

## ESTUDOS DA INTERAÇÃO *Lasiodiplodia theobromae* x MANGUEIRA E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ISOLADOS DO PATÓGENO

Severina Rodrigues de Oliveira Lins <sup>a\*</sup>; Eduardo Alves <sup>b</sup>; Sônia Maria Alves de Oliveira <sup>c</sup>.

<sup>a,c</sup>Departamento de Agronomia, Área de Fitosanidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP 52171-900, Recife, PE; e-mail: ninarlins@yahoo.com.br, s.oliveira@depa.ufrpe.br. <sup>b</sup>Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Campus UFLA - Caixa Postal 3037 - CEP 37200-000 - Lavras MG; e-mail: ealves@ufla.br

\*Autor para correspondência: Severina Rodrigues de Oliveira Lins. UFLA, Depto. De Agricultura/Setor de Sementes. Campus Universitário. Caixa Postal 3037, CEP: 37200-000. Lavras-MG. ninarlins@yahoo.com.br. (35) 9106 2250.

Recibido: Abril 2010. Aprobado: Julio 2010.

Publicado: Noviembre 2010.

### RESUMO

*Lasiodiplodia theobromae* é um fitopatógeno, o qual apresenta ocorrência em todas as regiões produtoras de manga do Brasil e no mundo causando sérios problemas, tanto nas árvores quanto nas frutas, principalmente na fase de pós-colheita. Até o presente, nenhum estudo mostrou como ocorre, naturalmente, a infecção da fruta pelo fungo. Este estudo objetivou analisar: ramos, pedúnculos e pecíolos ligados a frutos em estágio de colheita, com e sem sintomas da doença, pela microscopia eletrônica de varredura, (MEV), confirmar a presença do agente etiológico nos tecidos e estudar caracteres morfológicos do mesmo. Fragmentos dos tecidos dos ramos e pedúnculos foram desinfestados e plaqueados em meio BDA, para isolamento do fitopatógeno; outros fragmentos foram submetidos a criofraturas para análise em MEV. O fungo cresceu em meio de cultura, apenas de tecidos com o sintoma da doença, e, após 25 dias formou picnídios agregados, estromáticos e ostiolados, característicos de *L. theobromae*, os quais foram submetidos a criofraturas e observados também em MEV. A análise ultraestrutural dos picnídios revelou que estes são subovóides a elipsóides, de parede espessa, contendo em seu interior, conídios cujas dimensões variaram entre 18-26µm x 11-15µm. Na análise dos pedúnculos sintomáticos, constataram-se hifas crescendo pelos tubos do xilema e penetrando através das células e invadindo tecidos do lenho. Não foi observada qualquer estrutura fúngica em tecidos sem sintomas da podridão. Estes resultados permitem confirmar que *L. theobromae* está presente em ramos de mangueiras e que a colonização ocorre de forma descendente até o pedúnculo onde, posteriormente, penetra a fruta.

**Palavras chave:** *Mangifera indica*, microscopia eletrônica de varredura, microscopia de luz.

### STUDIES OF THE INTERACTION *Lasiodiplodia theobromae* x MANGO AND MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE ISOLATES

#### ABSTRACT

*Lasiodiplodia theobromae* is a phytopathogen that is present in Brasil and all mango-producing regions around the world, causing serious problems, both in trees and fruits, especially in the post-harvest. To date, no study has shown how the infection occurs. The study focused branches, stems and petioles attached to fruit maturity stages, with and without symptoms of the disease by scanning electron microscopy (SEM) to confirm the presence of the agent in tissues and morphological studies on it. Fragments of the tissues of the branches and stems were surface sterilized and plated on PDA to isolate the pathogen, other fragments were submitted to criofraturas for scanning electron microscopy. The fungus grew in culture only from tissue with the symptoms of the disease, and, after 25 days, pycnidia formed aggregates, and estromat ostiole, characteristic of *L. theobromae*, which were submitted to criofraturas and also observed by SEM. The ultrastructural analysis of pycnidia revealed that these are subovoid to ellipsoid, thick-walled, containing its interior, conidial dimensions ranged from 18-26 µm x 11-15 µm. In the analysis of symptomatic stems, there were hyphae growing through the tubes and into the xylem through the cells and tissues invading the wood. It was not observe any structure in fungal tissues without symptoms of decay. These results indicate that *L. theobromae* is present in branches of mango trees and that colonization occurs in descending to stalk where it penetrates in the fruit.

**Keywords:** *Mangifera indica*, scanning electron microscopy, light microscopy.

## INTRODUÇÃO

A podridão peduncular ou podridão por *Lasiodiplodia* em manga (*Mangifera indica* L.) é uma doença importante, principalmente na fase de pós-colheita e ocasiona perdas econômicas relevantes. Entretanto, essa doença ocorre ainda nos ramos e pecíolos onde recebe os nomes de seca de ponteiros, morte descendente ou cancro de tronco e de ramos [1, 2, 3].

Estas doenças vêm se constituindo em um sério problema para as regiões agrícolas do Brasil, ocasionando diversos danos nos pomares de mangueira, uma vez que reduz a vida útil, diminui a produção, desqualifica os frutos para fins de comercialização e aumenta os custos de cultivo [4]. Na Costa Rica é a segunda doença pós-colheita mais importante, depois da antracnose e em outros países a doença causa relevantes perdas em pós-colheita de manga, recebendo atenção de pesquisadores [5, 6, 7]. Recentemente foi relatada como uma das doenças pós-colheita que mais reduz a qualidade de manga, no Senegal [1].

