L. americana</i>	CERC1961 ^a	<i>Pistachia vera</i>	EUA	KP217059	KP217067	KP217075	-
	CERC1960	<i>P. vera</i>	EUA	KP217058	KP217066	KP217074	-
<i>L. brasiliensis</i>	COAD 1784	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	KP244693	KP308469	KP308524	-
	CMW 35884	<i>Adansonia madagascariensis</i>	Madagascar	KU887094	KU886972	KU887455	KU696345
	CFS 097	<i>C. nucifera</i>	Brasil	MG870584	MG870576	MG870604	MG870614
<i>L. caatiguensis</i>	CMM1325	<i>Citrus sinensis</i>	Brasil	KT154760	KT008006	KT154767	-
	IBL442	<i>Spondias purpurea</i>	Brasil	KT154761	KT154754	KT154768	-
<i>L. citricola</i>	CBS 124707 ^a	<i>Citrus</i> sp.	Iran	GU945354	GU945340	KU887505	KU696351
	CBS 124706	<i>Citrus</i> sp.	Iran	GU945353	GU945339	KU887504	KU696350
<i>L. crassispóra^c</i>	CBS 118741 ^a	<i>Santalum album</i>	Austrália	DQ103550	DQ103557	KU887506	KU696353
	CMW 13488	<i>Eucalyptus</i>	Venezuela	DQ103552	DQ103559	KU887507	KU696352
<i>L. egyptiacea</i>	CBS 130992 ^a	<i>Mangifera indica</i>	Egito	JN814397	JN814424	KU887508	KU696354
	BOT-29	<i>M. indica</i>	Egito	JN814401	JN814428	-	-
<i>L. exigua</i>	CBS 137785 ^a	<i>Retama raetam</i>	Tunisia	KJ638317	KJ638336	KU887509	KU696355
	PD 161	<i>P. vera</i>	EUA	GU251122	GU251254	-	-
<i>L. euphorbicola</i>	CMM 3609 ^a	<i>Jatropha curcas</i>	Brasil	KF234543	KF226689	KF254926	-
<i>L. gravistriata</i>	CMM 4564 ^a	<i>Anacardium humile</i>	Brasil	KT250949	KT250950	-	-
	CMM 4565	<i>A. humile</i>	Brasil	KT250947	KT266812	-	-
<i>L. gilanensis</i>	CBS 124705	-	Iran	GU945352	GU945341	-	-
	CBS 124704 ^a	-	Iran	GU945351	GU945342	-	-
<i>L. gonubiensis</i>	CBS 115812 ^a	<i>Syzigium cordatum</i>	África do Sul	DQ458892	DQ458877	DQ458860	KU696359
	CBS 116355	<i>S. cordatum</i>	África do Sul	AY639594	DQ103567	EU673126	KU696358
<i>L. hormozganensis</i>	CBS 124709 ^a	<i>Olea</i> sp.	Iran	GU945355	GU945343	KU887515	KU696361
	CBS 124708	<i>M. indica</i>	Iran	GU945356	GU945344	KU887514	KU696360
<i>L. iraniensis</i>	CBS 124710 ^a	<i>Salvadora persica</i>	Iran	GU945348	GU945336	KU887516	KU696363
	CBS 124711	<i>Juglans</i> sp.	Iran	GU945347	GU945335	KU887517	KU696362
<i>L. jatrophycola</i>	CMM 3610 ^a	<i>J. curcas</i>	Brasil	KF234544	KF226690	KF254927	-
	CMM 0247	<i>V. vinifera</i>	Brasil	KJ450869	KJ417870	-	-
<i>L. macrospora</i>	CMM 3833 ^a	<i>J. curcas</i>	Brasil	KF234557	KF226718	KF254941	-
<i>L. lignicola</i>	CBS 134112 ^a	Dead Wood	Tailândia	JX646797	KU887003	JX646845	KU696364
<i>L. mahajangana</i>	CBS 124925 ^a	<i>Terminalia catappa</i>	Madagascar	FJ900595	FJ900641	KU887518	KU696365
	CBS 124926	<i>T. catappa</i>	Madagascar	FJ900596	FJ900642	KU887519	KU696366
<i>L. margaritacea</i>	CBS 122519 ^a	<i>Adansonia gibbosa</i>	Austrália	EU144050	EU144065	KU887520	KU696367
	CBS 122065	<i>A. gibbosa</i>	Austrália	EU144051	EU144066	-	-
<i>L. mediterranea</i>	CBS 137783 ^a	<i>Quercus ilex</i>	Itália	KJ638312	KJ638331	KU887521	KU696368
	CBS 137784	<i>Vitis vinifera</i>	Itália	KJ638311	KJ638330	KU887522	KU696369
<i>L. missouriana</i>	CBS 128311 ^a	<i>Catawba</i> sp.	EUA	HQ288225	HQ288267	HQ288304	KU696370
	CBS 128312	<i>Catawba</i> sp.	EUA	HQ288226	HQ288268	HQ288305	KU696371
<i>L. parva</i>	CBS 456.78 ^a	Mandioca-campo-solo	Colômbia	EF622083	EF622063	KU887523	KU696372
	CBS 494.78	Mandioca-campo-solo	Colômbia	EF622084	EF622064	EU673114	KU696373
<i>L. plurivora</i>	CBS 120832 ^a	<i>Prunus salicina</i>	África do Sul	EF445362	EF445395	KU887524	KU696374
	CBS 121103	<i>V. vinifera</i>	África do Sul	AY343482	EF445396	KU887525	KU696375
<i>L. pontae</i>	CMM 1277 ^a	<i>S. purpurea</i>	Brasil	KT151794	KT151791	KT151797	-
<i>L. pseudotheobromae</i>	CBS 116459 ^a	<i>Gmelina arborea</i>	Costa Rica	EF622077	EF622057	EU673111	KU696376
	COAD 1785	<i>C. nucifera</i>	Brasil	KP244690	KP308464	KP308523	-
	CFS 043	<i>C. nucifera</i>	Brasil	MG870581	MG870573	-	-
	CFS 047	<i>C. nucifera</i>	Brasil	MG870582	MG870574	MG870602	MG870612
	CFS 048	<i>C. nucifera</i>	Brasil	MG870583	MG870575	MG870603	MG870613
<i>L. pyriformis</i>	CBS 121770 ^a	<i>Acacia mellifera</i>	Namibia	EU101307	EU101352	KU887527	KU696378
	CBS 121771	<i>A. mellifera</i>	Namibia	EU101308	EU101353	KU887528	KU696379
<i>L. rubropurpurea</i>	CBS 118740 ^a	<i>E. grandis</i>	Austrália	DQ103553	EU673304	EU673136	KU696380
<i>L. subglobosa</i>	CMM 3872 ^a	<i>J. curcas</i>	Brasil	KF234558	KF226721	KF254942	-
	CMM 4046	<i>J. curcas</i>	Brasil	KF234560	KF226723	KF254944	-
	CFS 005	<i>C. nucifera</i>	Brasil	MG870580	MG870572	-	-
	CBS 164.96 ^b	Frutos em encosta de recifes	Nova Guinéa	AY640255	AY640258	KU887532	KU696383
	CMM 124.13	-	EUA	DQ458890	DQ458875	DQ458858	-
	COAD 1788	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	KP244698	KP308476	KP308528	-
	CFS 004	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF991280	-	-
	CFS 007	<i>C. nucifera</i>	Brasil	MG870585	MF991281	MG870605	MG870615
	CFS 009	<i>C. nucifera</i>	Brasil	MG870586	MF997202	MG870606	MG870616
	CFS 042	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997203	-	-
CFS 044	<i>C. nucifera</i>	Brasil	MG870587	MF997204	MG870607	MG870617	
CFS 046	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997205	-	-	
CFS 049	<i>C. nucifera</i>	Brasil	MG870588	MF997206	-	-	
CFS 050	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997207	-	-	
CFS 051	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997208	-	-	
CFS 058	<i>C. nucifera</i>	Brasil	MG870589	MF997209	MG870608	MG870618	
CFS 059	<i>C. nucifera</i>	Brasil	MG870590	MF997210	-	-	

Tabela 1 Cont.

Táxon	N. Isolado ^e	Hospedeiro	Local	NBCI número de acesso ^d			
				ITS	<i>tef1-α</i>	<i>tub2</i>	<i>rpb2</i>
	CFS 060	<i>C. nucifera</i>	Brasil	MG870591	MF997211	-	-
	CFS 061	<i>C. nucifera</i>	Brasil	MG870592	MF997212	-	-
	CFS 062	<i>C. nucifera</i>	Brasil	MG870593	MF997213	-	-
	CFS 065	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997214	-	-
	CFS 066	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997215	-	-
	CFS 069	<i>C. nucifera</i>	Brasil	MG870594	MF997216	-	-
	CFS 070	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997217	-	-
	CFS 071	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997218	-	-
	CFS 072	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997219	-	-
	CFS 074	<i>C. nucifera</i>	Brasil	MG870595	MF997220	-	-
	CFS 075	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997221	-	-
	CFS 076	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MG870577	-	-
	CFS 077	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MG870578	-	-
	CFS 079	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997222	-	-
	CFS 080	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997223	-	-
	CFS 081	<i>C. nucifera</i>	Brasil	MG870596	MF997224	-	-
	CFS 084	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997225	-	-
	CFS 085	<i>C. nucifera</i>	Brasil	MG870597	MF997226	MG870609	MG870619
	CFS 086	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997227	-	-
	CFS 088	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997228	-	-
	CFS 089	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997229	-	-
	CFS 091	<i>C. nucifera</i>	Brasil	MG870598	MF997230	MG870610	MG870620
	CFS 092	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997231	-	-
	CFS 093	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997232	-	-
	CFS 095	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997233	-	-
	CFS 096	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997234	-	-
	CFS 098	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MG870579	-	-
	CFS 099	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997235	-	-
	CFS 100	<i>C. nucifera</i>	Brasil	MG870599	MF997236	-	-
	CFS 101	<i>C. nucifera</i>	Brasil	MG870600	MF997237	-	-
	CFS 102	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997238	-	-
	CFS 103	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997239	-	-
	CFS 104	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997240	-	-
	CFS 105	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997241	-	-
	CFS 106	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997242	-	-
	CFS 107	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997243	-	-
	CFS 108	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997244	-	-
	CFS 109	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997245	-	-
	CFS 110	<i>C. nucifera</i>	Brasil	MG870601	MF997246	MG870611	MG870621
	CFS 111	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997247	-	-
	CFS 112	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997248	-	-
	CFS 113	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997249	-	-
	CFS 114	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997250	-	-
	CFS 115	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997251	-	-
	CFS 116	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997252	-	-
	CFS 117	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997253	-	-
	CFS 121	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997254	-	-
	CFS 122	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997255	-	-
	CFS 123	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997256	-	-
	CFS 124	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997257	-	-
	CFS 125	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997258	-	-
	CFS 126	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997259	-	-
	CFS 127	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997260	-	-
	CFS 128	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997261	-	-
	CFS 129	<i>C. nucifera</i>	Brasil	-	MF997262	-	-
<i>L. venezuelensis</i>	CBS 118739 ^a	<i>Acacia mangium</i>	Venezuela	DQ103547	DQ103568	KU887533	KU696384
	WAC 12540	<i>A. mangium</i>	Venezuela	DQ103548	DQ103569	KU887534	-
<i>L. viticola</i>	CBS 128313 ^a	<i>V. vinifera</i>	EUA	HQ288227	HQ288269	HQ288306	KU696385
	CBS 128315	<i>V. vinifera</i>	EUA	HQ288228	HQ288270	HQ288307	KU696386
<i>L. thailandica</i>	CPC 22795	<i>Phyllanthus acidus</i>	Tailândia	KJ193637	KJ193681	-	-
	B0041	<i>Phyllanthus acidus</i>	Tailândia	KM006433	KM006464	-	-

^a Cultura ex-type;^b Cultura ex-neotype;^c Isolado *outgroup*;^d ITS: Espaço de Transcrição Interna (ITS1-5.8S-ITS2); *tef1-α*: Fator de elongação tradução 1-α; *tub2*: β-tubulina; *rpb2*: RNA polimerase subunidade II.^e Isolados com número em negrito foram obtidos nesse estudo.

BOT – A. M. Ismail, Plant Pathology Research Institute, Giza, Egypt;

CERC- China Eucalypt Research Centre, Chinese Academy of Forestry, Zhanjiang, China;
CBS – Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands;
CPC - Entomology and Plant Pathology, Chiang Mai University, Meuang, Thailand;
CFS – Coleção Fungos de Solo, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil.
COAD – Culture Collection of fungi “Coleção Octávio Almeida Drumond” – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil;
CMW – Forestry and Agricultural Biotechnology Institute, University of Pretoria, South Africa;
CMM – Coleção de Cultura de Fungos Fitopatogênicos “Prof. Maria Menezes”, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil;
IBL – Culture Collection Botanical Institute, Lisbon Faculty of Sciences, Lisbon, Portugal;
IRAN- Culture Collection of the Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran;
PD - Plant Pathology, UC Davis, Davis, USA;
UCD – Phaff Yeast Culture Collection, Department of Food Science and Technology, University of California, Davis, USA;
WAC – Department of Agriculture Western Australia Plant Pathogen Collection, University of Western Australia, Perth, Australia;

Tabela 2 Período de incubação, taxa de progresso da doença e área abaixo da curva de progresso da doença de podridão em coco-anão-verde (frutos), causada por *Lasiodiplodia* spp.

Espécie	Isolado	PI ^x	r ^y	AACPD ^z
<i>L. brasiliensis</i>	CFS 097	2	0,26 ^b	47,60 ± 7,68 ^d
<i>L. pseudotheobromae</i>	CFS 043	2	0,45^a	48,52 ± 2,96 ^d
	CFS 047	1	0,06 ^c	82,99 ± 10,83^a
	CFS 048	2	0,59^a	46,65 ± 6,35 ^d
<i>L. subglobosa</i>	CFS 005	2	0,12 ^c	63,02 ± 2,08 ^c
<i>L. theobromae</i>	CFS 004	2	0,14 ^c	58,40 ± 7,36 ^c
	CFS 007	1	0,13 ^c	71,50 ± 8,39 ^b
	CFS 009	1	0,07 ^c	79,52 ± 8,08^a
	CFS 042	1	0,05 ^c	67,04 ± 3,84 ^c
	CFS 044	1	0,23 ^b	60,17 ± 4,25 ^c
	CFS 046	2	0,33 ^b	53,31 ± 1,95 ^d
	CFS 049	1	0,10 ^c	70,73 ± 6,9 ^b
	CFS 050	1	0,05 ^c	73,77 ± 3,82 ^b
	CFS 051	2	0,23 ^b	52,49 ± 5,5 ^d
	CFS 058	2	0,19 ^c	51,43 ± 2,61 ^d
	CFS 059	2	0,22 ^b	56,02 ± 2,39 ^d
	CFS 060	2	0,30 ^b	54,53 ± 3,63 ^d
	CFS 061	2	0,35^a	51,77 ± 4,88 ^d
	CFS 062	2	0,21 ^c	53,74 ± 1,68 ^d
	CFS 065	2	0,35^a	39,39 ± 6,13 ^e
	CFS 066	2	0,26 ^b	50,33 ± 5,19 ^d
	CFS 069	1	0,13 ^c	65,27 ± 6,89 ^c
	CFS 070	1	0,23 ^b	61,82 ± 6,4 ^c
	CFS 071	1	0,24 ^b	61,94 ± 4,31 ^c
	CFS 072	3	0,36^a	48,83 ± 3,22 ^d
	CFS 074	3	0,43^a	45,90 ± 2,05 ^d
	CFS 075	2	0,06 ^c	58,64 ± 5,93 ^c
	CFS 076	3	0,34^a	41,29 ± 13,96 ^e
	CFS 077	3	0,42^a	48,94 ± 2,42 ^d
	CFS 079	1	0,22 ^b	56,32 ± 8,69 ^d
	CFS 080	1	0,11 ^c	65,92 ± 2,51 ^c
	CFS 081	2	0,12 ^c	56,96 ± 7,26 ^d
	CFS 084	1	0,06 ^c	63,91 ± 1,79 ^c
	CFS 085	1	0,30 ^b	55,59 ± 9,49 ^d
	CFS 086	2	0,31 ^b	48,01 ± 2,34 ^d
CFS 088	1	0,14 ^c	63,17 ± 3,01 ^c	
CFS 089	1	0,08 ^c	63,79 ± 5,19 ^c	
CFS 091	1	0,07 ^c	67,64 ± 5,06 ^c	
CFS 092	2	0,26 ^b	51,92 ± 14,25 ^d	
CFS 093	1	0,15 ^c	61,45 ± 2,51 ^c	
CFS 095	1	0,08 ^c	78,21 ± 4,25^a	
CFS 096	1	0,08 ^c	69,16 ± 4,33 ^b	
CFS 098	2	0,29 ^b	54,01 ± 2,77 ^d	

Tabela 2 Cont.