A morte descendente e a podridão peduncular têm como agente etiológico *Lasiodiplodia theobromae* (*L. theobromae*) (Pat.) Riffon & Maubl. (*Botryosphaeria* Ces & De Not.) [8, 9, 10, 11]. Este fungo pertence à família *Botryosphaeriaceae* [12] cujas espécies são conhecidas por serem cosmopolitas, com larga gama de hospedeiros e ampla distribuição geográfica [2, 13, 14, 15, 16], comumente encontrada nas regiões tropicais [13] e temperadas [4, 16, 17].

O primeiro relato de *L. theobromae* no Brasil foi em 1991, quando se confirmou sua associação com a morte de mangueiras em vários pomares, na região Semi-Árida do Nordeste [3]. Posteriormente, Nogueira *et al.* [18] publicaram novo relato de perdas severas em frutos de mangueira no Estado de São Paulo. Atualmente, este fitopatógeno tem sido relatado em vários estados produtores de manga, localizados nas regiões Nordeste, Centro Oeste e Sudeste do Brasil [2, 4, 17, 19].

*Lasiodiplodia theobromae* apresenta colonização localizada e progressiva, destruindo célula por célula, até penetrar no interior do órgão vegetal. Frutos em estágio fenológico mais avançado, que permanecem aderidos à árvore, quando infectados, apresentam necrose no pedúnculo, que pode provocar sua queda ou progredir até a base deste. Na infecção do pedúnculo, o fungo permanece quiescente mantendo baixo nível de metabolismo até o fruto amadurecer [20, 21], quando ativa fatores de patogenicidade que resultam em parasitismo ativo nos tecidos do hospedeiro [22].

A podridão peduncular se desenvolve na pós-colheita em um período de três a 12 dias, em frutas armazenadas em temperatura ambiente. Contudo, uma vez iniciado o processo, o apodrecimento ocorre em toda fruta dentro de dois a três dias [1]. O sintoma inicial é de consistência aquosa com bordos definidos na casca da fruta, ao redor do pedúnculo, devido à ação de enzimas pectinolíticas. Posteriormente, essa parte fica enegrecida e as manchas coalescem. A necrose permanece abaixo da cutícula e pode afetar toda a polpa da fruta, em torno de sete dias, podendo romper a casca da fruta por onde é liberado um fluido decorrente da destruição celular. Em estágio avançado é comum observar o crescimento micelial com posterior produção de picnídios ao redor da lesão [20].

Considerando a importância da podridão peduncular na pós-colheita de manga com relação as perdas econômicas, aos eventos já descritos para essa enfermidade e que nenhum estudo mostrou como ocorre, naturalmente, a infecção da fruta pelo fungo, o objetivo desta pesquisa foi analisar tecidos de ramos, pedúnculos e frutos advindos de árvores de mangueira com sintomas de morte descendente e descrever o agente etiológico pelas estruturas fúngicas encontradas nestes tecidos através de análises em microscópio eletrônico de varredura.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Coleta do material e obtenção dos isolados

Amostras de ramos, pecíolos e pedúnculos com e sem sintomas de morte descendente, foram coletadas de mangueiras, em pomares de mangueira da cultivar ‘Tommy Atkins’, em pomares localizados em Petrolina, PE. Fragmentos dos tecidos foram desinfestados e plaqueados em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), para obtenção dos isolados, os quais foram submetidos a culturas monospórica em BDA e, posteriormente, feita a caracterização morfológica e de patogenicidade. Outros fragmentos foram fixados em Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2; CaCl<sub>2</sub> 0,001M) para as análises ultra-estruturais internas, em microscópio eletrônico de varredura. O experimento foi conduzido no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

### Caracterização morfológica

Características morfológicas (dimensões, forma, cor, presença de septo e estrias longitudinais) presentes nos conídios foram utilizadas para identificação do fitopatógeno. Cada isolado monospórico foi cultivado em BDA por 25 dias, tempo necessário para a formação de estruturas reprodutivas. Após este período, picnídios foram retirados do meio e macerados em água esterilizada e filtrados em gaze dupla, para extração dos conídios. O comprimento e a largura de conídios foram mensurados sob microscópio de luz (modelo Observer Z1, Carl Zeiss) e em microscópio eletrônico de varredura (LEO Evo40). Foram mensurados vinte conídios por isolado.

### Patogenicidade em frutas

Mangas, sem sintomas da doença, após serem lavadas com sabão em água corrente e secas em temperatura ambiente, foram feridas com auxílio de um furador com oito estiletos de 2 mm de profundidade, na região

equatorial. Em cada ferimento foi depositado um disco de meio BDA com 5 mm de diâmetro contendo estruturas fúngicas dos isolados, extraído da borda de colônias com sete dias e cultivadas em temperatura ambiente.

O experimento foi estabelecido em esquema inteiramente casualizado, com duas repetições por isolado. Cada repetição foi constituída de uma fruta, inoculada em dois pontos. A testemunha foi inoculada com disco do meio BDA na região equatorial. Após a inoculação, as frutas foram mantidas em câmara úmida por 48h, sob temperatura ambiente de  $25 \pm 2$  °C. A patogenicidade dos isolados foi observada 72 horas após a retirada da câmara úmida mediante a observação de lesões, ocasião em que foram realizados novos isolamentos. Uma fruta inoculada por isolado foi utilizada para os isolamentos, apenas para confirmação da espécie. Outra fruta permaneceu nas mesmas condições de temperatura e umidade até a formação de picnídios nas lesões. O teste foi repetido duas vezes.

### Análises em microscópio eletrônico de varredura

Para as análises anatômicas dos tecidos fragmentos de ramos, pecíolos e pedúnculos, pré-fixados, foram transferidos para Glicerol 30% por 30 minutos e, em seguida, submetidos a crio fratura em nitrogênio líquido. Foram feitos cortes transversais para observação interna dos vasos condutores. Após cortadas, as amostras foram lavadas três vezes, durante 10 minutos, em tampão cacodilato 0,05M e imersas em uma solução de tetróxido de ósmio 1% (Os O<sub>4</sub>), em tampão cacodilato de sódio 0,05M pH 7,2, por uma hora. Após este tempo, as amostras foram novamente lavadas e submetidas a soluções de concentrações crescentes de acetona, 25%, 50%, 75%, 90% e 100%, para desidratação, permanecendo 10 minutos em cada concentração. Posteriormente as amostras foram levadas para o aparelho de ponto crítico (Balzers CPD 030) para substituição da acetona por CO<sub>2</sub> e complementação da secagem. Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio, *stubs*, com fita de carbono dupla

face colocada sobre uma película de papel alumínio, cobertos com ouro no evaporador Balzers SCD 050 para serem observados em MEV. Picnídios formados a partir dos isolamentos, também foram submetidos a esta metodologia, para análises internas. Todas as imagens geradas foram digitalizadas e analisadas em diferentes aumentos. Imagens foram selecionadas e processadas usando o Corel Draw 12 Software.

## RESULTADOS

### Teste de patogenicidade

Não houve diferença estatística entre os isolados quanto à patogenicidade. Todos foram patogênicos nas frutas e exibiram sintomas e sinais da podridão peduncular. Após 60 horas ocorreram lesões, a partir do ponto de inoculação. Fazendo-se cortes na região equatorial e retirando-se a polpa das mangas, observou-se o avanço das lesões em direção ao pedúnculo. Após dez dias, houve coalescimento das lesões com formação de picnídios nas frutas, para todos os isolados.

### Caracterização morfológica dos isolados

Os isolados obtidos de tecidos com sintomas de morte descendente (ISR1, ISP1, ISP2, ISPC1, ISPC2 e ISPC3) cresceram em meio de cultura com micélio, inicialmente branco, tornando-se, posteriormente, cinza esverdeado a preto com aspecto algodinoso, cobrindo toda superfície da placa em 48 horas. Houve formação de picnídios a partir do décimo segundo dia com formação de conídios maduros, após 25 dias. Não houve variação de tempo, na formação de estruturas reprodutivas, para os diferentes isolados. Todos os picnídios foram ostiolados, formados em tecido estromático, contendo em seu interior diversas câmaras contendo conídios, (FIGURA 1A). De acordo com as características morfológicas, observou-se que os conídios, quando jovens, não apresentam septos, são ovóides, hialinos e de parede delgada e dupla enquanto que os maduros são ovóides a elipsóides, pigmentados, apresentam um septo transversal com estrias longitudinais e as paredes são espessas (FIGURA 1B).