Espécie	Isolado	PI ^x	<i>r</i> ^y	AACPD ^z
	CFS 099	2	0,08 ^c	58,74 ± 4,97 ^c
	CFS 100	2	0,15 ^c	65,75 ± 0,58 ^c
	CFS 101	2	0,34^a	51,73 ± 5,03 ^d
	CFS 102	2	0,16 ^c	27,79 ± 8,65 ^f
	CFS 103	2	0,16 ^c	56,23 ± 2,82 ^d
	CFS 104	2	0,14 ^c	50,63 ± 4,9 ^d
	CFS 105	1	0,15 ^c	66,41 ± 8,03 ^c
	CFS 106	2	0,28 ^b	45,60 ± 7,68 ^d
	CFS 107	2	0,20 ^b	46,38 ± 2,11 ^d
	CFS 108	2	0,38^a	30,72 ± 6,08 ^f
	CFS 109	2	0,28 ^b	46,28 ± 11,85 ^d
	CFS 110	1	0,04 ^c	65,35 ± 3,11 ^c
	CFS 111	1	0,16 ^c	64,78 ± 2,84 ^c
	CFS 112	2	0,22 ^b	51,11 ± 7,01 ^d
	CFS 113	2	0,23 ^b	35,58 ± 13,57 ^e
	CFS 114	2	0,32^a	43,46 ± 7,44 ^e
	CFS 115	1	0,21 ^b	52,25 ± 9,65 ^d
	CFS 116	2	0,40 ^a	59,41 ± 6,34 ^c
	CFS 117	1	0,04 ^c	66,20 ± 3,79 ^c
	CFS 121	2	0,25 ^b	48,96 ± 1,6 ^d
	CFS 122	1	0,21 ^c	53,30 ± 7,59 ^d
	CFS 123	1	0,03 ^c	72,50 ± 1,7 ^b
	CFS 124	2	0,12 ^c	57,96 ± 3,45 ^c
	CFS 125	1	0,08 ^c	69,14 ± 3,35 ^b
	CFS 126	1	0,06 ^c	61,52 ± 4,49 ^c
	CFS 127	1	0,05 ^c	63,64 ± 2,74 ^c
	CFS 128	1	0,15 ^c	61,86 ± 4,08 ^c
	CFS 129	1	0,08 ^c	69,79 ± 7,09 ^b
MG			0,21	56,88
CV			26,95	11,77

^x PI - Período de incubação (dias): determinado pelo intervalo de tempo entre a inoculação e o surgimento dos primeiros sintomas;

^y *r* – Taxa de progresso da doença (mm dia⁻¹): valores médios estimados pelo modelo linear ($Yt = Y0 + Y0.r.t$). Para análise estatísticas, os valores foram submetidos a transformação de radicial: $\sqrt{r + 0,05}$. Médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si ($p \leq 0,01$) pelo teste de Scott knott a 5% de probabilidade, em BIC.

^z AACPD – Área abaixo da curva de progresso da doença (mm²): valores médios ± valores de desvio médio. Médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si ($p \leq 0,01$) pelo teste de Scott knott a 5% de probabilidade, em BIC; Valores médios, em negrito, representam maior severidade.

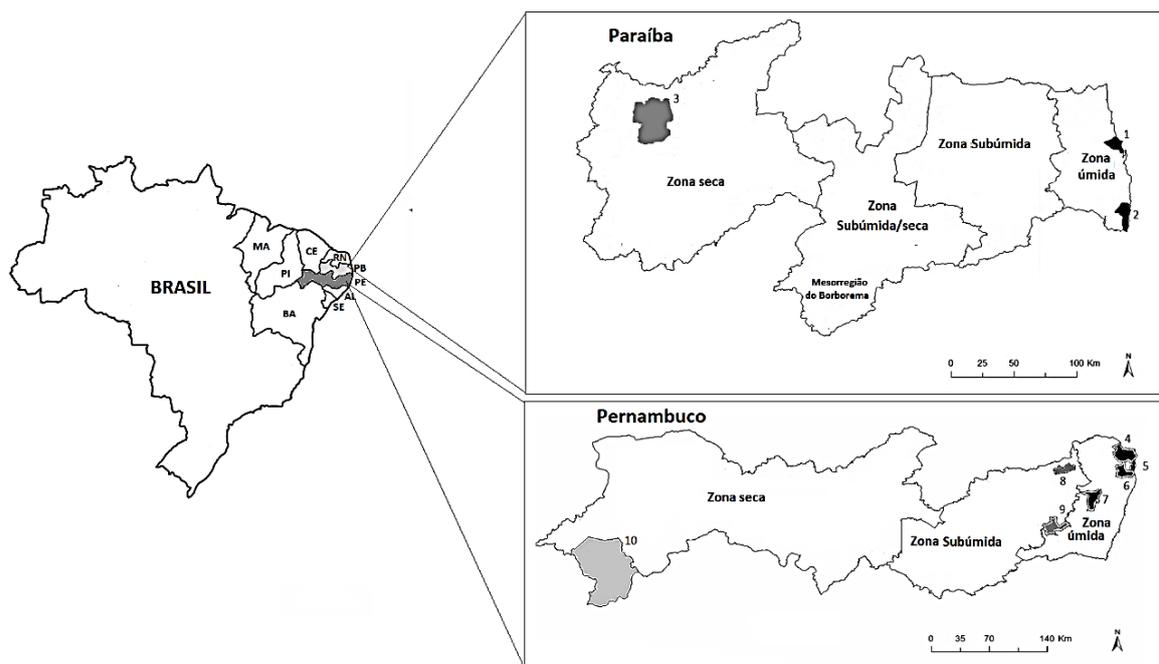


Fig. 1. Locais de coletas de isolados de *Lasiodiplodia*, associados com a queima das folhas e podridão basal de frutos de coqueiro, cultivados nos estados da Paraíba (1, 2 e 3) e Pernambuco (de 4 a 16), Nordeste brasileiro. Áreas destacadas por coloração diferente representam a localização geográfica dos municípios (Lucena-1, Pitimbu-2, Sousa-3, Goiana-4, Ilha de Itamaracá-5, Igarassu-6, Vitória de Santo Antão-7, Bom Jardim-8, Bonito-9, Petrolina-10) e sua disposição nas zonas climáticas (Köppen 1931).

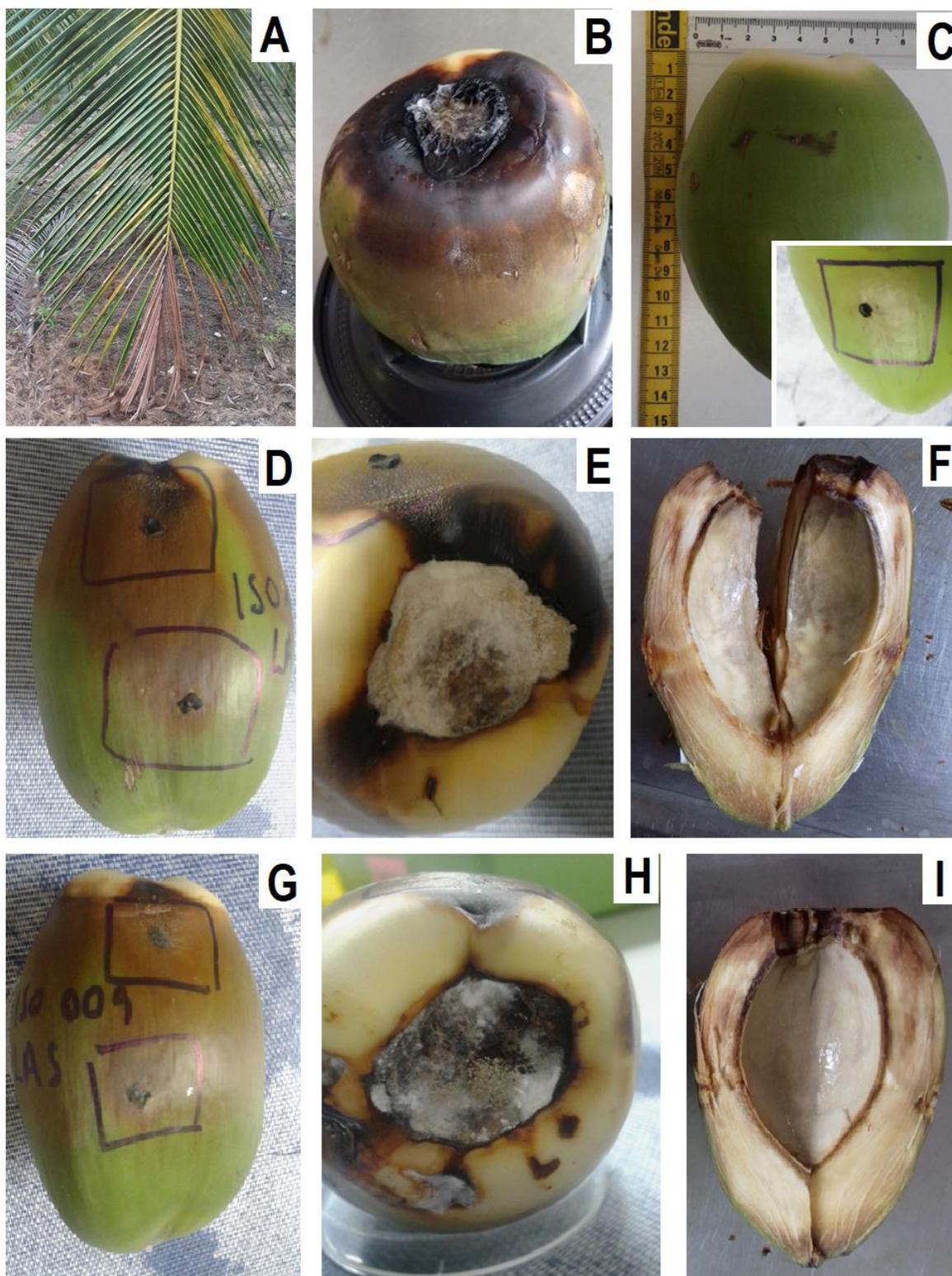


Fig. 2. Queima das folhas e podridão basal causados por espécies de *Lasiodiplodia* em folíolos (A) e em frutos (B) de coqueiro-anão-verde. Frutos assintomáticos inoculados com: fragmentos de meio de cultivo para o tratamento controle (C), *L. pseudotheobromae* (D, E, F) e *L. theobromae* (G, H, I). Sintomas de podridão, após sete dias de inoculação, com destaque aos sintomas na região peduncular (E e H) e internos no tecido do mesocarpo e endocarpo (F e I).

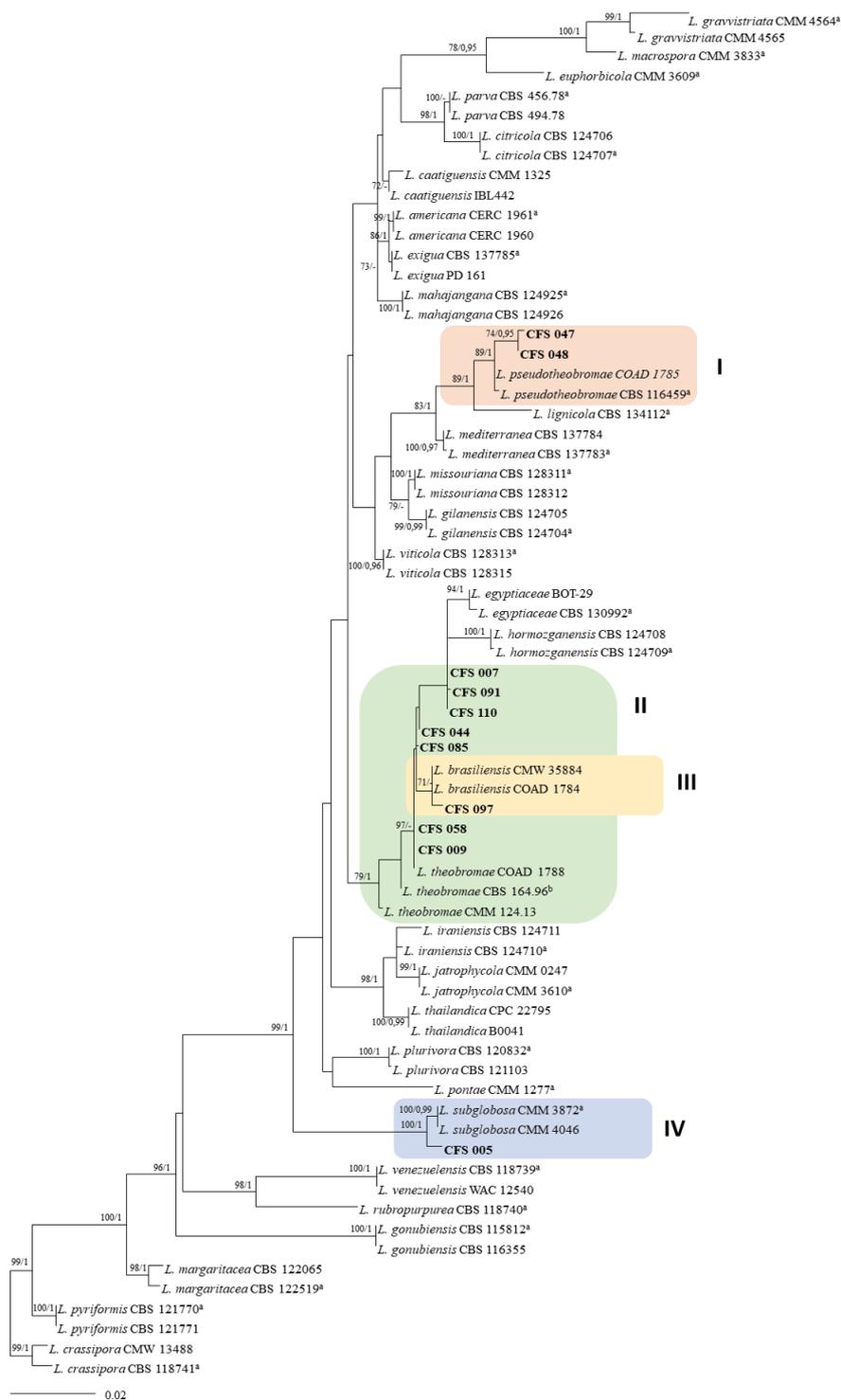


Fig. 3. Árvore de Máxima Verossimilhança – MV de espécies de *Lasiodiplodia*, com ocorrências descritas, baseada nas regiões gênicas ITS, *tef1-α*, *rpb2* e *tub2*, enraizada com *Lasiodiplodia crassispora* (CBS 118741 e CMW 13488). Os valores de Bootstrap acima de 70% (indicando ML/MP) e de probabilidade posterior Bayseana acima de 0,95 estão dispostos nos ramos, próximos aos nós. Sequências em negrito foram obtidas nesse estudo e encontram-se destacadas em quatro agrupamentos coloridos (I, II, III, IV).

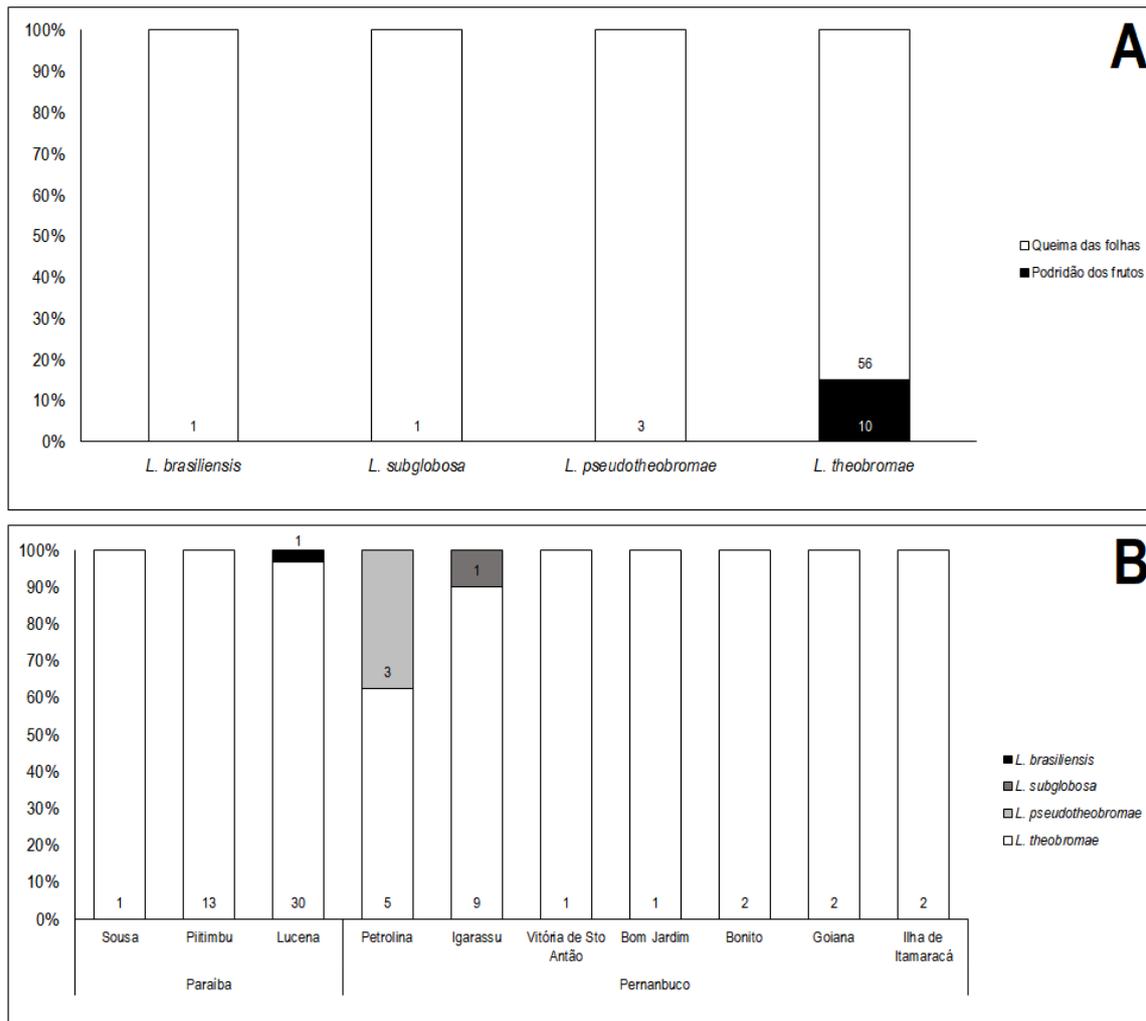


Fig. 4. Frequência de espécies de *Lasiodiplodia* associados com a queima das folhas e podridão frutos de coqueiro (A); Frequência e distribuição geográfica de espécies de *Lasiodiplodia* nos locais de coletas dos estados da Paraíba e Pernambuco. Nota: O número de isolados está na base das barras de frequência dos gráficos.