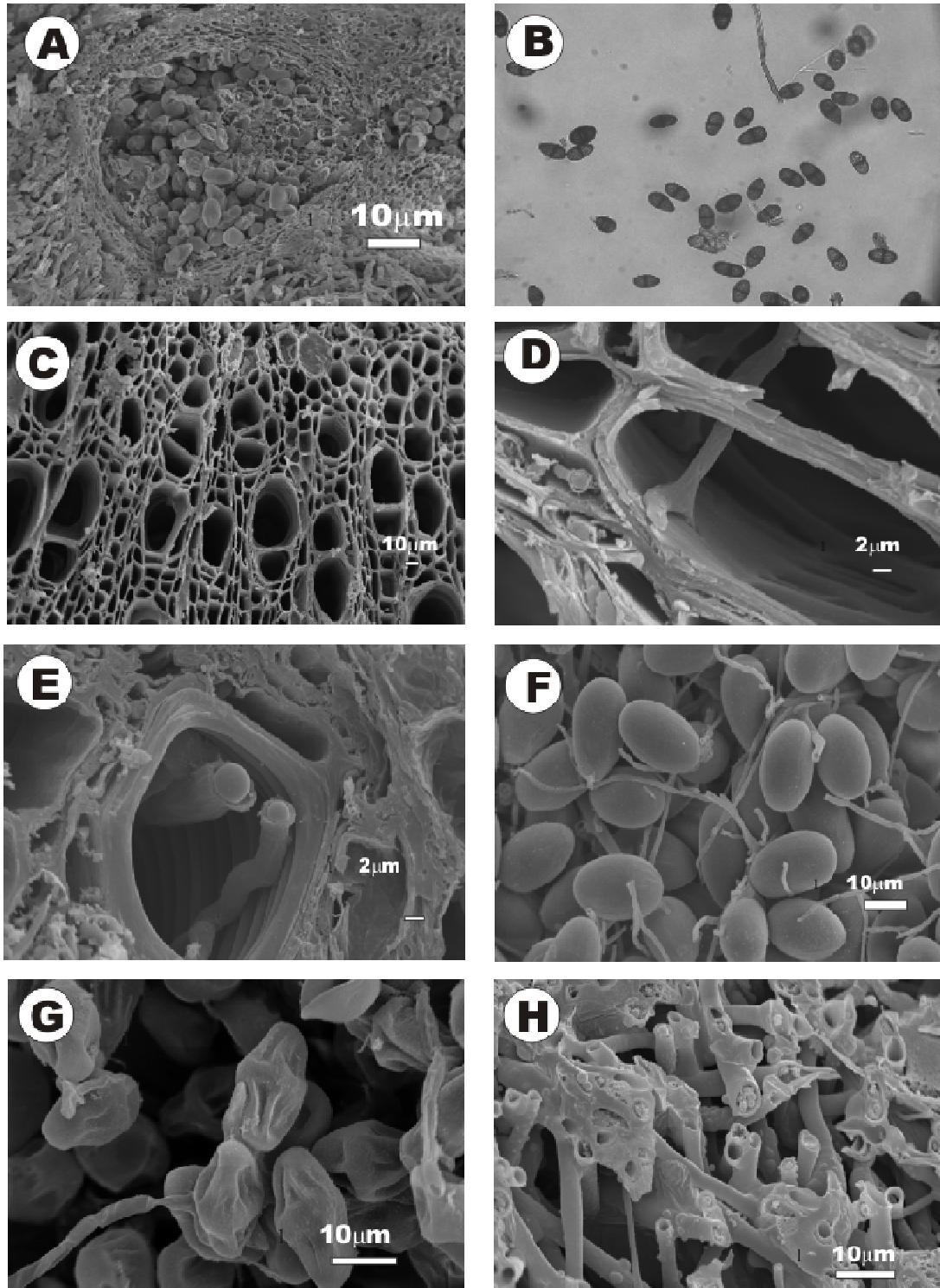
As mensurações de comprimento e largura revelaram variação nos tamanhos dos conídios que mediram entre 18-26 x 11-15µm. Essa variação ocorreu uniformemente em todos os isolados.

### Análises de microscopia eletrônica de varredura

Nos tecidos sem sintomas não se observaram estruturas de microrganismos (FIGURA 1C). Na análise dos pedúnculos e pecíolos sintomáticos, constataram-se hifas crescendo pelos tubos do xilema (FIGURA 1D) e penetrando através das células, invadindo tecidos do lenho (FIGURA 1E). Não foram encontrados conídios no interior dos vasos dos ramos, pedúnculos e pecíolos analisados em MEV. A partir de cortes transversais em picnídios crescidos em meio de cultura a partir dos isolamentos e submetidos à análise em MEV, foram observados conídios imaturos sem estrias (FIGURA 1F), sem septos e inicialmente envolvidos em uma mucilagem e conídios maduros com septos e estriados (FIGURA 1G). Observaram-se protuberâncias aderidas às paredes externas de hifas crescidas em meio de cultura por 25 dias (FIGURA 1H). Estes resultados foram observados para todos os isolados.

## DISCUSSÃO

Este estudo investigou a origem da podridão peduncular em manga a partir de tecidos coletados de pomares comerciais, em cultivar 'Tommy Atkins', localizados em Petrolina, Estado de Pernambuco, por isolamentos indiretos e análises de microscopia eletrônica dos tecidos. Baseados nos caracteres morfológicos, a partir dos isolamentos em meio de cultura, não houve variação de produção de picnídios, coloração de colônias, dimensão, septação e ornamentação de conídios, entre os seis isolados. Entretanto, observou-se variação no tamanho dos conídios dentro de cada isolado, típicos de *L. theobromae*. Estes resultados concordam com as descrições feitas por outros autores para esta espécie [13, 23, 24, 25, 26, 27].



**Fig. 1.** Micrografias eletrônicas de varredura de tecidos de mangueira da ‘Tommy Atkins’ com sintomas de morte descendente e estruturas reprodutivas de *Lasiodiplodia theobromae*. Pcnídio ostiolado contendo conídios em seu interior (A), conídios jovens e maduros, obtidos de isolamento de material com sintomas de morte descendente, em BDA, observados em microscópio de epifluorescência (B), tecido de ramo de material assintomático (C), e pecíolos com sintoma de morte descendente (D e E), ultranálise de conídios jovens (F) e maduros (G) de *L. theobromae*. Em H, detalhe de hifas crescidas em meio BDA, com presença de estruturas aderidas nas paredes externas.