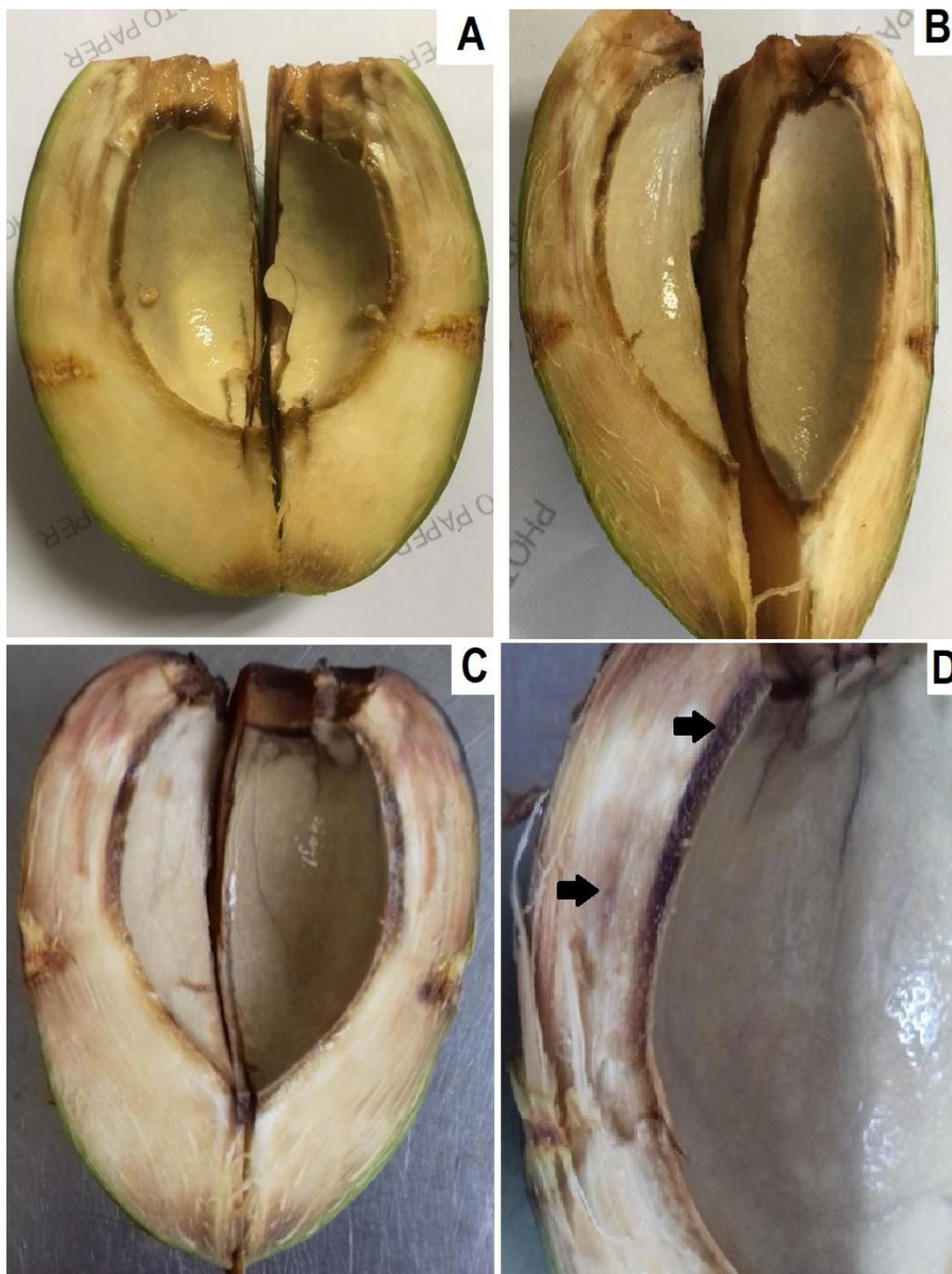


Fig. 5. Podridão basal em frutos de coqueiro-anão-verde: sintomas observados internamente por corte transversal, ao terceiro (A), quinto (B) e nono (C) dia após a inoculação de *L. theobromae* – CFS 009, com destaque as lesões no tecido do mesocarpo e endocarpo (D) indicadas por setas.

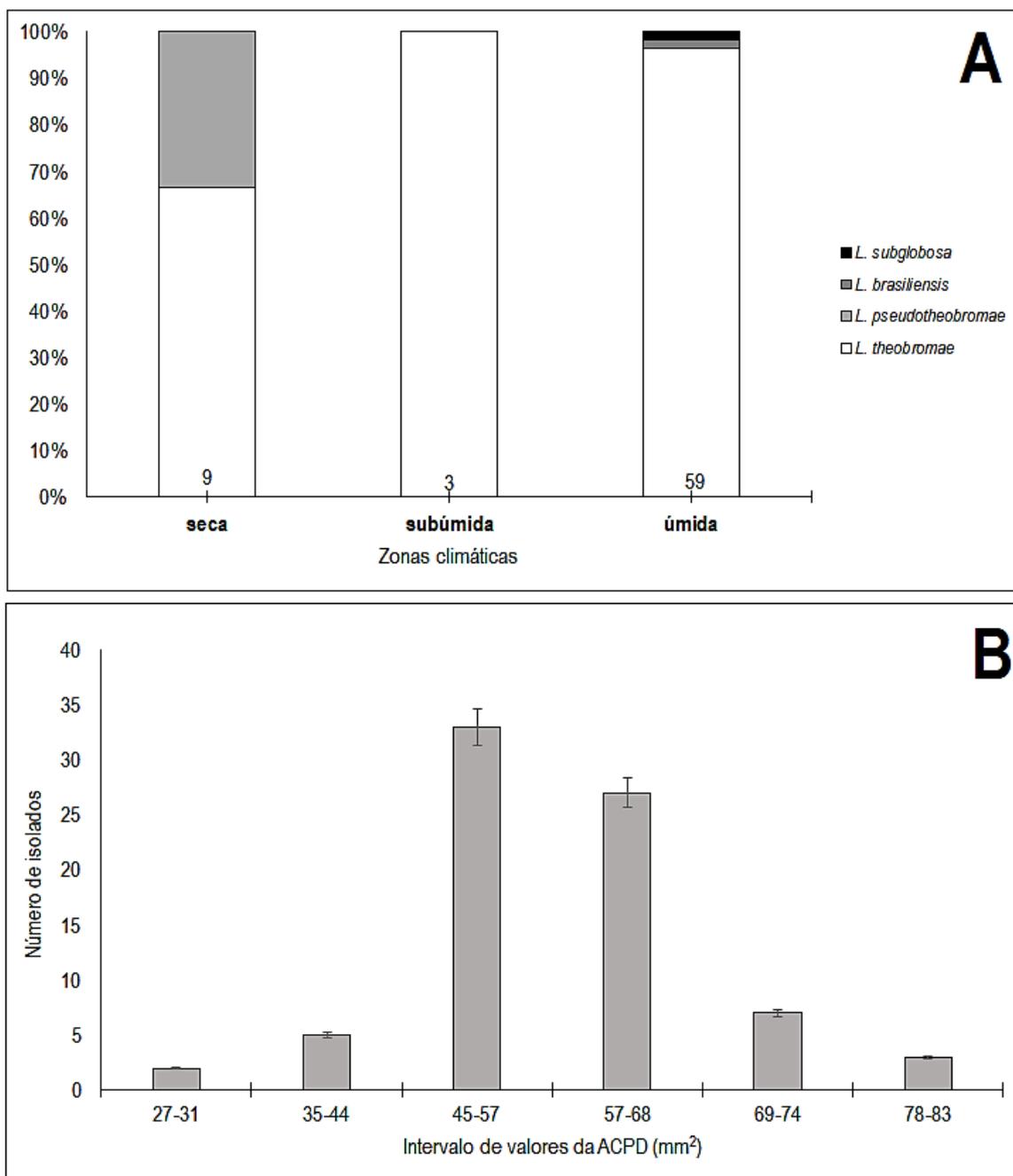


Fig. 6. Frequência das espécies e distribuição de isolados de *Lasiodiplodia* nas zonas climáticas de coletas (seca, subúmida e úmida), dos estados da Paraíba e Pernambuco (A); Agrupamento epidemiológico (conforme a severidade estimada pelos valores médios da área abaixo da curva do progresso da doença – AACPD) de isolados de *Lasiodiplodia* patogênicos a coco-anão-verde (B). Nota: O número de isolados, em cada região, está na base das barras de frequência do gráfico A.

CAPÍTULO III

Meyerozyma caribbica: ocorrência em coqueiro e potencial biocontrolador da podridão basal em coco-anão-verde

1 ***Meyerozyma caribbica*: ocorrência em coqueiro e potencial biocontrolador da podridão**
2 **basal em coco-anão-verde**

3 Iwanne Lima Coelho^{a, *}, Sérgio Batista Ramos^a, Julianne Maria Galindo Bezerra^a, Tereza
4 Cristina de Assis^b, Luiz Gonzaga Biones Ferraz^b, Valdir de Queiroz Balbino^c, Rejane
5 Pereira Neves^c, Delson Laranjeira^{a, *}

6

7 ^a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,
8 Dois Irmãos, CEP: 52171-900, Recife-PE, Brasil

9 ^b Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), Av. General San Martin, 1371, Bongi, CEP:
10 50761-000, Recife-PE, Brasil

11 ^c Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade
12 Universitária, CEP: 50670-901, Recife-PE, Brasil

13 * Autores correspondentes. Endereço de E-mail: iwannecoelho@gmail.com (Iwanne Lima
14 Coelho) e delson.laranjeira@ufrpe.br (Delson Laranjeira).

15

16 **Destaques**

17 - *M. caribbica* está, frequentemente, presente na microbiota do coqueiro.

18 - *M. caribbica* pode ser antagonico a espécies de *Lasiodiplodia*.

19 - Isolados de *M. caribbica* diferem quanto ao seu potencial antagonico a *Lasiodiplodia*.

20 - *M. caribbica* pode reduzir sintomas da podridão basal de coco-anão-verde.

21

22 **Resumo**

23 Problemáticas associadas à utilização produtos químicos nos processos fitossanitários,
24 principalmente no tocante a poluição ambiental, riscos à saúde animal e humana, bem como
25 a pressão de seleção sobre microrganismos fitopatogênicos, estão muito bem assentadas na

26 literarura. O uso de agentes de biocontrole – BCAs representa uma alternativa
27 ecologicamente sustentável, passível de aplicação em sistemas de manejo integrado ao
28 controle de fitopatógenos, principalmente àqueles relacionadas a doenças pós-colheita. A
29 identificação de leveduras, a partir de sequências da região ITS, indicou a espécie
30 *Meyerozyma caribbica* como a mais frequente na microbiota dos tecidos de casca e
31 mesocarpo de coco, cerca de 70%, colhidos em coqueirais brasileiros, em relação as demais
32 leveduras obtidas. Após teste de avaliação antagônica a *L. theobromae* e *L.*
33 *pseudotheobromae*, por ação de metabólitos difundidos em meio de cultivo *in vitro*, 23 cepas
34 de *M. caribbica* destacaram-se significativamente na inibição de crescimento micelial - PIC
35 acima de 73%. Quanto ao seu potencial de inibição da podridão basal em coco-anão-verde,
36 os isolados selecionados *in vitro* responderam de forma promissora, reduzindo sintomas
37 causados por *L. theobromae* no mesmo patamar do fungicidas difenoconazol e tiabendazol
38 e, sobre *L. pseudotheobromae*, algumas leveduras superaram até mesmo os resultados em
39 cocos tratados com os defensivos químicos. Ainda que preliminares, os resultados obtidos
40 impulsionam as expectativas acerca do biocontrole de *Lasiodiplodia* spp. Eles representam
41 os primeiros relatos da presença de *M. caribbica* na microbiota de coco, bem como do seu
42 potencial como BCAs na inibição *in vitro*, por ação indireta de compostos difundidos em
43 meio de cultivo, e redução dos sintomas da podridão basal em coco-anão-verde, causada por
44 *L. theobromae* e *L. pseudotheobromae*.

45

46 **Palavras-chave:** *Cocos nucifera*, microbiota do coqueiro, *Lasiodiplodia theobromae*,

47 *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, leveduras

48

49

50

51 1. Introdução

52 A segurança alimentar representa um dos muitos desafios globais reconhecidos para o
53 desenvolvimento sustentável da humanidade, especialmente vislumbrando o suporte
54 alimentar necessário ao futuro crescimento populacional, estimado em nove bilhões de
55 pessoas, nos próximos anos (Camargo et al., 2017; Mc Bratney et al., 2014).

56 Diante dessa realidade, evidencia-se a necessidade de melhorias dos métodos
57 convencionais de manejo dos recursos alimentares e do aproveitamento eficiente dos bens
58 naturais, como os microrganismos, tornando-se indispensável o desenvolvimento de práticas
59 resilientes.

60 O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é considerado a palmeira de maior importância
61 econômica (Monteiro et al., 2013). Mundialmente, movimenta cerca de 10 bilhões de dólares
62 com produção bruta de aproximadamente 2,9 milhões de toneladas de frutos. Apesar de
63 participar com 4,5% da produção mundial, na última década, a nucicultura contribuiu com
64 um significativo incremento de 212 milhões de dólares no PIB do Brasil (FAO, 2016; IBGE,
65 2016).

66 A produção brasileira de coco é destinada primariamente ao consumo *in natura* e/ou
67 industrialização (Holanda et al., 2008, Prades et al., 2016). Segundo dados da Associação
68 Brasileira de Refrigerantes e Bebidas não Alcoólicas – ABIR, em 2008, o consumo de água
69 de coco foi de 39 milhões de litros (ABIR, 2011), impulsionando a cocoicultura nacional e
70 propiciando o surgimento de novos investimentos agrícolas e agroindustriais (Cavalcante,
71 2015; Martins e Jesus Jr., 2011, Prades et al., 2016).

72 Os maiores problemas de cadeia produtiva do coco se encontram no campo. O aspecto
73 fitossanitário se destaca, visto que a ocorrência de pragas ou doenças pode ser limitante ao
74 desenvolvimento dessa atividade. A ocorrência *Lasiodiplodia* spp. (Ascomycota,
75 Pezizomycotina, Dothideomycetes, Dothid. Incertae sedis Botryosphaerales,

76 Botryosphaeriaceae) representa graves perdas econômicas decorrentes da podridão basal de
77 frutos (Rosado et al., 2016, Viana et al., 2002). Os danos causados por *Lasiodiplodia* estão
78 presentes desde o ataque nas folhas, pois a queima causa a perda de funções fisiológicas
79 delas, até a queda dos cachos. Ainda presos ao cacho, os frutos são expostos a *Lasiodiplodia*,
80 também responsável pela queima-das-folhas (Monteiro et al. 2013, Talamini et al. 2013), e,
81 eventualmente, apresentam os sintomas de podridão necróticas tanto em pré quanto em pós-
82 colheita (Halfeld-Vieira e Nechet, 2005), resultando no comprometimento do tecido do
83 endosperma e da reserva de água nos frutos.

84 Por ser um fungo de distribuição cosmopolita, capaz de causar muitas doenças em uma
85 variedade ainda maior de plantas, cultivadas ou não, e conseguir sobreviver como fungo
86 endofítico ou saprofítico (Alves et al., 2008; Cruywagen et al., 2017; Yang et al., 2017), o
87 desenvolvimento de medidas fitossanitárias eficientes contra *Lasiodiplodia* spp. é complexo.
88 Por consequência, o manejo dessas doenças está restrito ao uso massivo de produtos
89 químicos (Monteiro et al., 2013; Warwick e Abakerli, 2001).

90 No Brasil, alguns fungicidas a base de difenoconazol e tiabendazol estão
91 regulamentados pelo Ministério da agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA, para o
92 manejo da queima-das-folhas em coqueiro (AGROFIT, 2018). No entanto, o uso massivo de
93 produtos dessa natureza é preocupante, por apresentar ação sistêmica e elevada classificação
94 toxicológica quanto a poluição ambiental, representa riscos à saúde animal e humana, bem
95 como a pressão de seleção sobre microrganismos fitopatogênicos (Ballester-Tomás et al.,
96 2017; Talamine et al. 2013).

97 Pesquisas direcionadas ao uso de agente de biocontrole - BCAs têm sido uma
98 constante, a exemplo do uso de agentes de biocontrole como uma alternativa ecologicamente
99 sustentável (Bello et al., 2008; Droby et al., 2009; Hernández-Luzardo et al., 2007; Mahunu
100 et al., 2016; Sharma et al., 2009). Graças aos promissores resultados de capacidade

101 antagonica de leveduras, especialmente relacionada com patógenos pós-colheita, elas
102 despontam como biocontroladores de uma ampla gama de fitopatógeno, nos mais variados
103 frutos (Bautista-Rosales et al., 2013; Ballester-Tomás et al., 2017; Campos-Martínez et al.,
104 2016; Cao et al., 2013; Sharma et al., 2009; Zeng et al., 2015), por meio de diversos modos
105 de ação como a competição por nutrientes, a interação física direta com hifas fúngicas e a
106 produção de enzimas líticas celulares (Chanchaichaovivat et al., 2008; Coelho et al., 2003;
107 Huang et al., 2011; Lutz et al., 2013; Parafati et al., 2015).

108 Os principais focos das pesquisas com BCAs estão relacionados à seleção e aplicação
109 desses antagonistas, incluindo à sua capacidade de colonização rápida e ao desenvolvimento
110 competitivo nas superfícies alvo (Paiva et al., 2017). Leveduras isoladas a partir de superfície
111 de frutos e folhas têm ganhado destaque, devido, principalmente, a alta capacidade de
112 sobrevivência, sob condições adversas, colonização e desenvolvimento em feridas
113 superficiais (El-Tarabily e Sivasithamparam, 2006; Paiva et al., 2017; Parafati et al., 2015).

114 *Meyerozyma caribbica* (Vaughan-Mart., Kurtzman, S.A. Mey. & E.B. O'Neill)
115 Kurtzman & M. Suzuki), compõe o importante grupo de BCAs com alto potencial
116 biocontrolador à doenças pós-colheita (Bautista-Rosales et al., 2013; Mahunu et al., 2016;
117 Spadaro e Droby, 2016; Zhao et al., 2012). Além disso, apresenta elevado potencial
118 biotecnológico (N'guessan et al., 2011; Saucedo-Luna et al., 2011), considerando-se os
119 muitos produtos biocontroladores, à base de leveduras, comercializados fungos como os dos
120 gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Rhizopus* em diversas commodities
121 (Chanchaichaovivat et al., 2008; Droby et al., 2009; Sharma et al., 2009; Spadaro e Droby,
122 2016). Esse é um cenário favorável, que recentemente tem impulsionado o registro de novas
123 patentes internacionais (Dai et al., 2011; Luo et al., 2013; Prabhune et al., 2012; Zhang et
124 al., 2010).