Com relação à ornamentação e pigmentação dos conídios, os resultados relatados neste estudo são confirmados por descrições anteriores. Conídios inicialmente hialinos, asseptados de paredes finas quando jovens e, com um septo, de paredes pigmentadas e grossas com estrias longitudinais quando maduros, é a descrição documentada para esta espécie [25, 27, 28, 29, 30]. Espécies de *Botryosphaeriaceae* são geralmente identificadas pelas características morfológicas de seus anamorfos [29, 30, 31, 32, 33], uma vez que os teleomorfos são raramente encontrados na natureza, ou são difíceis de serem cultivados em culturas puras [27, 30, 31, 32]. Caracteres morfológicos de anamorfos dessa família, considerados úteis para sua delimitação taxonômica, incluem morfologia conidiais como ornamentação, forma, tamanho, cor, septação, espessura e textura da parede, entre outros [27, 32, 33].

Variação nas características morfológicas entre isolados de *L. theobromae* provenientes de diferentes hospedeiros e regiões geográficas é confirmada por vários autores. Ao avaliar as características culturais, crescimento micelial, esporulação, morfologia e patogenicidade de dez isolados de *L. theobromae* de diferentes hospedeiros, Ram [34] verificou que os isolados variaram na coloração da colônia, crescimento micelial, esporulação e patogenicidade. Moraes *et al.* [35] observaram variação de um isolado de *L. theobromae*, oriundo de lesão em ramo de planta cítrica, quando crescidos em diferentes meios de cultura. Pereira *et al.* [19] caracterizaram, em diferentes meios de cultura, oito isolados de *L. theobromae* obtidos de diferentes hospedeiros quanto ao crescimento micelial, produção e fertilidade de picnídios, aspectos morfológicos das colônias e patogenicidade e constataram grande variação entre os isolados, em todas as características estudadas. Recentemente, Costa [36] caracterizou 92 isolados de *L. theobromae* coletados de mangueiras, pelo seqüenciamento do DNA e caracteres morfológicos. Pelas investigações da autora o tamanho

dos conídios desses isolados variou numa faixa entre 18-27µm x 11-15 µm.

Em contrapartida, os resultados observados neste estudo revelaram pouca diferença morfológica entre os isolados. Contudo, é importante considerar que houve padronização para condições de crescimento dos isolados. Os isolamentos foram realizados no mesmo dia e foi utilizado apenas um meio de cultura e as condições ambientais para o crescimento dos isolados foram as mesmas. Entretanto, todas as observações constatadas estão de acordo com os resultados de pesquisas anteriores, ficando esclarecida a etiologia da morte descendente em mangueira, bem como, da podridão peduncular em manga.

Quanto ao material mucilaginoso constatado envolvendo os conídios presentes no interior dos picnídios, pode se tratar de uma matriz celular importante para proteção e adesão, como constatada em outras espécies fúngicas. Os fungos são capazes de produzir substâncias com características mucilaginosas que podem acumular do lado externo da célula, constituindo o que chamamos de matriz extracelular. Entre os fungos em que a matriz celular é importante para adesão, temos os que acumulam material adesivo antes da germinação e outros que produzem material mucilaginoso adesivo somente após a germinação [37], embora a adesão mediada por mucilagem não seja regra [38].

No teste de patogenicidade, o aparecimento das lesões só ocorreu após 60 horas. Entretanto, relatos evidenciam que após 48 horas, em uma faixa de temperatura de 25-30°C, já é possível observar lesões em mangas inoculadas [20, 36]. Contudo, este estudo foi realizado em região de clima ameno, onde a temperatura, no primeiro semestre do ano de 2009, não ultrapassou 23°C [39] sendo dessa forma, requerido tempo maior para o aparecimento de lesões nas frutas inoculadas.

Foi confirmada presença de hifas no interior dos vasos de ramos, pecíolos e pedúnculos de plantas com sintomas e sinais de morte descendente, confirmando a colonização

descendente pelo fitopatógeno. Até o presente, nenhum estudo tinha sido desenvolvido para a investigação ultraestrutural de tecidos de mangueira com sintomas de morte descendente, sendo este, o primeiro relato. Por outro lado, *L. theobromae* tem sido relatada como patógeno de mangueira no Brasil. [3, 18, 40] e em outros países [1, 20, 28, 41, 42], ocasionando prejuízos relevantes tanto na produção como na pós-colheita. Além da manga, *L. theobromae* causa perdas severas em outras frutas na pós-colheita. Em 2004 foi constatada queda de frutos imaturos em plantas de coqueiro anão verde, provenientes de plantio comercial no município do Cantá, em Roraima. O fungo foi isolado, observando-se colônias acinzentadas com formação de estromas e picnídios estromáticos, com conídios maduros bicelulares, de coloração marrom escura e estrias longitudinais, medindo de 23-29 x 13-15 µm, identificando-se o fitopatógeno como *L. theobromae* [43].

A podridão peduncular em manga é uma doença pós-colheita que causa grandes prejuízos, relatada por vários autores [1, 7, 18, 28, 42]. Contudo, o fungo ao infectar a base do pedúnculo, fica em estágio de quiescência enquanto a fruta não atinge o estágio climatérico, ativando seu crescimento quando são disponibilizadas condições favoráveis para seu desenvolvimento. Este evento foi constatado anteriormente em mangueira [5] maçã [44, 45, 46], sementes [17, 47, 48, 49, 50] bem como em outras culturas, por espécies de *Botryosphaeriaceae* [13, 22, 30, 50]. Relatos sobre infecções sistêmicas em árvore de pinus oriundas de sementes infectadas foram publicados recentemente [11, 51].