125 Objetivamos nesse trabalho: i) Identificar e estimar a abundância natural de leveduras
126 presentes na microbiota de coqueiro, cultivados no Brasil; ii) Selecionar de isolados
127 antagonistas a *L. theobromae* e *L. pseudotheobromae in vitro*, por meio, prioritariamente, da
128 ação de compostos difundidos em meio de cultivo; iii) Avaliar a ação dos isolados
129 selecionado *in vitro* sobre a incidência e desenvolvimento da podridão basal em coco-anã-
130 verde, causada por *L. theobromae* e *L. pseudotheobromae*.

131

132 **2. Material e métodos**

133 *2.1. Obtenção e preservação de isolados*

134 Leveduras foram isoladas a partir de fragmentos de tecidos de coco-anão-verde
135 assintomáticos (fruto), coletados durante o período de fevereiro de 2015 a fevereiro de 2016,
136 em coqueirais comerciais e particulares estabelecidos nos estados de Rondônia (Jarú), Bahia
137 (Cruz das almas e Salvador), Paraíba (Lucena e Pitimbu), Pernambuco (Bonito, Goiana, Ilha
138 de Itamaracá, Igarassu, Petrolina, Pombos e Vitória de Santo Antão) e Rio Grande do Norte
139 (Nísia Floresta) (Fig. 1).

140 Em cada fruto coletado, seis fragmentos, de aproximadamente 0,5 cm² abrangendo a
141 casca e o mesocarpo, foram retirados e adicionados em tubos de ensaio contendo 10 mL de
142 água destilada esterilizada – ADE, acrescida de clorafenicol (50 mg L⁻¹), e submetidos a
143 banho de ultrassom (Quimis, Brasil) por 25 minutos. Após agitação dos tubos em agitador
144 tipo vórtex, alíquotas de 200 µL foram semeadas em placas de Petri, contendo meio extrato
145 de levedura, peptona, dextrose e ágar -YPD ágar (Sigma Aldrich, USA), acrescido de
146 cloranfenicol (50 mg L⁻¹) e as placas incubadas a 25 ± 2° por 48-72 h. Colônias emergentes
147 foram classificadas morfológicamente, purificadas em placas contendo YPD e avaliadas
148 quanto a presença de capsulas celular e capacidade de crescimento a 37° C.

149 Dois isolados representativos, um *L. pseudotheobroae* – CFS 009 e um *L. theobromae*
150 – CFS 047, agentes causais da podridão basal de coco-anão-verde (Coelho, 2018), foram
151 recuperados da Coleção CFS-LAFSOL/UFRPE e cultivados em meio de cultivo batata
152 dextrose ágar – BDA (Kasvi[®], São José dos Pinhais, Brasil) acrescido de Cloranfenicol (5
153 mg L⁻¹).

154 Todos os isolados obtidos foram acondicionados a 25 °C, em tubos criogênicos
155 graduados de rosca externa (Kasvi[®], São José dos Pinhais, Brasil), contendo YEPD,
156 acrescido de óleo mineral (Sigma Aldrich, USA) após crescimento das colônias (Mariano et
157 al., 2007), e em água destilada esterilizada (Castellani, 1963). Posteriormente, depositados
158 na Coleção de Fungos de Solo - CFS do laboratório de Fungos de Solo da Universidade
159 Federal Rural de Pernambuco – LAFSOL/UFRPE e, as culturas representativas, depositadas
160 na Coleção de Culturas Pe. Herbário Camille Torrand (URM), da Universidade Federal de
161 Pernambuco.

162

163 2.2. Caracterização de colônias

164 Para avaliar possível capacidade patogênica humana, leveduras semeadas em YEPD
165 ágar foram mantidas em estufa microbiológica a 37 °C, por 48 h, e avaliadas como
166 parâmetros: capacidade de crescimento e colonização. Posteriormente, a presença de células
167 capsuladas, indicativas de leveduras pertencentes ao gênero *Cryptococcus*, potencialmente
168 patogênico, foi observada em microscópio (Carl Zeiss, Berlim, Germany), por objetivas de
169 10x e 40x, em preparações microscópicas contendo tinta nanquim e porções de crescimento
170 das colônias.

171 Após cinco dias de crescimento em YPD ágar, colônias individualizadas de leveduras
172 foram visualizadas sob estereomicroscópio (Carl Zeiss, Berlim, Germany) e caracterizadas

173 macroscopicamente quanto a sua diversidade morfológica segundo: pigmentação das
174 colônias (Rayner, 1970), aparência, forma, borda e superfície.

175

176 2.3. *Identificação Molecular*

177 Os isolados foram cultivados, a partir de uma colônia pura, em YPD ágar por cinco
178 dias a 28 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 12 h. Uma porção de crescimento foi transferido para
179 um almofariz gelado, adicionado de 600 µl de tampão de extração e moído com auxílio de
180 pistilo, para a extração de DNA genômico, usando o protocolo CTAB (brometo de cetil
181 trimetilamônio) descrito por Murray e Thompson (1980), com pequenas modificações. As
182 concentrações de DNA obtidas foram aferidas em espectrofotômetro NanoPhotometer
183 UV/Vis (IMPLEN, Korea) e diluídas para 25 ng / µL para reações de PCR.

184 A região do espaço de transcrição interna 1 e 2, incluindo o gene 5.8S rRNA (ITS), foi
185 amplificada utilizando primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCCG-3') e ITS4 (5'-
186 TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al. 1990). As amplificações via PCR foram
187 preparadas em reações com volume final de 25 µl contendo: 2 µl de DNA tamplate, 1 U
188 Platinum® Taq DNA Polymerase; 2,5 µl 10X PCR Buffer; 2 µl magnesium chloride 50 mM;
189 2,5 µl nucleotídeo mix (Thermo Scientific, Waltham, USA); 2 µl de cada primer forward e
190 reverse, a 10 µM (sintetizados por Invitrogen™, Carlsbad, USA), 1 µl de dimethyl sulfoxide
191 - DMSO (Synth, São Paulo, BR) e 10,85 µl de água ultrapura.

192 As ciclagens térmicas das PCR foram realizadas em SimpliAmp™ Thermal Cycler
193 (Thermo Scientific, Waltham, USA) com desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguida
194 por 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 57 °C por 1min e 72 °C por 1 min, com extensão final de
195 72 °C por 10 min. Os produtos de PCR foram corados com SYBR® green (Thermo Scientific,
196 Waltham, USA), e visualizados em gel de agarose (1%), fotodocumentados sob luz UV.

197 Os produtos de PCR bem-sucedidos foram purificados com kit de purificação
198 PureLink™ PCR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA), de acordo com as
199 especificações do fabricante, e sequenciados por eletroforese capilar em sequenciador
200 automático ABI3500, utilizando polímero POP7 e BigDye Terminator 3.1 (Applied
201 Biosystems, Foster City, CA, EUA) e os mesmos conjuntos de iniciadores utilizados para
202 amplificação por PCR.

203 As sequências foram montadas em contigs, editadas usando MEGA 6.06 (Tamura et
204 al. 2013), as sequências consenso comparadas com as sequências referências de *Pichia* e
205 *Meyerozyma* ex-tipo recuperadas do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As novas
206 sequências, incluídas nesse estudo, foram depositadas no GenBank (Tabela 1).

207 Os alinhamentos múltiplos de sequências (MSAS) foram realizados no MAFFT versão
208 7 (Katoh e Toh 2013) usando ferramentas de ajuste de direção das sequências e estratégia
209 automática, seguido por novo alinhamento no portal GUIDANCE2 server
210 (<http://guidance.tau.ac.il/ver2/>) (Sela et al. 2015).

211 A filogenia foi inferida comparando-se os agrupamentos filogenéticos por Análise de
212 Máxima Verossimilhança - MV e Inferência Bayesiana - IB aproximada no portal CIPRES
213 (<https://www.phylo.org>). As análises de ML foram estimadas com a ferramenta RAxML-
214 HPC2 on XSEDE, modelo GTR GAMMA, e a melhor topologia de árvore atrelada aos
215 valores de Bootstrat em 1000 pseudoreplicatas. Para IB, o modelo de evolução HKY+I+G
216 foi determinado no MrMODELTEST 2.3 (Posada e Buckley, 2004), de acordo com o
217 Critério de Informação Akaike (AIC), e as estimativas filogenéticas foram inferidas
218 empregando-se o método da Cadeia de Markov e Monte Carlo-MCMC, pela ferramenta
219 MrBayes on XSEDE, no portal web CIPRES. Quatro cadeias MCMC foram executadas
220 simultaneamente, a partir de árvores aleatórias para 50 milhões de gerações, amostradas a
221 cada 1.000 gerações, totalizando 50.000 árvores. As probabilidades posteriores-PP foram

222 calculadas após o descarte dos primeiros 25% das gerações como burn-in e seleção de uma
223 árvore de consenso, gerada a partir das árvores restantes. As árvores enraizadas com *Candida*
224 *suratensis* (CBS 10928) foram visualizadas utilizando a ferramenta FigTree Versão 1.4.2
225 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>), exportadas e editadas no software PowerPoint (Office - Microsoft
226 ©).

227 Com base nos resultados das filogenias obtidas por MV e IB da região ITS, os
228 agrupamentos filogenéticos específicos foram determinados segundo o conceito de
229 Reconhecimento de Espécies Filogenéticas Genealógicas e os critérios de concordância e
230 não discordância entre genealogias (Taylor et al. 2000).

231

232 2.4. *Screen in vitro*

233 No primeiro teste *in vitro*, 54 leveduras foram cultivadas, individualmente, em placas
234 de Petri contendo meio YEPD ágar por cinco dias a 28 ± 2 °C e, posteriormente, porções do
235 crescimento puro foram transferidos para tubos esterilizados, de polipropileno para
236 centrifugação tipo falcon (50 mL - Kasvi[®], São José dos Pinhais, Brasil) contendo 25 mL de
237 meio líquido YEPD.

238 Após seis dias de incubação em agitação constante (80 rpm) a 28 ± 2 °C, os tubos foram
239 centrifugados a 10.000 rpm por 6 min, o sobrenadante de cada isolado transferido a um novo
240 tubo tipo falcon estéril e adicionou-se a cada sobrenadante meio ágar-ágar (20 g de ágar L-
241 ¹) fundente, completando um volume final de 50 mL. A suspensão foi homogeneizada por
242 inversão de tubo, transferida para placas de Petri estéreis (10 mL/placa) e solidificada a
243 temperatura ambiente. Após solidificação, uma camada de BDA + Cloranfenicol (5 mg L⁻¹)
244 foi depositada sobre a de YEPD (10 mL/placa), formando uma dupla camada de meios,
245 impedindo o contato direto da levedura sobre o fungo fitopatogênicos e favorecendo a

246 difusão de composto potencialmente antimicrobianos nesse meio. Para tratamento controle,
247 utilizou-se placas com uma camada meio YEPE estéril e uma de BDA, como descrito acima.

248 Após solidificação completa dos meios, as placas foram incubadas a 28 ± 2 °C, para
249 desenvolvimentos leveduriformes e, 48 h depois, um disco cilíndrico de meio BDA contendo
250 estruturas de *L. theobromae* - CFS 009 (0,5 cm Ø), a partir de cultivo com sete dias, foi
251 depositado no centro de cada placa. O delineamento experimental foi inteiramente
252 casualizado – DIC, com cinco repetições/tratamento.

253 Após dois dias de incubação (28 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 horas) foram aferidos,
254 a cada 24 h, os valores médios do diâmetro de crescimento micelial do patógeno, e
255 determinados o índice de velocidade de crescimento micelial – IVCM (mm h^{-1}) e
256 porcentagem de inibição de crescimento micelial – PIC (%) pelas equações: $IVCM = \frac{cf-ci}{t}$
257 e $PIC = \frac{Cc-Cf}{Cc} * 100$, sendo Ci = crescimento inicial, Cf = crescimento final, Cc =
258 Crescimento final tratamento controle e t = intervalo de avaliação.

259 No segundo teste, 23 isolados pré-selecionados no teste 1, nas mesmas condições
260 experimentais descritas acima, foram avaliados sobre os fitopatógenos *L. theobromae* - CFS
261 009 e *L. pseudotheobromae* – CFS 047.

262

263 2.5. Controle da podridão basal em coco-anão-verde

264 Os 23 isolados selecionados no teste *in vitro* foram avaliados quanto a capacidade de
265 reduzir a incidência e/ou severidade da podridão basal, causada por *L. theobromae* - CFS
266 009 e *L. pseudotheobromae* – CFS 047, em frutos assintomáticos de coqueiro (variedade
267 anã, cultivar verde), com aproximadamente quatro meses do estágio de maturação fisiológica
268 e assintomáticos.

269 Os frutos, provenientes da Estação Experimental de Itapirema do Instituto
270 Agrônômico de Pernambuco em Goiana, PE, foram desinfestados superficialmente, por
271 lavagem com detergente neutro comercial e água corrente. Posteriormente, foram imersos
272 em solução de NaOCl 0,5% por 20 min, lavados em água corrente e secos a temperatura
273 ambiente por 24 h.

274 As suspensões de células de leveduras, preparadas em ADE (1×10^7 células mL⁻¹) e
275 acrescidas do produto químico adjuvante Assist[®] (1%) foram aplicadas por aspersão sobre a
276 superfícies dos frutos, até o ponto de escorrimento (aproximadamente 10 mL/fruto). Como
277 padrão de controle químico, utilizou-se aplicação de fungicidas a base dos ingredientes
278 ativos – i.a. difenoconazol (0,05 mL i.a. L⁻¹) e tiabendazol (0,48 ml i.a. L⁻¹), segundo
279 regulamentação do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento brasileiro – MAPA
280 aos cultivos de coqueiros. Os frutos foram incubados a temperatura ambiente e, após 24 h,
281 inoculados com *L. theobromae* - CFS 009 e *L. pseudotheobromae* – CFS 047, cultivados em
282 BDA por 10 dias a 28 ± 2 °C sob fotoperíodo de 12 h.

283 Cada fruto (quatro frutos/isolado) foi perfurado, em três pontos equidistantes,
284 aproximadamente 4 mm de profundidade, com auxílio de um agulhão pontiagudo estéril de
285 3 mm de diâmetro. Discos cilíndricos de BDA (Ø 6 mm), contendo estruturas reprodutivas
286 do fungo foram depositados sobre o ponto de perfuração. No controle positivo o patógeno
287 foi inoculado em frutos não tratados com suspensões de leveduras.

288 A área inoculada foi recoberta por fita adesiva crepe (fragmentos de 5 cm x 50 mm,
289 marca 3M[®]) e os frutos foram acondicionados sob câmara úmida em sacos plásticos
290 transparentes (30x40 cm), a 28 ± 2 °C e 55 ± 4 % de umidade. O delineamento experimental
291 foi em blocos inteiramente casualizado – BIC, com três repetições.

292 Após 48 h de incubação, os frutos foram mantidos em temperatura ambiente e avaliou-
293 se, a cada dois dias durante nove dias, a incidência pela presença ou não de sintomas típicos.

294 A severidade foi quantificada de acordo com o diâmetro das lesões, pela média de dois eixos
295 perpendiculares da lesão superficial. A taxa de progresso da doença – r foi calculada segundo
296 a equação linear $Y_t = Y_0 + Y_0 \cdot r \cdot t$ (Y = diâmetro de lesão, r = taxa de progresso da doença e
297 t = tempo de avaliação), a área abaixo da curva de progresso da doença – AACPD foi
298 determinada pela soma das médias de severidade em cada intervalo de avaliação e a
299 porcentagem de inibição da podridão basal – PID (%) pela equações $PID = \frac{ADc - ADf}{ADc} * 100$,
300 (ADc = valor de AACPD controle e ADf = AACPD tratamento).

301

302 2.6. Análises estatísticas

303 As diferenças de potencial biocontrolador dos isolados antagonistas, sobre *L.*
304 *theobromae* - CFS 009 e *L. pseudotheobromae* – CFS 047, *in vitro*, e do controle da podridão
305 basal em frutos foram avaliadas por análises de variância – ANOVA das médias de IVCM
306 e/ou PIC e de AACPD, respectivamente. Nas análises significativamente diferentes ($p \leq$
307 0,05), as médias foram comparadas pelo teste Scott knott a 5 % de probabilidade, utilizando
308 software Sisvar v5.6 (Ferreira, 2011).

309

310 3. Resultados

311

312 3.1. Obtenção, caracterização e identificação de isolados

313 Um total de 54 isolados, apresentando colônias e células de aspecto leveduriformes,
314 foram obtidos a partir da casca e do mesocarpo de frutos assintomáticos. Todos foram
315 submetidos aos testes de caracterização de colônias e identificação molecular.

316 Cinco isolados de leveduras apresentaram capacidade de crescimento e
317 desenvolvimento *in vitro* a 37° C e foram, portanto, descartada. Em nenhuma das

318 preparações microscópicas com tinta nanquim foi observado halo ao redor da célula
319 leveduriformes, o que sinaliza a presença de células encapsuladas.

320 Em relação a diversidade macroscópica das colônias leveduriformes, observou-se
321 colônias circulares, colorações de branco a bege e aparência fosca ou brilhante, com
322 diferentes combinações quanto ao tipo de borda e elevação. Morfologicamente as colônias
323 também apresentaram alta variabilidade (Fig. 2).

324 A partir das PCR, obteve-se *amplicons* sequenciados de aproximadamente 560 pb. O
325 *dataset* das sequências alinhadas abrangeu 106 *táxons*, entre os isolados utilizados nesse
326 estudo e os representantes de referência, totalizando 610 caracteres, sendo 274 conservados,
327 300 parcimoniosamente informativos e 336 variáveis. Pela análise de ML e IB, 54 isolados
328 foram agrupados em um único clado, com representantes de *M. caribbica*, suportados por
329 valores de Bootstrap e probabilidade posterior acima de 70 e/ou 0,95, respectivamente (Fig.
330 3). Todas as sequências obtidas nesse estudo foram depositadas no GenBank (Tabela 1).

331

332 3.4. *Screening in vitro*

333 Todos os 54 isolados testados atuaram reduzindo os valores de IVCN de *L.*
334 *theobromae*, proporcionando valores significativos de PIC, em relação ao tratamento
335 controle, e 23 deles destacaram-se significativamente ao propiciar valores de PIC acima de
336 73% (Tabela 2).

337 No segundo experimento, utilizando os 23 isolados de *M. caribbica*, constatou-se
338 novamente que os valores de IVCN de ambas as espécies de *Lasiodiplodia*, foram reduzidos
339 nos tratamentos com leveduras. Essa ação inibitória partiu de 46 e 55% (Tabela 3) e, pelo
340 teste de comparação de médias, os isolados de *M. caribbica* foram agrupadas em dois grupos,
341 quanto aos valores de PIC sobre *L. theobromae* e *L. pseudotheobromae* (Figura 4).

342

343 3.5. Controle da podridão basal em coco-anão-verde

344 Para a podridão causada por *L. theobromae*, todos os tratamentos utilizando *M.*
345 *caribbica* reduziram taxa de progresso da doença em relação ao tratamento controle, assim
346 como observado os controles químicos 1 e 2, utilizando difenoconazol e tiabendazol,
347 respectivamente. Em contrapartida, em quase todos os tratamentos, as taxas de progresso da
348 podridão causada por *L. pseudotheobromae* foram ainda menores, superando até mesmo o
349 controle observados pelas taxas nos tratamentos químicos.

350 Para ambas espécies fitopatogênicas avaliadas, mesmo apresentando elevado potencial
351 *in vitro*, houveram isolados que atuaram sinergicamente aos patógeno, incrementando no
352 processo de severidade da doença e proporcionando valores de AACPD acima da média do
353 tratamento controle. Atrelado a redução de *r*, obteve-se valore de PID a partir de 14 a 38 %,
354 para *L. theobromae* e de 33 a 43 % para *L. pseudotheobromae* (Figura 5), com destaque de
355 nove isolados de *M. caribbica* que aturam nessa redução para ambas as espécies (Tabela 4).

356

357 4. Discussão

358

359 Leveduras são componentes habituais, presentes na microbiota superficial de plantas,
360 e funcionam como moderadoras de fitopatógenos (Bello et al., 2008) e o coqueiro não
361 poderia estar aquém dessa diversidade microbiótica. Diante das quantidades, viabilidades e
362 variabilidades de isolado de *M. caribbica* utilizados nesse estudo, potencialmente
363 biocontroladores da podridão basal em coco causada por *L. theobromae* e *L.*
364 *pseudotheobromae*, concorda-se que as melhores fontes de obtenção de microrganismos
365 antagonicos são os ambientes onde esses microrganismos encontram-se naturalmente e,
366 possivelmente, interagindo com fitopatógenos (Bello et al., 2008; Janisiewicz e Korsten
367 2002).

368 Particularmente, regiões de clima tropical proporcionam condições favoráveis ao
369 desenvolvimento e manutenção de rica diversidade de leveduras (Grondin et al., 2015) pois,
370 mesmo em substratos secos, a exemplo da casca do coco, muitas espécies são capazes de
371 crescer rapidamente e colonizar por longos períodos (Parafati et al., 2015).

372 Tradicionalmente, a identificação de leveduras é realizada a partir de características
373 morfológicas, formação de esporos, assimilação e fermentação de diferentes fontes de
374 carbono (Barnett et al., 2000; Kurtzman, 2015). Em face das inerentes limitações
375 relacionadas ao uso exclusivo de marcadores fenotípicos, tais como: a semelhança entre
376 grupos próximos (Cornet et al., 2011; Romi et al., 2014) e variabilidade em indivíduos de
377 uma mesma espécie, as abordagens filogenéticas tornaram-se uma ferramenta taxonômica
378 indispensável.

379 Nas últimas décadas, a aplicação integrada dessas análises propiciou a descoberta e
380 descrição de centenas de novas leveduras (Kurtzman, 2015), sendo mencionado, na maior
381 parte dos estudos, o uso de marcadores direcionados as regiões D1/D2 da pequena
382 subunidade rRNA (Daniel et al., 2009) e uso da região ITS (ITS1- 5,8s-ITS2) só quando
383 necessário (Brysch-Herzberg e Seidel, 2015).

384 Particularmente, sobre *Meyerozyma*, estudos recentes comprovam que espécies desse
385 gênero, além de difícil diferenciação pelos métodos fenotípicos, não são separadas
386 filogeneticamente a partir das sequências D1 / D2, mas podem ser facilmente destacadas a
387 partir da região ITS (Cornet et al., 2011; Romi et al., 2014). Essa assertiva reitera os
388 resultados de identificação obtidos nesse estudo, tendo em vista a variabilidade fenotípica
389 observadas nas colônias dos isolados de *M. caribbica* e a completa separação observada
390 entre os grupos de *M. caribbica* e *M. guilliermondii*, bem como aos demais grupos
391 relacionados ao gênero *Pichia*.

392 *M. caribbica*, identificada e classificada anteriormente como *Pichia caribbica*
393 (Vaughan-Martini et al., 2005) é um promissor agente de controle biológico graças a baixa
394 toxicidade, possibilitando inclusive que seja empregada biotecnologicamente na produção
395 de bebidas alcoólicas como a tequila (Saucedo-Luna et al., 2011) e o tchapalo (N'guessan et
396 al., 2011) (Bautista-Rosales et al., 2013). Recentemente, alguns pesquisadores têm relatado
397 seu potencial biocontrolador em pós colheita, principalmente sobre fungos filamentosos
398 causadores de podridões (Bautista-Rosales et al., 2013; Xu et al., 2013; Zhao et al., 2012)
399 estendendo sua eficácia a compostos adjuvantes como ácido fitico (Mahunu et al., 2016).

400 O controle dos agentes fitopatogênicos naturais em pós-colheita é um dos maiores
401 desafios da produção e industrialização de frutas (Paiva et al., 2017), principalmente diante
402 a urgente necessidade de desenvolvimento de medidas fitossanitárias ambientalmente
403 viáveis. Nesse contexto, o uso de agentes biocontroladores, conhecidos como BCAs, tem
404 ganhado espaço (Droby et al., 2009; Hernández-Luzardo et al., 2007; Huang et al., 2011), e
405 o isolamento e triagem de BCAs despontam como primórdios decisivos nesse processo.

406 A seleção preliminar de BCAs diretamente em tecido de hospedeiros, entre uma
407 grande quantidade de isolados, pode tornar-se dificultosa ou mesmo impraticável, diante das
408 dificuldades logísticas, de execução e dos altos custos envolvidos. Para contornar essa
409 situação, a seleção desses organismos *in vitro* pode ser considerada uma alternativa
410 duplamente viável, principalmente quando se avalia, além da resposta biocontroladora, um
411 maior número de representantes fitopatogênicos de interesse.

412 Nas circunstâncias desse estudo, a seleção preliminar, baseada na avaliação da ação de
413 compostos antimicrobianos produzidos por *M. caribbica* e difundidos no meio de cultivo,
414 sobre o desenvolvimento dos fitopatógenos, mostrou-se reprodutível e significativa,
415 inclusive à caracterização *in vitro* desse potencial sobre diferentes fitopatógenos,

416 pertencentes ao mesmo complexo patológico, como em *Lasiodiplodia* causando a podridão
417 basal em coco-anão-verde.

418 O controle de fungos fitopatogênicos por leveduras geralmente envolve vários modos
419 de ação, incluindo competição por nutrientes e espaço (Chanchaichaovivat et al., 2008;
420 Droby et al., 2009). Assim como a competição, a inibição do crescimento micelial fúngico,
421 por ação de metabolitos difusíveis e/ou voláteis, é um dos valiosos recursos de avaliação *in*
422 *vitro* (Huang et al., 2011; Lutz et al., 2013) ou, de forma generalizada, a produção e ação de
423 compostos antimicrobianos (Ceugniz et al., 2015; Sharma et al., 2009; Ruiz-Moyano et al.,
424 2016).

425 Embora ocorram efeitos cumulativos de vários mecanismos de controle detectados *in*
426 *vitro*, nem sempre esses efeitos podem ser expressados *in vivo* (Droby et al., 2009). Assim,
427 apesar de válidos como métodos seletivos, detecções de mecanismos de controle *in vitro* não
428 substituem os testes diretos *in vivo*, sendo, portanto, indispensáveis os testes de antagonismo
429 em hospedeiros específicos.

430 Leveduras que proporcionam os melhores resultados *in vitro*, por exemplo, podem não
431 ser efetivas *in vivo*. Essa assertiva, assim como relatada por Parafati et al., (2015), em seus
432 estudos acerca dos mecanismos de biocontrole de leveduras sobre *Botrytis cinerea*,
433 compreende os resultados observado nesse estudo. Mesmo utilizando apenas isolados
434 notáveis quanto ao seu potencial antogônico *in vitro* sobre o desenvolvimento de *L.*
435 *pseudotheobromae* e *L. theobromae*, nem todas as cepas de *M. caribbica* expressaram
436 características antagônicas desejáveis sobre os mesmos fitopatógenos, associados ao
437 hospedeiro.

438 Segundo Droby et al. (2009), a secreção de substâncias antimicrobianas (solúvel em
439 água ou volátil) e, talvez, a produção de metabolitos específicos ativos, podem ser induzidos
440 após a interação do antagonista com os tecidos de frutos/plantas.

441 O destaque, de cepas de *M. caribbica* não apenas inibindo o progresso da podridão
442 basal em coco-anão-verde, mas equiparando-se e/ou superando os resultados observados em
443 frutos tratados com fungicidas, assinalam, além da possível ação competitiva, aceitável
444 secreção ou ativação de substâncias antimicrobianas, como observado nos resultados *in vitro*
445 nesse estudo.

446 Resultados dessa natureza foram similares a resultados apontados por estudos
447 anteriores, em que isolados de *Meyerozyma* atingiram níveis de controle significativamente
448 semelhantes aos fungicidas químicos indicados como padrão de controle. A saber: *M.*
449 *caribbica*, no controle da antracnose em manga (Bautista-Rosales et al., 2013) e *M.*
450 *guilliermondii*, no controle de *Penicillium digitatum* em citrus (Droby et al., 1993).

451 Diante dos muitos mecanismos de ação que podem ser desempenhados (Paiva et al.,
452 2017) e da redução dos riscos ambientais de indução de resistência de fitopatógenos, atrelado
453 a pressão de seleção exercida por ação de agrotóxicos (Campos-Martínez et al., 2016; Cao
454 et al., 2013), o uso de leveduras, constituindo um biocontrolador natural, representa uma
455 vantagem ambiental indiscutível sobre os fungicidas sintéticos (Bautista-Rosales et al.,
456 2013; Hernández-Luzardo et al., 2007).

457 A potencialidade ao controle de doenças em pós-colheita, bem como o aumento do
458 número de produtos formulados e registrados, disponíveis comercialmente, substancia o
459 biocontrole, a partir de leveduras, como uma realidade promissora e aplicável. Além disso,
460 as pesquisas impulsionam novas expectativas e justificam o uso de leveduras como
461 possibilidade ambientalmente sustentável.

462 Essas expectativas são positivamente incrementadas, diante da possibilidade de
463 biocontrole de um fitopatógeno como *Lasiodiplodia*, posto as graves perdas econômicas
464 associadas à sua ocorrência (Monteiro et al., 2013; Rosado et al., 2016; Talamini et al.,
465 2013), a sua natureza heterogênea, que o favorece patogenicamente sobre uma ampla gama

466 de hospedeiros, em diferentes facetas sintomatológicas (Alves et al. 2008, Cruywagen et al.
467 2017).

468 Os resultados assinalados no presente estudo, representam os primeiros relatos de *M.*
469 *caribbica*, presente naturalmente na microbiota de coco, bem como do seu potencial como
470 BCAs na inibição de *L. theobromae* e *L. pseudotheobromae*, por ação indireta de compostos
471 difundidos em meio de cultivo, e na redução dos sintomas da podridão basal em coco-anão-
472 verde.

473 Esses resultados preliminares abordam informações relevantes à comunidade
474 científica, assinalar isolados potencialmente aplicáveis ao manejo da podridão basal de coco
475 e oportunizam novas pesquisas, principalmente focadas em mecanismos de ação específica,
476 produção de compostos de interesse biotecnológico, associações com produtos químicos e
477 formulações, assim como sua aplicabilidade efetiva em manejos fitossanitários.

478

479 **Agradecimentos**

480 Esse trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
481 Tecnológico (CNPq-Brasil). Os autores agradecem ao Assistente de Pesquisa José Carlos
482 Barbosa Nascimento, a Estação Experimental de Itapirema do Instituto Agrônomo de
483 Pernambuco, ao Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de
484 Pernambuco – LAFBAC e ao Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva da
485 Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, pelo auxílio durante as coletas em campo,
486 disponibilização de material vegetal utilizado nos experimentos, disponibilização de
487 estrutura física e pelos serviços de análises genéticas, respectivamente.

488

489

490

491 **Referências**

- 492 ABIR. Associação das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas Não Alcoólicas.
493 Rio de Janeiro.
- 494 Alves, A., Crous, P.W., Correia, A., Phillips, A.J.L. 2008. Morphological and molecular data
495 reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. Fungal Divers. 28, 1-13.
- 496 Ballester-Tomás, L., Prietoa, J.A., Gil. J.V., Baezza, M., Randez-Gil, F. 2017. The Antarctic
497 yeast *Candida sake*: Understanding cold metabolism impact on wine. Int. J. Food
498 Microbiol. 245, 59-65. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.01.009>
- 499 Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D. 2000. Yeast – characteristic and identification.
500 Cambridge University Press, Cambridge.
- 501 Bautista-Rosales, P.U., Calderon-Santoyo, M., Servín-Villegas, R., Ochoa-Álvarez, N.A.,
502 Ragazzo-Sánchez, J. A. 2013. Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma*
503 *caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in
504 mangoes. Biol. Control. 65, 293-301.
505 <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.03.010>
- 506 Bello, G.D., Mónaco, C., Rollan, M.C., Lampugnani, G., Arteta, N., Abramoff, C., Ronco
507 L., Stocco, M. 2008. Biocontrol of Postharvest Grey Mould on Tomato by Yeasts. J.
508 Phytopathol. 156, 257–263. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01351.x>
- 509 Brysch-Herzberg, M. e Seidel, M. 2015. Yeast diversity on grapes in two German wine
510 growing regions. Int. J. Food Microbiol. 214, 137-144.
511 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.034>
- 512 Camargo, F.A.O., Silva, L.S., Merten, G.H., Carlos, F.S., Baveye, P.C., Triplett, E.W. 2017.
513 Agriculture brazilian in perspective: great expectations vs reality. Adv. Agron. 141,
514 53-114. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2016.10.003>

- 515 Campos-Martínez, A., Velázquez-del Valle, M.G., Flores-Moctezuma, H.E., Suárez-
516 Rodríguez, R., Ramírez-Trujillo, J.A., Hernández-Lauzardo, A.N. 2016. Antagonistic
517 yeasts with potential to control *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.
518 and *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds on avocado fruits. Crop Prot. 89, 101-
519 104. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.07.001>
- 520 Cao, J., Zhang, H., Yang, Q., Ren, R. 2013. Efficacy of *Pichia caribbica* in controlling blue
521 mold rot and patulin degradation in apples. Int. J. Food Microbiol. 162, 167-173.
522 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.007>
- 523 Castellani, A. 1963. The “water cultivation” of pathogenic fungi. Ann. Soc. Belg. Med. Tr.
524 44, 217-220.
- 525 Cavalcante, L.V. 2015. A nova geografia da produção de coco no Brasil. In: XI Encontro
526 Nacional da ANPEGE.
- 527 Ceugniesz, A., Drider, D., Jacques, P., Coucheney, F., 2015. Yeast diversity in a traditional
528 French cheese “Tomme d'orchies” reveals infrequent and frequent species with
529 associated benefits. Food Microb. 52, 177-184.
530 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.08.001>
- 531 Chanchaichaovivat.A., Panijpan, B., Ruenwongsa, P. 2008. Putative modes of action of
532 *Pichia guilliermondii* strain R13 in controlling chilli anthracnose after harvest. Biol.
533 Control. 47, 207-215. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.07.018>
- 534 Coelho, A.R., Hoffmann, F.L., Hirooka, E.Y. 2003. Biocontrole de doenças pós-colheita de
535 frutas por leveduras: perspectivas de aplicação e segurança alimentar. Semina. 24(2),
536 337-358. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2003v24n2p337>
- 537 Coelho, I.L. 2018. Diversidade populacional de *Lasiodiplodia* patogênica a coqueiro e ação
538 biocontroladora de leveduras. PhD thesis. Universidade Federal Rural de
539 Pernambuco, Recife, Brazil.