Frutas climatéricas passam por uma série de transformações endógenas resultantes do metabolismo celular, após a colheita. O aumento dos açúcares solúveis, de água livre e das pectinas, é acompanhado pela redução de alguns componentes fenólicos e protopectínicos, que as tornam mais sensíveis ao ataque de microrganismos, principalmente de fungos causadores

de podridões [52]. Diversos autores relataram que a proximidade da fase de amadurecimento de frutos favorece a expressão das infecções latentes, as quais podem surgir também durante a pós-colheita ou a senescência [53, 54, 55, 56]. Estudos detalhados da infecção de *Botryosphaerea dothidea* em frutos de macieira com infecções latentes revelaram presença de glóbulos de lipídio nas hifas do fungo. De acordo com estes relatos, os glóbulos encontrados habilitam *B. dothidea* em estágio de quiescência, a suportar a deficiência nutricional enquanto a fruta permanecer imatura, bem como, a defesa da hospedeira [44]. Outros estudos constataram que *L. theobromae* é encontrado, ainda como endofítico [15, 57]. As investigações feitas pela MEV, neste estudo, revelaram que hifas crescidas em meio de cultura apresentam estruturas semelhantes às descritas por Kim *et al.* [44], entretanto, não foram realizadas análises químicas para confirmar a composição de tais estruturas.

Os resultados obtidos pelas investigações morfológicas e ultraestruturais desse estudo confirmam os relatos encontrados na literatura em relação a *L. theobromae*, agente causal da morte descendente e podridão peduncular em manga, o qual tem uma colonização descendente até o pedúnculo da fruta, quando, após a colheita, na ativação do estágio climatérico da fruta, causa perdas significativas [21, 40, 58].

## CONCLUSÕES

Estes resultados permitem concluir que *L. theobromae* está presente em ramos, caule e pedúnculos de mangueiras com sintomas de morte descendente.

A colonização ocorre de forma descendente até o pedúnculo onde, posteriormente, penetra a fruta.

Mangas de árvores com sintomas de morte descendente podem estar infectadas com *L. theobromae* em estágio de quiescência.

## AGRADECIMENTOS

Os autores expressam seus agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro, ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras e à Fundação de Apoio a Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio ao Laboratório de Microscopia Eletrônica/UFLA.

## REFERÊNCIAS

- [1] Diedhiou P.M., Mbaye N., Dramé A., Samb P.I. (2007) "Alteration of post harvest diseases of mango *Mangifera indica* through production practices and climatic factors" *African Journal of Biotechnology* 6(9):1087-1094.
- [2] Tavares S.C.C.H. (2002) "Epidemiologia e manejo integrado de *Botryodiplodia theobromae* - situação atual no Brasil e no mundo" *Fitopatologia Brasileira* 27:46-52.
- [3] Tavares S.C.C.H., Menezes M., Choudhury M.M. (1991) "Infecção da mangueira por *Botryodiplodia theobromae* Lat. na região Semi-Árida de Pernambuco" *Revista Brasileira de Fruticultura* 13(4):163-166.
- [4] Cunha M. M., Santos Filho H. P., Nascimento A. S. (2000) *Manga: fitossanidade* Frutas do Brasil 6:104.
- [5] Johnson G.I., Meade A.J., Cooke A.W., Dean J.R. (1992) "Mango stem end rot pathogens – Fruit infection by endophytic colonisation of the inflorescence and pedicel" *Annals of Applied Biology* 120: 225–234.
- [6] Khanzada M.A., Lodhi A.M., Shahzad S. (2004) "Pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Fusarium solani* on mango" *Pakistan Journal of Botany* 36(1):181-189.
- [7] Sharma I .M., Raj H ., Kaul J.L. (1994) "Studies on post-harvest diseases of mango and chemical control stem end rot and anthracnose" *Indian Phytopathology* 47:197-200.
- [8] Burgess T.I., Wingfield M.J., Wingfield B.D. (2004) "Global distribution of *Diplodia pinea* genotypes revealed using simple sequence repeat (SSR) markers" *Australasian Plant Pathology* 33:13–519.
- [9] Prusky D., Lichter A. (2007) "Activation of quiescent infections by post harvest pathogens during transition from the biotrophic to the necrotrophic stage" *Microbiological Letters* pp. 1-8.
- [10] Ramos L. J., Lara S.P., Mcmillan JR., R.T., Narayanan K.R. (1991) "Tip dieback of mango (*Mangifera indica*) caused by *Botryosphaeria ribis*" *Plant Disease* 75(3):315-318.
- [11] Smith H., Wingfield M.J., Dewet, J., Coutinho T.A. (2000) "Genotypic diversity of *Sphaeropsis sapinea* from South Africa and Northern Sumatra" *Plant Disease* 84:139-142.
- [12] Crous P.W., Slippers B., Wingfield M.J., Rheeder J., Marasas W.F.O., Phillips A.J.L. Alves A., Burgess T., Barber P., Groenewald J.Z. (2006) "Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae" *Studies in Mycology* 55:235-253.
- [13] Burgess T. I., Barber P. A., Mohali S., Pegg G., Beer W., Wingfield M. J. (2006) "Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology" *Mycologia* 98(3):423-435.
- [14] Gure A. Slippers B., Stenlid J. (2005) "Seed-borne *Botryosphaeria* spp. from native *Prunus* and *Podocarpus* trees in Ethiopia, with a description of the anamorph *Diplodia rosulata* sp. nov." *Mycological Research* 109(9):1005-1014.
- [15] Rubini M.R., Silva-Ribeiro R.T., Pomella A.W., Maki C.S., Araujo W.L., Santos D.R. Azevedo J.L. (2005) "Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease" *International Journal of Biological Sciences* 1:24-33.