- 540 Cornet, M., Sendid, B., Fradin, C., Gaillardin, C., Poulain, D., Nguyen, H.V. 2011.
541 Molecular identification of closely related *Candida* species using two ribosomal
542 intergenic spacer fingerprinting methods. *J. Mol. Diagn.* 13, 12–22.
543 <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2010.11.014>
- 544 Cruywagen, E.M., Slippers, B., Roux, J., Wingfield, M.J. 2017. Phylogenetic species
545 recognition and hybridization in *Lasiodiplodia*: A case study on species from baobabs.
546 *Fungal Biol.* 121, 420-436. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.07.014>
- 547 Dai, C., Liu, W., Ren, X., Zhang, H., Zhang, X., Zhao, L., Zhu, S., Univ Jiangsu (Uyji-non-
548 standard). Improving efficacy of *Pichia pastoris* on disease biological control involves
549 activating *Pichia caribbica* yeast, culturing by nutrient yeast trehalose broth culture
550 medium, centrifuging, and putting fruit in bacterial suspension. China patente
551 <CN102283281-A>. Jun 2011.
- 552 Daniel, H., Vrancken, G., Takrama, J.F., Camu, N., De Vos, P., De Vuyst L. 2009. Yeast
553 diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. *FEMS Yeast Res.* 9, 774-783.
554 <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00520.x>
- 555 Droby, S., Hofstein, R., Wilson, C.L., Wisniewski, M., Fridlender, B., Cohen, L., Weiss, B.,
556 Daus, A., Timar, D., Chalutz, E. 1993. Pilot testing of *Pichia guilliermondii*: a
557 biocontrol agent for postharvest diseases of citrus fruit. *Biol. Control.* 3, 47-52.
- 558 Droby, S., Wisniewski, M., Macarisin, D., Wilson, C. 2009. Twenty years of postharvest
559 biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biol. Technol.* 52, 137-
560 145. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.11.009>
- 561 El-Tarabily, K.A. e Sivasithamparam, K. 2006. Potential of yeasts as biocontrol agents of
562 soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience.* 47,
563 25–35. <https://doi.org/10.1007/s10267-005-0268-2>

- 564 FAOStats - Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOStats. Acesso
565 em: 10 de janeiro de 2018. <http://www.FAOStats.org/FAOStatsstat/en/#data/QC>
- 566 Ferreira, D.F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. Ciênc. Agrotec. 35(6),
567 1039-1042. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>
- 568 Grondin, E., Sing, A.S.C., Caro, Y., Raherimandimby, M., Randrianierenana, A.L., James,
569 S., Nueno-Palop, C., François, J.M., Petit, T. 2015. A comparative study on the
570 potential of epiphytic yeasts isolated from tropical fruits to produce flavoring
571 compounds. Int. J. Food Microbiol. 203, 101-108.
572 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.032>
- 573 Halfeld-Vieira, B. e Nechet, K.L. 2005. Queda de Frutos em Coqueiro Causada por
574 *Lasiodiplodia theobromae* em Roraima. Fitopatol. Bras. 30 (2), 203.
- 575 Hernández-Luzardo, A.N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del-Valle, M.G., Hernández-
576 Rodríguez, A., 2007. Uso de microorganismos antagonistas en el control de
577 enfermedades postcosecha en frutos. Ver. Mex. Fitopatol. 25, 66–74.
- 578 Holanda, J.S., Alves, M.C.S., Chagas, M.C.M. 2008. Cultivo do coqueiro no Rio Grande do
579 Norte. Natal: EMPARN.
- 580 Huang, R., Li, G.Q., Zhang, J., Yang, L., Che, H.J., Jiang, D.H., Huang, H.C. 2011. Control
581 of postharvest *Botrytis* fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of
582 *Candida intermedia*. Phytopathology. 101, 859–869. [https://doi.org/10.1094/PHYTO-](https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-10-0255)
583 [09-10-0255](https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-10-0255)
- 584 IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Acesso em: 20
585 janeiro 2018. <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613>
- 586 Janisiewicz, W.J., Korsten, L. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits.
587 Annu. Rev. Phytopathol. 40, 411–441.
588 <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120401.130158>

- 589 Katoh, K., Toh, H. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7:
590 improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30, 772–780.
591 <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- 592 Kurtzman, C. P. 2015. Description of *Martiniozyma* gen. nov. and transfer of seven *Candida*
593 species to *Saturnispora* as new combinations. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 108, 803-809.
594 <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0536-x>
- 595 Luo, X., Wang, Y., Shen, Y., Zheng, Y., Cheng, J., Univ Zhejiang Ind (UYZI). New
596 microbial strain, preferably *Pichia caribbica* ZJB-09225 having high stereoselective
597 carbonyl reduction enzyme activity, useful for preparing tert-butyl-6-cyano-(3R,5R)-
598 dihydroxy-t-butyl hexanoate. China patente [CN103122320-A](https://doi.org/10.1007/s10482-015-0536-x). Jan 2013.
- 599 Lutz, M.C., Lopes, C.A., Rodriguez, M.E., Sosa, M.C., Sangorrín, M.P. 2013. Efficacy and
600 putative mode of action of native and commercial antagonistic yeasts against
601 postharvest pathogens of pear. *Int. J. Food Microbiol.* 164, 166–172.
602 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.04.005>
- 603 Mahunu, G.K., Zhang, H., Yang, Q., Zhang, X., Li, D., Zhou, Y. 2016. Improving the
604 biocontrol efficacy of *Pichia caribbica* with phytic acid against postharvest blue mold
605 and natural decay in apples. *Biol. Control.* 92, 172-180.
606 <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.10.012>
- 607 Mariano, P.L.S., Gonçalves, R.B., Höfling, J.F. 2007. Storage procedures for yeast
608 preservation: phenotypic and genotypic evaluation. *Ann. Microbiol.* 57, 461.
609 <https://doi.org/10.1007/BF03175090>
- 610 Martins, C.R. e Jesus Júnior, L.A. 2011. Evolução da produção de coco no Brasil e o
611 comércio internacional: panorama 2010. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros.
- 612 Mc Bratney, A.; Field, D.; Koch, A. 2014. The Dimensions of soil security. *Geoderma.* 213,
613 203-213. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2013.08.013>

- 614 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2018. Sistema de Agrotóxicos
615 Fitossanitários: AGROFIT. Brasília.
- 616 Monteiro, C.M., Caron, E.S., Silveira, S.F., Almeida, A.M., Souza-Filho, G.R., Souza,
617 A.L. 2013. Control of foliar diseases by the axillary application of systemic
618 fungicides in Brazilian coconut palms. *Crop Prot.* 52, 78-83.
619 <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.05.013>
- 620 Murray, M.A.S., Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA.
621 *Nucleic Acids Res.* 8, 4321-4325. <https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>
- 622 N'guessan, K.F., Brou, K., Jacques, N., Casaregola, S., Dje, K.M. 2011. Identification of
623 yeast during alcoholic fermentation of tchapalo, a traditional sorghum beer from Côte
624 d'Ivoire. *Anton. Leeuw. Int J. G.* 99, 855–864. [https://doi.org/10.1007/s10482-011-](https://doi.org/10.1007/s10482-011-9560-7)
625 [9560-7](https://doi.org/10.1007/s10482-011-9560-7)
- 626 Paiva, E., Serradilla, M.J., Ruiz-Moyano, S., Córdoba, M.G., Villalobos, M.C. 2017.
627 Combined effect of antagonistic yeast and modified atmosphere to control *Penicillium*
628 *expansum* infection in sweet cherries cv. Ambrunés. *Int. J. Food Microbiol.* 241, 276-
629 282. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.033>
- 630 Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C., Cirvilleri, G. 2015. Biocontrol ability and action
631 mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest
632 bunch rot of table grape. *Food Microbiol.* 47, 85-92.
633 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.013>
- 634 Posada, D., Buckley, T.R. 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics:
635 advantages of Akaike Information Criterion and Bayesian approaches over likelihood
636 ratio tests. *Syst Biol.* 53, 793-808. <https://doi.org/10.1080/10635150490522304>
- 637 Prabhune, A.A., Joshi, K.L., Mukherji, R.A., Council Sci & Ind Res India (COUI). Room
638 temperature fermentation to synthesize crystalline xylitol which acts as quorum

- 639 sensing inhibitor, comprises e.g. inoculating cells of strain *Pichia caribbica* BY2 in
640 malt extract xylose yeast extract and peptone medium and incubating. Índia patentes
641 [WO2014013506-A1 e IN201202190-II](#). Jul 2012.
- 642 Prades, A., Salum, U.N., Pioch, D. 2016. New era for the coconut sector. What prospects for
643 research? Oilseeds and fats, OCL. 23(6), D607. <https://doi.org/10.1051/ocl/2016048>
- 644 Rayne, R.W. 1970. *A Mycological Colour Chart*. Commonwealth Mycological Institute and
645 the British Mycological Society, Kew, Surrey, England.
- 646 Romi, W., Keisam, S., Ahmed, G., Jeyaram, K. 2014. Reliable differentiation of
647 *Meyerozyma guilliermondii* from *Meyerozyma caribbica* by internal transcribed
648 spacer restriction fingerprinting. Microbiology. 14(1), 52.
649 <https://doi.org/Microbiology 2014>
- 650 Rosado, A.W.C.R., Machado, A.R., Freire, F.C., Pereira, O.L. 2016. Phylogeny,
651 identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia* associated with postharvest stem-end
652 rot of coconut in Brazil. Plant Dis. 100(3), 561-568. [https://doi.org/10.1094/PDIS-03-](https://doi.org/10.1094/PDIS-03-15-0242-RE)
653 [15-0242-RE](#)
- 654 Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Villalobos, M.C., Calle, A., Serradilla, M.J., Córdoba, M.G.,
655 Hernández, A. 2016. Yeasts isolated from figs (*Ficus carica* L.) as biocontrol agents
656 of postharvest fruit diseases. Food Microbiol. 57, 45-53.
657 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.01.003>
- 658 Saucedo-Luna, J., Castro-Montoya, A.J., Martínez-Pacheco, M.M., Sosa-Aguirre, C.R.,
659 Campos-García, J., 2011. Efficient chemical and enzymatic saccharification of the
660 lignocellulosic residue from Agave tequilana bagasse to produce ethanol by *Pichia*
661 *caribbica*. J Ind Microbiol Biot. 38, 725–732. [https://doi.org/10.1007/s10295-010-](https://doi.org/10.1007/s10295-010-0853-z)
662 [0853-z](#)

- 663 Sharma, R.R., Singh, D., Singh, R., 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits
664 and vegetables by microbial antagonists: a review. *Biol. Control.* 50, 205–221.
665 <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.05.001>
- 666 Spadaro, D. e Droby, S. 2016. Development of biocontrol products for postharvest diseases
667 of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast
668 antagonists. *Food Sci. Technol.* 47, 39-49. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.003>
- 669 Talamini, V., Ferreira, J.M.S., Ramos, S.R.R. 2013. Incidência e severidade da queima das
670 folhas em cultivares de coqueiro em Pernambuco. Aracaju: Embrapa Tabuleiros
671 Costeiros.
- 672 Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. e Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular
673 Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.
674 <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- 675 Vaughan-Martini, A., Kurtzman, C.P., Meyer, S.A., O'Neill, E.B. 2005. Two new species
676 in the *Pichia guilliermondii* clade: *Pichia caribbica* sp. nov., the ascosporic state of
677 *Candida fermentati*, and *Candida carpophila* comb. Nov. *FEMS Yeast Research.* 5,
678 463-469. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.10.008>
- 679 Viana, F.M.P., Freire, F.C.O., Barguil, B.M., Alves, R.E., Santos, A.A., Cardoso, J.E.; Vidal,
680 J.C. 2002. Podridão basal pós-colheita do coco verde no estado do Ceará. *Fitopatol.*
681 *Bras.* 27(5), 545. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582002000500020>
- 682 Warwick, D.R.N., Abakerli, R.B. 2001. Chemical control of Lixas and leaf blight disease of
683 coconut. *Palms.* 45, 168-170.
- 684 White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of
685 fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis A. M., Gelfard D. H.,
686 Snindky J. J., White T. J. (eds) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.*
687 Academic Press, San Diego, pp. 315-322.

- 688 Xu, B., Zhang, H., Chen, K., Xu, Q., Yao, Y., Gao, H., 2013. Biocontrol of postharvest
689 *Rhizopus* decay of peaches with *Pichia caribbica*. *Curr. Microbiol.* 67, 255–261.
690 <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0359-9>
- 691 Yang, T., Groenewald, J.Z., Cheewangkoon, R., Jami, F., Abdollahzadeh, J., Lombard, L.,
692 Crous, P.W. 2017. Families, genera, and species of Botryosphaeriales. *Fungal Biol.*
693 121, 322-346. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.11.001>
- 694 Zhang, X., Zhang, H., Ren, X., Pang, S. Univ Jiangsu (Uyji-non-standard). New *Pichia*
695 *caribbica* useful for preventing the plant disease after harvesting the fruits, and storing
696 and retaining the freshness of pear, peach, strawberry and apple. China patentes
697 CN101899400-A e CN101899400-B. Jun 2010.
- 698 Zhao, L., Zhang, H., Li, J., Cui, J., Zhang, X., Ren, X. 2012. Enhancement of biocontrol
699 efficacy of *Pichia carribbica* to postharvest diseases of strawberries by addition of
700 trehalose to the growth medium. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 3916-3932.
701 <https://doi.org/10.3390/ijms13033916>
- 702 Zeng, L., Yu, C., Fu, D., Lu, H., Zhu, R., Lu, L., Zheng, X., Yu, T. 2015. Improvement in
703 the effectiveness of *Cryptococcus laurentii* to control postharvest blue mold of pear
704 by its culture in β -glucan amended nutrient broth. *Postharvest Biol. Technol.* 104, 26-
705 32. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.03.005>

Tabela 1 Espécies de *Pichia* e *Meyerozyma* incluídas nas análises filogenéticas

Táxon	N. Isolado ^d	Hospedeiro	Local	Acesso NBCI ^c ITS
<i>Candida suratensis</i> ^b	CBS 10928	Vegetal	Holanda	KY102422
<i>Meyerozyma caribbica</i>	CBS 9966 ^a	Vegetal	Cuba	NR_149348
	CBS 5674	-	Reino Unido	KY104219
	CBS 2022	-	França	EU568913
	CNRMA200700593	-	França	EU569001
	H5Mandk13	Grão de cacau	Gana	FM199963
	IWBT-Y836	<i>Vitis vinifera</i>	África do Sul	JQ993381
	IMUFRJ51970	Cana-de-açúcar	Brasil	FN428931
	PMM09-1553L	-	França	KP132413
	S58-1	Mosto de uva	Brasil	GU943488
	UCLM	Pasta de azeitona	Espanha	GQ340430
	WM10.15	<i>Aethina tumida</i>	Austrália	JN183445
	CFS y088	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888671
	CFS y089	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888672
	CFS y090	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888673
	CFS y091	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888674
	CFS y093	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888675
	CFS y094	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888676
	CFS y095	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888677
	CFS y096	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888678
	CFS y097	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888679
	CFS y098	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888680
	CFS y099	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888681
	CFS y100	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888682
	CFS y101	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888683
	CFS y102	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888684
	CFS y103	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888685
	CFS y104	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888686
	CFS y105	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888687
	CFS y106	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888688
	CFS y107	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888689
	CFS y112	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888690
	CFS y113	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888691
CFS y114	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888692	
CFS y115	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888693	
CFS y118	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888694	
CFS y119	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888695	
CFS y188	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888696	
CFS y189	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888697	
CFS y190	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888698	
CFS y191	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888699	
CFS y192	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888700	

Tabela 1 cont.

	CFS y194	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888701
	CFS y195	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888702
	CFS y196	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888703
	CFS y198	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888704
	CFS y199	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888705
	CFS y200	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888706
	CFS y201	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888707
	CFS y202	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888708
	CFS y203	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888709
	CFS y206	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888710
	CFS y207	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888711
	CFS y208	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888712
	CFS y210	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888713
	CFS y212	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888714
	CFS y213	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888715
	CFS y214	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888716
	CFS y215	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888717
	CFS y216a	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888718
	CFS y217	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888719
	CFS y219	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888720
	CFS y223	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888721
	CFS y237a	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888722
	CFS y244	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888723
	CFS y245	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	MG888724
<i>M. guilliermondii</i>	ATCC 6260	-	Alemanha	AY939792
	CBS 2030 ^a	-	Austrália	NR_111247
	CBS9751	Inseto	Alemanha	KY104250
	CanR-56	Raiz de canola	China	JF817286
	Eq	-	China	EU177579
	G7A1	-	China	DQ680842
	L2-8	-	China	DQ663476
	PX-PAT	<i>Vitis vinifera</i>	França	GQ497898
	SD 337	-	Índia	GQ334393
	SMS06	<i>Pinus kesiya</i>	China	KR085964
	WM10.14	<i>Aethina tumida</i>	Austrália	JN183444
<i>Pichia barkery</i>	CBS 7256 ^a	Vegetal	Jamaica	NR_153283
	CBS 7256	Vegetal	Jamaica	KY104510
<i>P. cactophyla</i>	CBS 6926 ^a	-	França	NR_138243
	PMM09-2821L	-	França	KP132500
<i>P. cephalocereana</i>	CBS 7273 ^a	Vegetal	Holanda	NR_153285
	CBS 7273	Vegetal	Holanda	KY104518
<i>P. deserticola</i>	CBS 7119 ^a	Cactus	EUA	NR_077085
	CBS 7120	Cactus	EUA	KY104520
<i>P. eremophila</i>	CBS 7272 ^a	Vegetal	EUA	NR_153287
	CBS 7272	Vegetal	EUA	KY104524
<i>P. exigua</i>	CBS 6836 ^a	Inseto	EUA	NR_153288
	CBS 6836	Inseto	EUA	KY104525

Tabela 1 cont.

<i>P. fermentans</i>	ATCC 10651 PMM09-907L	Queijo -	Canadá França	NR_130688 KP132501
<i>P. garciniae</i>	CBS 10758 ^a	Fruto	Índia	NR_153289
<i>P. heedii</i>	CBS 6930 ^a	Cactus	México	NR_153290
<i>P. kluyveri</i>	CBS 188 ^a	-	China	NR_138210
	CBS 1365	Cacau	Indonésia	KY104564
<i>P. manshurica</i>	CBS 209 ^a	-	China	NR_138211
	PMM10-206L	-	França	KP132515
<i>P. membranifaciens</i>	CBS 107 ^a	-	China	NR_111195
	CBS 213	Vinho	Itália	KY104628
<i>P. myanmarensis</i>	BCRC 23287 ^a	-	Tawian	NR_111797
	GV405	<i>Vitis vinifera</i>	África do Sul	KP250841
<i>P. norvegensis</i>	CBS 6564 ^a	-	Paris	NR_138242
	CBS 5304	<i>Homo sapiens</i>	Holanda	KY104636
<i>P. porticicola</i>	CBS 11715 ^a	-	Holanda	NR_153291
	NBRC 100302	Alimento	Japão	AB427181
<i>P. rarassimilans</i>	CBS 10901	Inseto	Japão	KY104644

^a Cultura ex-type;

^b Isolado *outgroup*;

^c ITS: Espaço de Transcrição Interna (ITS1-5.8S-ITS2);

^d Isolados com número em negrito foram obtidos nesse estudo.

ATCC - Department of Food Sciences and Nutrition, Laval University, Canadá;

BCRC - Projeto NCBI RefSeq Targeted Loci

CBS - Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda;

CFS - Coleção Fungos de Solo, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil.

CNRMA - Centre National de Reference Mycologie et Antifongiques, Unite de Mycologie Moleculaire, Institut Pasteur, França;

IMUFRJ - Instituto de Microbiologia - IMUFRJ, Rio de Janeiro, Brasil;

IWBT - Institute for Wine Biotechnology, Stellenbosch University, África do Sul;

PMM - Sydney Medical School-Westmead Hospital, Marie Bashir Institute for Infectious Diseases and Biosecurity, University of Sydney, Austrália;

UCLM - Tecnologia de los Alimentos, Universidad de Castilla la Mancha, Espanha.

Tabela 2 Efeito de 54 isolados de *Meyerozyma caribbica* sobre o índice de velocidade de crescimento micelial e porcentagem de inibição de crescimento micelial de *Lasiodiplodia theobromae*, após 48 h de crescimento *in vitro*

Isolado	IVCM ^y	PIC ^z	Isolado	IVCM ^y	PIC ^z
<i>CFS y088</i>	0,39 ± 0,08 B	66,44 ± 9,62 B	<i>CFS y191</i>	0,59 ± 0,20 B	65,60 ± 8,45 B
<i>CFS y089</i>	0,61 ± 0,30 B	60,62 ± 12,37 C	<i>CFS y192</i>	0,55 ± 0,26 B	65,49 ± 12,26 B
<i>CFS y090</i>	0,71 ± 0,23 B	58,23 ± 4,87 C	<i>CFS y194</i>	0,80 ± 0,25 C	55,41 ± 6,47 C
<i>CFS y091</i>	0,33 ± 0,07 A	76,05 ± 4,35 A	<i>CFS y195</i>	0,47 ± 0,23 B	69,27 ± 8,79 B
<i>CFS y093</i>	0,97 ± 0,04 C	46,09 ± 1,79 D	<i>CFS y196</i>	0,60 ± 0,19 B	64,20 ± 8,78 B
<i>CFS y094</i>	0,48 ± 0,14 B	81,61 ± 2,07 A	<i>CFS y198</i>	0,65 ± 0,12 B	58,27 ± 3,90 D
<i>CFS y095</i>	0,20 ± 0,05 A	90,55 ± 0,69 A	<i>CFS y199</i>	0,56 ± 0,09 B	64,85 ± 3,82 B
<i>CFS y096</i>	0,23 ± 0,04 A	78,87 ± 1,00 A	<i>CFS y200</i>	0,31 ± 0,10 A	88,47 ± 0,90 A
<i>CFS y097</i>	0,22 ± 0,03 A	84,29 ± 1,14 A	<i>CFS y201</i>	0,26 ± 0,07 A	79,30 ± 1,93 A
<i>CFS y098</i>	0,44 ± 0,09 A	68,92 ± 4,47 B	<i>CFS y202</i>	0,30 ± 0,04 A	78,60 ± 2,08 A
<i>CFS y099</i>	0,83 ± 0,31 C	53,77 ± 10,51 C	<i>CFS y203</i>	0,23 ± 0,04 A	78,89 ± 1,96 A
<i>CFS y100</i>	0,31 ± 0,08 A	72,86 ± 5,00 B	<i>CFS y206</i>	0,11 ± 0,04 A	87,19 ± 0,64 A
<i>CFS y101</i>	0,41 ± 0,15 A	71,98 ± 3,21 B	<i>CFS y207</i>	0,25 ± 0,06 A	81,91 ± 2,05 A
<i>CFS y102</i>	0,35 ± 0,08 A	73,93 ± 5,32 A	<i>CFS y208</i>	0,48 ± 0,12 B	67,17 ± 4,85 B
<i>CFS y103</i>	0,38 ± 0,04 A	71,64 ± 4,50 B	<i>CFS y210</i>	0,45 ± 0,16 A	71,24 ± 5,94 B
<i>CFS y104</i>	0,72 ± 0,09 B	60,55 ± 3,09 C	<i>CFS y212</i>	0,29 ± 0,12 A	79,57 ± 3,71 A
<i>CFS y105</i>	0,21 ± 0,06 A	80,07 ± 2,98 A	<i>CFS y213</i>	0,16 ± 0,02 A	82,84 ± 1,10 A
<i>CFS y106</i>	1,16 ± 0,12 D	35,75 ± 4,83 E	<i>CFS y214</i>	0,51 ± 0,06 B	64,67 ± 7,70 B
<i>CFS y107</i>	0,48 ± 0,11 B	67,15 ± 5,68 B	<i>CFS y215</i>	0,22 ± 0,06 A	84,44 ± 2,09 A
<i>CFS y112</i>	0,46 ± 0,25 B	68,59 ± 11,37 B	<i>CFS y216a</i>	0,42 ± 0,14 A	70,31 ± 5,57 B
<i>CFS y113</i>	0,38 ± 0,12 A	75,13 ± 6,98 A	<i>CFS y217</i>	1,45 ± 0,12 E	30,55 ± 4,31 E
<i>CFS y114</i>	0,54 ± 0,16 B	65,01 ± 5,64 B	<i>CFS y219</i>	0,25 ± 0,09 A	80,50 ± 2,11 A
<i>CFS y115</i>	0,51 ± 0,23 B	70,37 ± 6,15 B	<i>CFS y223</i>	0,52 ± 0,24 B	66,47 ± 7,93 B
<i>CFS y118</i>	0,41 ± 0,16 A	71,78 ± 4,25 B	<i>CFS y237a</i>	0,34 ± 0,06 A	76,23 ± 1,61 A
<i>CFS y119</i>	0,21 ± 0,16 A	82,43 ± 3,13 A	<i>CFS y244</i>	0,55 ± 0,31 B	70,28 ± 9,54 B
<i>CFS y188</i>	0,25 ± 0,14 A	81,77 ± 4,48 A	<i>CFS y245</i>	0,63 ± 0,20 B	68,11 ± 6,33 B
<i>CFS y189</i>	0,25 ± 0,04 A	79,58 ± 1,19 A			
<i>CFS y190</i>	0,14 ± 0,01 A	84,39 ± 1,61 A	<i>Controle</i>	2,71 ± 0,24 F	-NA
MG				0,50	69,56
CV				40,71	10,25

^yÍndice de velocidade de crescimento micelial - IVCM (mm h⁻¹). Valores médios ± valores de desvio médio. Determinado segundo a equação: $IVCM = \frac{Cf - Ci}{t}$, sendo Cf = crescimento final; Ci = crescimento inicial e t = intervalo de avaliação;

^zPorcentagem de inibição de crescimento micelial – PIC (%). Valores médios ± valores de desvio médio. Determinado segundo a equação: $PIC = \frac{Cc - Ct}{Cc} * 100$, sendo Cc = Crescimento do controle; Ct = Crescimento tratamento.

-^{NA} Não aplicado;

Na coluna, diferentes letras representam diferenças significativas (p ≤ 0,01) pelo teste de Scott knott a 5% de probabilidade, em DIC.

Valores médios em negrito representam os tratamentos selecionados.

Tabela 3 Efeito de *Meyerozyma caribbica* sobre o sobre o índice de velocidade de crescimento micelial e porcentagem de inibição de crescimento micelial de *L. theobromae* e *L. pseudotheobromae*, após 48 h de crescimento *in vitro*

Isolado	<i>L. theobromae</i>		<i>L. pseudotheobromae</i>	
	IVCM ^y	PIC ^z	IVCM ^y	PIC ^z
<i>CFS y091</i>	0,23 ± 0,03 A	70,37 ± 1,61 A	0,53 ± 0,12 B	64,77 ± 6,48 B
<i>CFS y094</i>	0,21 ± 0,01 A	70,75 ± 1,73 A	0,36 ± 0,10 A	66,92 ± 3,07 B
<i>CFS y095</i>	0,26 ± 0,04 A	50,85 ± 8,00 B	0,49 ± 0,16 B	56,05 ± 7,20 B
<i>CFS y096</i>	0,23 ± 0,02 A	51,79 ± 4,75 B	0,81 ± 0,19 B	55,36 ± 4,29 B
<i>CFS y097</i>	0,50 ± 0,05 C	51,36 ± 0,92 B	0,53 ± 0,19 B	58,04 ± 8,58 B
<i>CFS y102</i>	0,31 ± 0,03 B	55,73 ± 8,31 B	0,65 ± 0,12 B	60,12 ± 8,79 B
<i>CFS y105</i>	0,36 ± 0,05 B	48,67 ± 3,73 B	0,40 ± 0,13 A	74,63 ± 4,46 A
<i>CFS y113</i>	0,30 ± 0,06 A	51,95 ± 3,00 B	0,37 ± 0,05 A	72,56 ± 1,34 A
<i>CFS y119</i>	0,26 ± 0,04 A	64,29 ± 3,36 A	0,54 ± 0,10 B	65,15 ± 2,92 A
<i>CFS y188</i>	0,24 ± 0,01 A	66,92 ± 3,14 A	0,81 ± 0,10 B	61,02 ± 3,06 B
<i>CFS y189</i>	0,33 ± 0,09 B	51,08 ± 11,79 B	0,31 ± 0,05 A	76,62 ± 1,95 A
<i>CFS y190</i>	0,31 ± 0,04 A	64,24 ± 1,24 A	0,54 ± 0,11 B	62,19 ± 7,44 B
<i>CFS y200</i>	0,22 ± 0,03 A	70,46 ± 1,65 A	0,54 ± 0,19 B	61,11 ± 12,20 B
<i>CFS y201</i>	0,28 ± 0,02 A	56,45 ± 1,85 A	0,40 ± 0,18 A	62,19 ± 10,81 B
<i>CFS y202</i>	0,24 ± 0,06 A	56,06 ± 9,62 A	0,51 ± 0,10 B	62,52 ± 3,49 B
<i>CFS y203</i>	0,29 ± 0,04 A	51,31 ± 6,33 B	0,30 ± 0,03 A	79,33 ± 1,15 A
<i>CFS y206</i>	0,36 ± 0,08 B	60,83 ± 6,30 A	0,47 ± 0,11 A	68,96 ± 3,65 A
<i>CFS y207</i>	0,33 ± 0,07 B	65,94 ± 4,75 A	0,63 ± 0,17 B	65,59 ± 6,63 B
<i>CFS y212</i>	0,42 ± 0,08 C	53,41 ± 3,10 B	0,35 ± 0,09 A	74,31 ± 3,64 A
<i>CFS y213</i>	0,32 ± 0,04 B	62,56 ± 3,85 A	0,63 ± 0,20 B	62,09 ± 8,89 B
<i>CFS y215</i>	0,36 ± 0,06 A	58,24 ± 6,02 B	0,60 ± 0,12 B	61,69 ± 4,70 B
<i>CFS y219</i>	0,31 ± 0,08 A	54,28 ± 7,97 B	0,54 ± 0,09 B	60,40 ± 4,33 B
<i>CFS y237a</i>	0,35 ± 0,05 B	46,15 ± 3,22 B	0,57 ± 0,19 B	66,60 ± 3,30 B
<i>Controle</i>	1,37 ± 0,06 D	_NA	2,00 ± 0,09 C	_NA
MG	0,39	53,64	0,59	61,68
CV	23,11	12,88	37,15	15,02

^y Índice de velocidade de crescimento micelial - IVCM (mm h⁻¹). Valores médios ± valores de desvio médio. Determinado segundo a equação: $IVCM = \frac{Cf - Ci}{t}$, sendo Cf = crescimento final; Ci = crescimento inicial e t = intervalo de avaliação;

^z Porcentagem de inibição de crescimento micelial – PIC (%). Valores médios ± valores de desvio médio. Determinado segundo a equação: $PIC = \frac{C_c - C_t}{C_c} * 100$, sendo C_c = Crescimento do controle; C_t = Crescimento tratamento. Valores médios em negrito representam os tratamentos selecionados.

-^{NA} Não aplicado;

Na coluna, diferentes letras representam diferenças significativas (p ≤ 0,01) pelo teste de Scott knott a 5% de probabilidade, em DIC.

Tabela 4 Efeito de *Meyerozyma caribbica* sobre taxa de progresso, área abaixo da curva de progresso e porcentagem de inibição de podridão basal em coco-anão-verde (frutos), causada por *L. theobromae* e *L. pseudotheobromae*, após 9 dias de incubação

Isolado	<i>L. theobromae</i>			<i>L. pseudotheobromae</i>		
	<i>r</i> ^v	AACPD ^w	PID ^x	<i>r</i> ^v	AACPD ^w	PID ^x
<i>CFS y091</i>	0,16	133,84 ± 20,96 A	31,33	0,30	96,97 ± 14,46 A	39,27
<i>CFS y094</i>	0,11	153,46 ± 29,68 A	21,27	0,22	89,72 ± 10,49 A	43,81
<i>CFS y095</i>	0,15	166,75 ± 37,49 A	14,45	0,46	119,40 ± 11,65 B	25,23
<i>CFS y096</i>	0,21	393,71 ± 57,30 C	_NA	0,18	109,88 ± 16,57 B	31,19
<i>CFS y097</i>	0,11	149,23 ± 23,73 A	23,44	0,24	101,50 ± 17,50 A	36,44
<i>CFS y102</i>	0,11	206,27 ± 29,82 C	_NA	0,28	175,25 ± 24,69 D	_NA
<i>CFS y105</i>	0,16	292,83 ± 21,28 C	_NA	0,21	109,88 ± 20,89 B	31,19
<i>CFS y113</i>	0,13	245,78 ± 40,41 C	_NA	0,20	119,05 ± 8,05 B	25,44
<i>CFS y119</i>	0,08	143,21 ± 25,73 A	26,53	0,33	198,41 ± 18,44 D	_NA
<i>CFS y188</i>	0,09	158,31 ± 26,47 A	18,78	0,21	106,34 ± 22,08 A	33,40
<i>CFS y189</i>	0,10	129,73 ± 23,29 A	33,44	0,29	103,92 ± 13,02 A	34,92
<i>CFS y190</i>	0,17	141,19 ± 30,89 A	27,56	0,14	95,85 ± 8,06 A	39,97
<i>CFS y200</i>	0,14	120,79 ± 26,51 A	38,03	0,27	116,46 ± 15,22 B	27,07
<i>CFS y201</i>	0,15	193,00 ± 63,55 B	0,98	0,47	156,89 ± 10,73 C	1,75
<i>CFS y202</i>	0,17	152,02 ± 14,67 A	22,01	0,22	105,71 ± 24,12 A	33,80
<i>CFS y203</i>	0,09	145,33 ± 27,51 A	25,44	0,25	122,70 ± 19,57 B	23,16
<i>CFS y206</i>	0,12	142,52 ± 31,82 A	26,88	0,24	130,84 ± 9,05 C	18,06
<i>CFS y207</i>	0,12	160,07 ± 31,29 A	17,87	0,20	102,70 ± 12,02 A	35,68
<i>CFS y212</i>	0,06	150,74 ± 18,14 A	22,66	0,23	100,68 ± 14,17 A	36,95
<i>CFS y213</i>	0,10	146,84 ± 12,69 A	24,66	0,21	127,37 ± 9,33 C	20,23
<i>CFS y215</i>	0,13	261,14 ± 37,36 C	_NA	0,28	120,57 ± 11,27 B	24,49
<i>CFS y219</i>	0,12	167,14 ± 23,11 B	14,25	0,22	98,38 ± 11,03 A	38,39
<i>CFS y237a</i>	0,11	150,82 ± 8,50 A	22,62	0,21	109,05 ± 14,40 B	31,71
<i>Químico 1</i> ^y	0,12	121,95 ± 29,43 A	37,43	0,36	115,75 ± 8,50 B	27,51
<i>Químico 2</i> ^z	0,08	190,88 ± 50,97 B	2,07	0,39	120,92 ± 9,20 B	24,27
<i>Controle</i>	0,27	194,91 ± 16,37 B	_NA	0,35	159,68 ± 17,64 C	_NA
MG		152,94			114,58	
CV		24,40			16,47	

^v *r* – Taxa de progresso da doença (mm dia⁻¹). Valores médios estimados por $Yt = Y0 + Y0.r.t$;

^w AACPD – Área abaixo da curva de progresso da doença (mm²). Valores médios, ± valores de desvio médio. Na coluna, diferentes letras representam diferenças significativas ($p \leq 0,01$) pelo teste de Scott knott a 5% de probabilidade, em BIC; Valores médios em negrito representam os tratamentos selecionados;

^x PID - podridão basal em coco-anão-verde (%). Valores médios determinados segundo a equação: $PID = \frac{ADc-ADt}{ADc} * 100$, sendo

ADc = valor de AACPD do controle; AD t = AACPD tratamento;

^y Fungicida difenoconazol (0,05 mL i.a. L⁻¹)

^z Fungicida tiabendazol (0,48 mL i.a. L⁻¹)

-NA: Não aplicado;

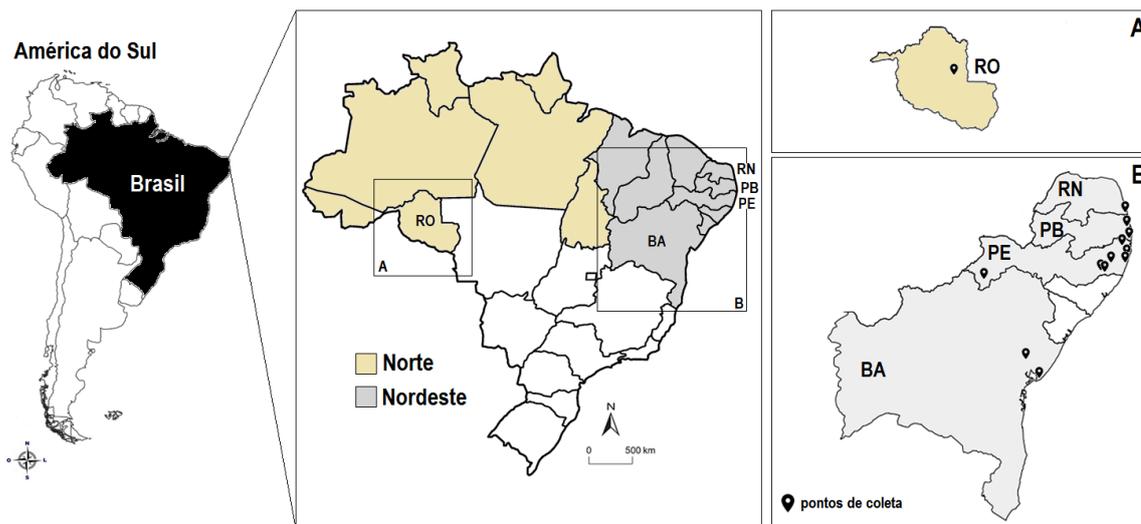


Fig. 1. Localização de coqueirais e coletas de coco para isolamento de *Meyerozyma caribbica*. Coqueirais cultivados nas regiões brasileiras Norte (Estados de Rondônia) e Nordeste (Estados da Bahia, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte). Na figura A, destaque à localização geográfica do município Jarú (RO), e na figura B, destacam-se Nísia Floresta (RN); Lucena e Pitimbu (PB); Bonito, Goiana, Igarassu, Ilha de Itamaracá, Petrolina, Pombos e Vitória de santo Antão (PE); Cruz das Almas e Salvador (BA).