- [16] Slippers B., Johnson G.I., Crous P.W., Coutinho T.A., Wingfield B.D., Wingfield M. J. (2005) "Phylogenetic and morphological re-evaluation of the *Botryosphaeria* species causing diseases of *Mangifera indica*" *Mycologia* 97(1):99-110.
- [17] Freire F.C.O., Viana F.M.P., Cardoso E., Santos A.A. (2004) *Novos hospedeiros do fungo Lasiodiplodia theobromae no estado do Ceará*, Fortaleza, EMBRAPA Agroindústria Tropical, Comunicado Técnico 91:6.
- [18] Nogueira E.M.C., Ferrari J.T., Louzeiro I.M. (2001) "Ocorrência de *Lasiodiplodia theobromae* causando perdas severas de frutos em mangueira no Estado de São Paulo". *Instituto Biológico* 68:53.
- [19] Pereira A.L., Silva G.S., Ribeiro V.Q. (2006) "Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*" *Fitopatologia Brasileira* 31:572-578.
- [20] Angel N.D., Ramos M.A., ORTIZ D.T., JOSE A.R. (2006) "Enfermidades del mango". In: Oliveira S.M.A., Terão M., Dantas S.A.F., Tavares, S.C.C.H. (Ed). *Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais*, Brasília: *Embrapa Informação Tecnológica* 1 ed. 733-774.
- [21] Johnson G.I. "Mango" In: Ploetz R.C., Zentmyer G.A., Nishijima W. T., Rohrbach K. G., Ohr, H.D. Eds. (1994) *Compendium of Tropical Fruit*, St. Paul, APS Press, pp. 33-43.
- [22] Petrini O., Fisher P.J. (1988) "A comparative study of fungal endophytes in xylem and whole stem of *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica*" *Transactions of the British Mycological Society* 91:233-238.
- [23] Alves A., Crous, P.W., Correia, A., Phillips, A.J.L. (2008) "Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*". *Fungal Diversity* 28:1-13.
- [24] Pavlic D., Slippers B., Coutinho T.A., Gryzenhout M., Wingfield M.J. (2004) "*Lasiodiplodia gonubiensis* sp. nov., a new *Botryosphaeria* anamorph from native *Syzygium cordatum* in South Africa" *Studies in Mycology* 50:313-322.
- [25] Phillips A.J.L., Alves A., Pennycook S.R., Johnston P.R., Ramaley A., Akulov A., Crous P.W. (2008) "Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the *Botryosphaeriaceae*" *Persoonia* 21:29-55.
- [26] Punithalingam E. (1976) "*Botryodiplodia theobromae*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria, Kew, Surrey, England" *Commonwealth Mycological Institute* 519:1-3.
- [27] Zhou S., Stanosz G.R. (2001) "Relationships among *Botryosphaeria* species and associated anamorphic fungi inferred from the analyses of ITS and 5.8S rDNA sequences" *Mycologia* 93:516-527.
- [28] Oliveira T.A.S., Oliveira S.M.A., Michereff S.J., Câmara M.P.S., Costa V.S.O., Lins S.R.O. (2008) "Efeito do estágio de maturação, tipo de inóculo e local de inoculação na severidade da podridão peduncular em manga" *Tropical Plant Pathology* 33(6):409-414.
- [29] Phillips A., Alves A., Correia A., Luque J. (2005) "Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs" *Mycologia* 97:513-529.
- [30] Slippers B., Wingfield M.J. (2007) "Review: *Botryosphaeriaceae* as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact" *Fungal Biology Review* 90:90-106.
- [31] Barber, P. A., Burgess T. J., Hardy G. E. ST. J. Slippers B., Keane P. J.; Wingfield M. J. (2005) "*Botryosphaeria* species from Eucalyptus in Australia are pleoanamorphic, producing *Dichomera* synanamorphs in culture" *Mycological Research* 109(12):1347-1363.
- [32] Jacobs K. A., Rehner S. A. (1998) "Comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of *Botryosphaeria* and related taxa" *Mycologia* 90(4):601-610.

- [33] Slippers B., Crous P.W., Denman S., Coutinho T.A., Wingfield B. D., Wingfield M. J. (2004) "Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*" *Mycologia* 96:83-101.
- [34] Ram, C. (1993) "Características culturais, esporulação e violência do "strain" de *Botryodiplodia theobromae*, agente causal da queima das folhas do coqueiro (*Cocos nucifera*)" *Fitopatologia Brasileira* 18:143-146.
- [35] Moraes W.S., Castro H.A., Leite E., Naves R.L., Campos S.S., Amorim L., Kimura M. (1995) "Caracterização morfológica e cultural de *Botryodiplodia theobromae* em diferentes meios de cultura" *Fitopatologia Brasileira* 20:366.
- [36] Costa, V.S.O. (2009) "Etiologia e aspectos epidemiológicos da morte descendente e podridão peduncular em mangueira no nordeste do Brasil" *Tese* (Doutorado em Fitopatologia). Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE pp. 82.
- [37] Leite B., Pascholati S.F., Watanabe E.W., Ishida, M. L. (2001). Mecanismos de adesão de bactérias e fungos às plantas hospedeiras. *Revisão Anual Annual Pathology Plant* 9:119-157.
- [38] Moore-landecker, E. (1996) *Fundamentals of the fungi*, New Jersey, Prentice Hall, pp. 574.
- [39] INMET-Instituto Nacional de Meteorologia (2009) "Previsão do tempo-municípios" [http://www.inmet.gov.br/html/prev\\_tempo.php?lnk=../prev\\_clima\\_tempo/municipios\\_p.html](http://www.inmet.gov.br/html/prev_tempo.php?lnk=../prev_clima_tempo/municipios_p.html) Acesso em 15 de abril de 2009.
- [40] Lins S.R.O., Alves E., Oliveira S.M.A. (2009) "Ultrastructural analysis of on twigs and petioles of mangos, with and without symptoms of rot petioler" *Acta Microscopica* 18(3):Supp B.
- [41] Arauz L.F. Wang A., Duran J.A., Monterrey M. (1994) "Causas y perdidas poscosecha de mango a nível mayorista en Costa Rica" *Agronomia Costarricense* 18: 47-51.
- [42] Gonzalez E., Umana G., Arauz L.F. (1999) "Combate de la pudricion peduncular del mango causada por *Botryodiplodia theobromae* Pat. mediante el mantenimiento de los pedicelos y el deslechado sobre laminas" *Agronomia Costarricense* 23(1):31-35.
- [43] Halfeld-Vieira B.A., Nechet K.L. (2005) "Queda de Frutos em Coqueiro Causada por *Lasiodiplodia theobromae* em Roraima" *Fitopatologia Brasileira* 30(2):203.
- [44] Kim K.W., Park E.W., Kim K.S. (2004) "Glyoxysomal Nature of Microbodies Complexed with Lipid Globules in *Botryosphaeria dothidea*" *Phytopathology* 94:970-977.
- [45] Kim K.W., Park E.W., Kim Y.H., Ahn K.K., Kim P.G., Kim K.S. (2001) "Latency- and defense-related ultrastructural characteristics of apple fruit tissues infected with *Botryosphaeria dothidea*" *Phytopathology* 91:165-172.
- [46] Parker, K.C., Sutton T.B. (1993) "Susceptibility of apple fruit to *Botryosphaeria dothidea* and isolate variation" *Plant Disease* 77:385-389.
- [47] Cilliers A.J., Swart W.J. Wingfield M.J. (1994) "Selective medium for *Lasiodiplodia theobromae*" *Plant Disease* 78:1052-1055.
- [48] Cilliers A.J., Swart W.J., Wingfield M.J. (1995) "The occurrence of *Lasiodiplodia theobromae* on *Pinus elliotii* seeds in South Africa" *Seed Science and Technology* 23:851-860.
- [49] Medeiros A.C.S., Mendes M.A.S., Ferreira M.A.S.V., Aragão F.J.L. (1992) "Avaliação qualitativa de fungos associados a sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* (fr. all.) engl.)" *Revista Brasileira de Sementes* 14(1):51-55.
- [50] Smith H., Wingfield M.J. Petrini O. (1996) "*Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus nitens* in South Africa" *Forest Ecology and Management* 89:189-195.

- [51] Burgess T., Wingfield B.D., Wingfield M.J. (2001) "Comparison of genotypic diversity in native and introduced populations of *Sphaeropsis sapinea* isolated from *Pinus radiata*" *Mycological Research* 105:133-1339.
- [52] Palazón I., Palazón C.F. (2000) "Micosis de los productos cosechados" In: Llácer G. López M.M., Trapero A., Bello A. Eds. (2000) *Patología vegetal*, Valencia, Phytoma-España 2, pp.967-994.
- [53] Cruickshank R.H., Wade G.C. (1992) "The activation of latent infections of *Monilinia fructicola* on apricots by volatiles from the ripening fruit" *Journal Phytopathology* 136(2):107-112.
- [54] Luo Y., Michailides T.J. (2001) "Analysis of factors affecting latent infection and sporulation of *Monilinia fructicola* on prune fruit" *Plant Disease* 85(9):999-1003.
- [55] Luo Y., Michailides T.J. (2003) "Threshold conditions that lead latent infection to prune fruit rot caused by *Monilinia fructicola*" *Phytopathology* 93:1:102-111.
- [56] Mari M, Casalini L, Baraldi E, Bertolini P, Pratella GC (2003) "Susceptibility of apricot and peach fruit to *Monilinia laxa* during phonological stages" *Postharvest Biology and Technology* 30:105-109.
- [57] Mohali S., Burgess T.I., Wingfield M.J. (2005) "Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers" *Forest Pathology* 35:385-396.
- [58] Ribeiro, I. J. A. (2005) "Doenças da mangueira (*Mangifera indica*). In: KIMATI, H.; Amorim L., Rezende J.A.M., Bergamim Filho A., Camargo L.E.A. (Eds.) *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas* Agronômica Ceres 2:457-465.