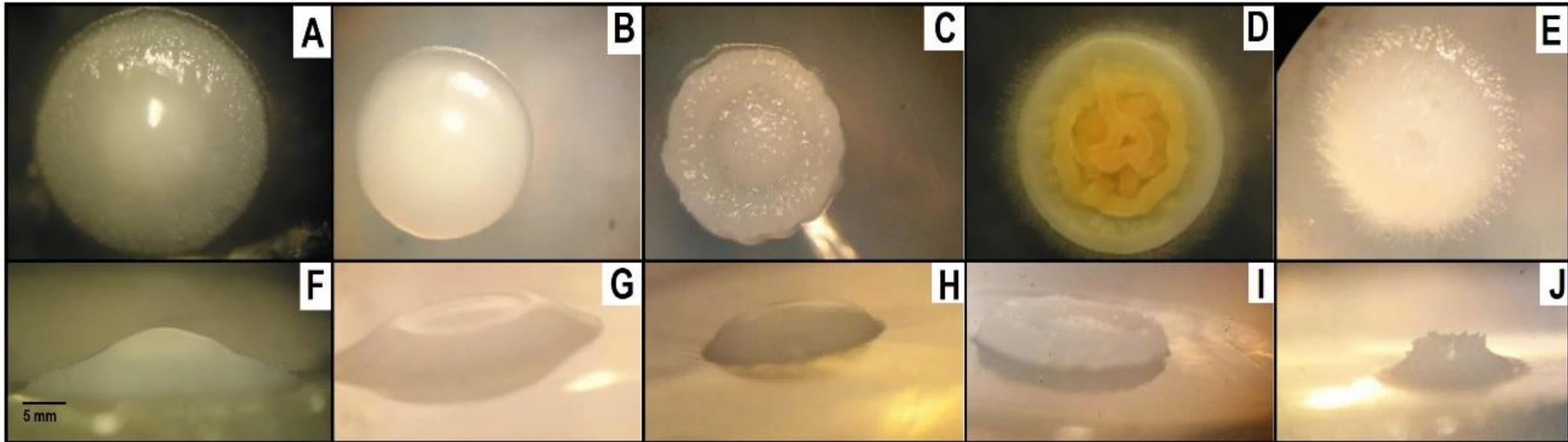


Fig. 2. Variabilidade morfológica de colônias de *M. caribbica*, provenientes da microbiota do coqueiro, crescidas em meio YPD aos cinco dias de idade: Colônias circulares; aparência fosca (A, B e D) e brilhosa (C e E); cor branco (A, B, C e E) ou bege (D); borda arredondada (A e B), ondulada (C) ou espiculada (D e E); e elevação convexa (H), elevada (G e J), ondulada (I) ou protuberante (F).

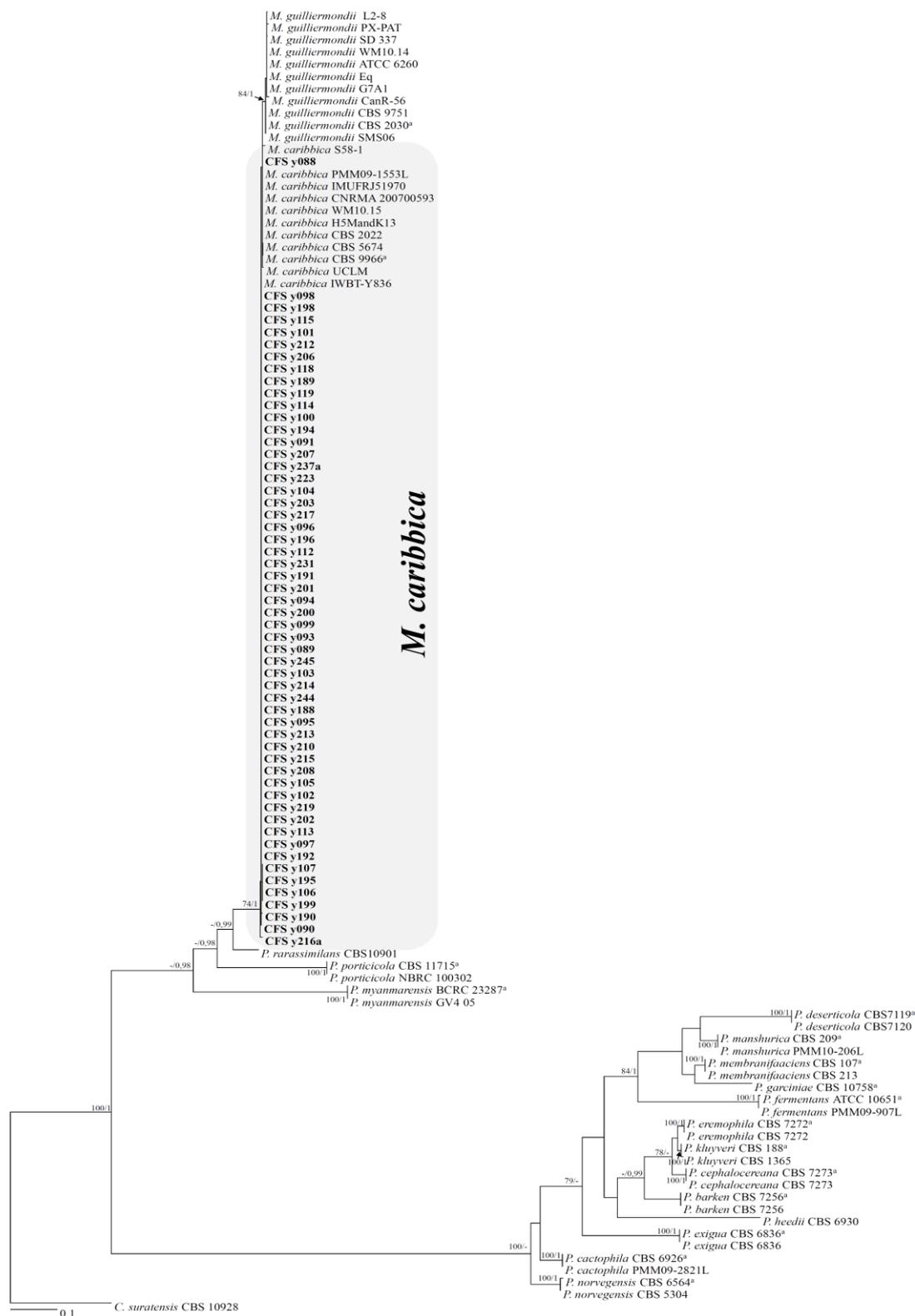


Fig. 3. Árvore de Máxima Verossimilhança – MV de espécies de leveduras, com ocorrências descritas, baseada nas regiões gênicas ITS, enraizada com *Candida suratensis* (CBS 10928). Os valores de Bootstrap $\geq 70\%$ (indicando ML/MP) e de probabilidade posterior Bayseana $\geq 0,95$ estão dispostos nos ramos, próximos aos nós. Sequências em negrito foram obtidas nesse estudo, a partir da microbiota de coqueiro, e estão destacadas no agrupamento colorido *M. caribbica*.

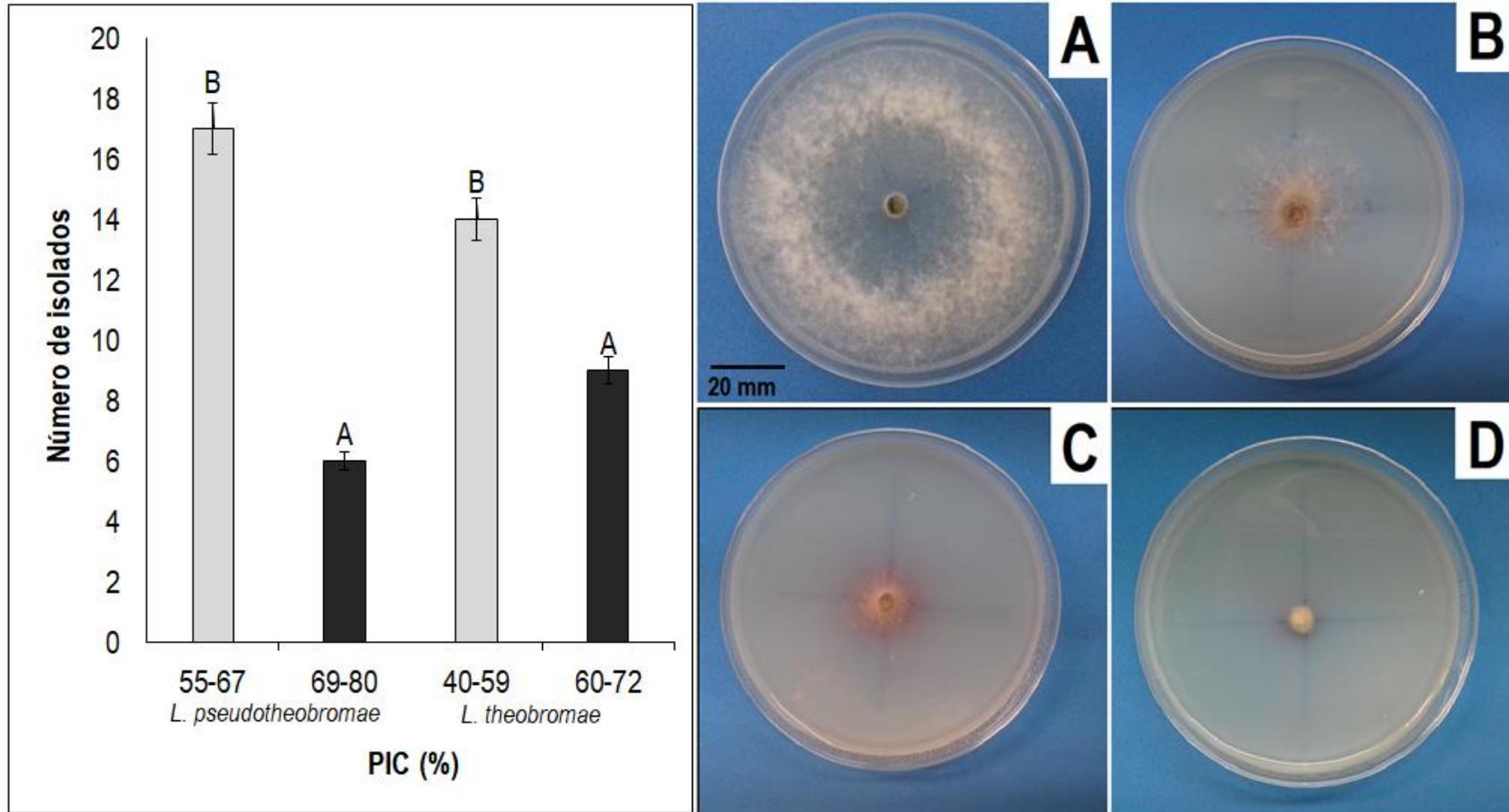


Fig. 4. Frequência e agrupamento (barras A e B) de *M. caribbica* quanto a porcentagem de inibição de crescimento micelial – PIC (%) de *L. pseudotheobromae* e *L. theobromae* em cultivo *in vitro* (a esquerda). *L. theobromae* cultivada em meio YEPD + *M. caribbica*, sem inibição de crescimento (A) e PIC de 50 (B), 70 (C) e acima de 80 (D) % (a direita).

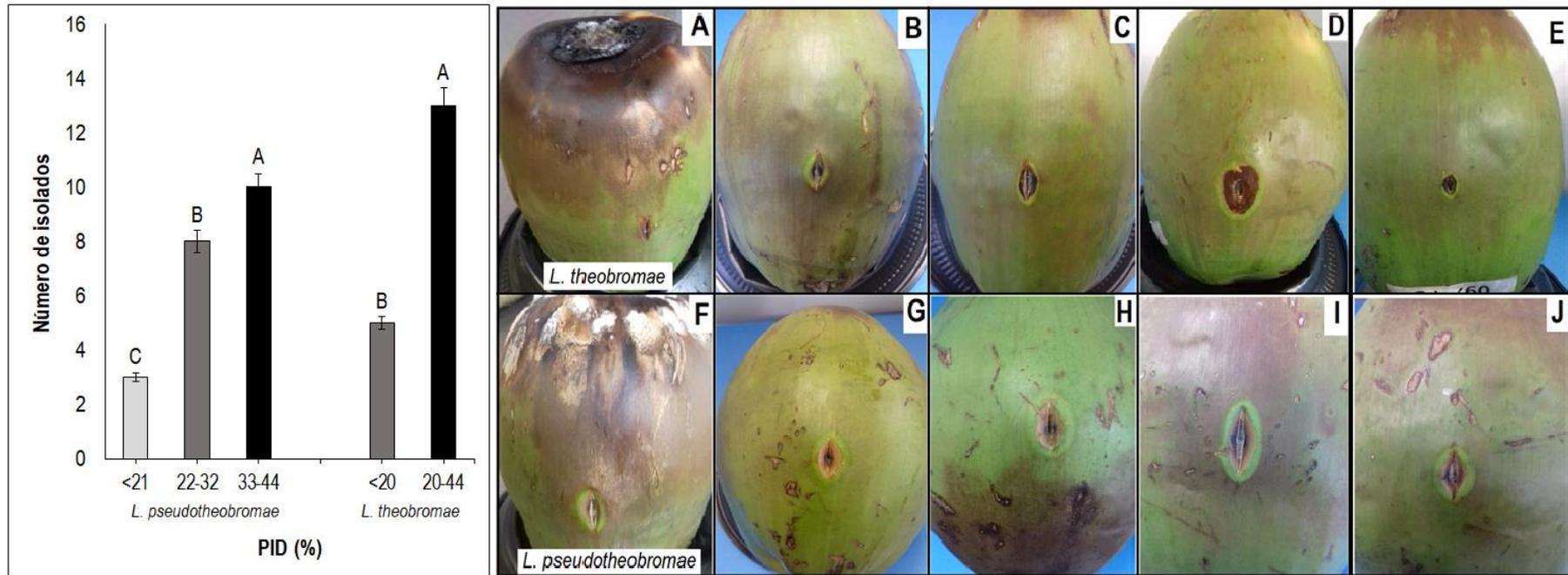


Fig. 5. Frequência e agrupamento de *M. caribbica* (barras A, B e C) quanto a porcentagem de inibição de podridão basal – PID (%) em coco-anão-verde, inoculados com *L. pseudotheobromae* e *L. theobromae* (a esquerda). Sintomas da podridão basal em frutos não tratados (A e F); tratados com Difenconazol (B e G), Tiabendazol (C e H), leveduras do grupo B ou C (D e I), leveduras do grupo A (E e J) e, posteriormente, inoculados com *L. theobromae* e *L. pseudotheobromae*, respectivamente (a direita).

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

- A combinação de sequências gênicas amplificadas das regiões ITS e *tef1-a* é eficiente para identificação preliminar de espécies de *Lasiodiplodia*.
- *Lasiodiplodia subglobosa* compõe o complexo de espécies de *Lasiodiplodia*, relacionado a queima-das-folhas e podridão basal em coco, no Nordeste brasileiro;
- Em relação a sintomatologia da podridão basal em coco-anão-verde, *Lasiodiplodia pseudotheobromae* e *L. theobromae*, comparadas s às demais espécies, comportam-se como fitopatógenos de maior virulência, assim devem ser consideradas como principais alvos no controle da queima das folhas do coqueiro e podridão basal de coco;
- Isolados de *L. theobromae* diferem quanto a severidade da podridão basal em coco-anão-verde dessa forma, essa variabilidade deve ser considerada nos estudos e aplicações de medidas de controle dessa doença.
- Sequências gênicas amplificadas das regiões ITS são eficientes para identificar e agrupar separadamente *Meyerozyma caribbica* em relação a *M. guilliermondii* e *Pichia* spp.;
- *M. caribbica* é a levedura mais abundante, presente naturalmente na microbiota de coco, logo pode ser considerada como espécie ‘chave’ a novos estudos de prospecção e eficiência de BCAs;
- Isolados de *M. caribbica* podem produzir metabólitos com variado potencial inibidor sobre o crescimento micelial de *L. pseudotheobromae* e *L. theobromae in vitro*, portanto, são necessários estudos minuciosos sobre a natureza e modo de ação desses compostos;
- *M. caribbica* apresenta potencialidade biocontroladora da podridão basal em coco-anão-verde causada por *L. theobromae* e *L. pseudotheobromae*, podendo torna-se aplicável em sistemas de manejo integrado dessa doença, no entanto, estudos futuros são necessários.