

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTACRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR



ESPÉCIES DE *Camarotella* QUE CAUSAM DOENÇA
FOLIAR NO COQUEIRO E EM OUTRAS PALMEIRAS

NADJA SANTOS VITÓRIA

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2007

V845

Vitória, Nadja Santos.

Espécies de Camarotella que causam doença foliar no coqueiro e em outras palmeiras / Nadja Santos Vitória. – Ilhéus : UESC. 2007.

75f. : il.

Orientador : José Luiz Bezerra.

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular.

1. Coqueiro – Doenças e pragas – Brasil. 2. Palmeiras-Doenças e pragas – Brasil. I. Bezerra, José Luiz. II. Título.

CDD – 632.7

NADJA SANTOS VITÓRIA

**ESPÉCIES DE *Camarotella* QUE CAUSAM DOENÇA FOLIAR NO
COQUEIRO E EM OUTRAS PALMEIRAS**

**Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa
Cruz, como parte das exigências
para obtenção do título de Mestre
em Genética e Biologia Molecular.**

**Área de concentração: Genética e
Biologia Molecular**

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2007

NADJA SANTOS VITÓRIA

ESPÉCIES DE *Camarotella* QUE CAUSAM DOENÇA FOLIAR NO COQUEIRO
E EM OUTRAS PALMEIRAS

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e
Biologia Molecular

APROVADA: 26 de Fevereiro de 2007

Dr. Rildo Sartori B. Coelho

UFRPE

Dra. Rachel Passos Rezende

UESC

Dra. Edna Dora Martins Newman Luz

CEPLAC

Dr. José Luiz Bezerra

CEPLAC – Orientador

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Arnaldo Francisco da Vitória e Maria da Natividade Santos Vitória, pelo amor, paciência e exemplos de vida, dedico.

À meu orientador José Luiz Bezerra grande incentivador desta vitória fossem quais fossem os obstáculos, a minha mais profunda admiração e o meu eterno agradecimento.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu porto seguro, por me ajudar a perseverar otimista nessa caminhada, transformando as dificuldades em força.

A minha mãe Natividade, pelo apoio, carinho e presença constante.

A Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), pela realização do curso.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Dr. José Luiz Bezerra, pela amizade, companheirismo, disposição, disponibilidade e orientação eficiente e criteriosa.

A Dra. Karina Gramacho, pelas sugestões e conhecimentos transmitidos.

Aos amigos do Laboratório de Biodiversidade de Fungos: Vinícius, Kátia e Gilliane pela presteza e disponibilidade para ajudar nos trabalhos.

A Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) onde desenvolvi meu trabalho de pesquisa, concedendo-me espaço para o meu desenvolvimento profissional.

A Stênio Carvalho pela prestimosa colaboração durante os momentos iniciais de adaptação de protocolos para extração de DNA das espécies de *Camarotella*.

Agradecimentos são devidos a Dra. Dulce Regina Nunes Warwick e ao Prof. Armínio Santos pelo envio de folíolos de coqueiro e outras palmeiras com lixas destinadas aos estudos morfológicos.

Aos colegas de curso, pela troca de idéias, pelo incentivo e pelo espírito de solidariedade durante o tempo de convívio.

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

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
EXTRATO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
3. CAPÍTULO 1: Espécies de <i>Camarotella</i> que causam doença foliar no coqueiro e em outras palmeiras	11
Resumo	11
Abstract.....	12
1. Introdução	13
2. Material e Métodos.....	14
3. Resultados	24
4. Discussão.....	64
5. Conclusões	68
6. Referências Bibliográficas.....	70

EXTRATO

VITÓRIA, Nadja Santos, M.S Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, janeiro de 2007. **Espécies de *Camarotella* que causam doença foliar no coqueiro e em outras palmeiras.** Orientador: José Luiz Bezerra. Co-orientadora: Karina Peres Gramacho.

Entre as doenças mais prejudiciais que incidem sobre a folhagem do coqueiro (*Cocos nucifera* L.), no Brasil, destacam-se a lixa-pequena e a lixa-grande que são responsáveis pela redução de até 50% do potencial produtivo da cultura, nos casos mais severos, embora não causem a morte da planta. A lixa-pequena do coqueiro foi primeiramente estudada por Batista (1946 e 1948), como ocorrendo desde a Bahia ao estado da Paraíba, tendo como agente etiológico uma nova espécie de Ascomycota designada *Catacauma torrendiella* Batista. Já a lixa-grande foi originalmente estudada por Montagne (1856) que denominou seu agente como *Dothidea acrocomiae* Mont. Desde 1999, *Camarotella acrocomiae* (Mont.) K. D. Hyde & P. F. Cannon é o binômio designado para o fungo causador das lixas grande e pequena. Folíolos tanto frescos quanto herborizados foram examinados ao microscópio estereoscópico, sendo efetuada a caracterização morfológica dos agentes etiológicos e a mensuração e fotomicrografia das estruturas de valor taxonômico. O estudo comparativo dos estromas periteciais e picnidiais, ascos e ascósporos das lixas do coqueiro demonstrou diferenças entre a lixa-grande e a lixa-pequena. Um total de 420 ascósporos provenientes das lixas do coqueiro e de outras palmeiras nativas foram medidos calculando-se as médias de comprimento e largura. Os ascósporos de lixa-grande além de serem geralmente rombudos e marrons, são menores e mais largos, enquanto os de lixa-pequena geralmente pontudos e hialinos. As médias de comprimento e largura desses ascósporos

foram 21,5 X 9,4 µm para lixa-grande e 23,2 X 8,5 µm para lixa-pequena do coqueiro. As palmeiras nativas *Attalea funifera* Mart. ex Spreng. (piaçava), *Bactris pickelli* Burret (tucum-mirim), *Bactris* sp. (coquinho), *Syagrus botryophora* (Mart.) Mart. (patioba), *S. microphylla* Burret (coquinho), *S. petraea* (Mart.) Becc. (tucum-de-índio), *S. vagans* (Bondar) A.D. Hawk. (pindoba) e *S. werdermannii* Burret (coco-de-raposa) estão sendo reportadas nesse trabalho como novos hospedeiros de lixas ainda desconhecidos na literatura. Dentre as palmeiras nativas estudadas apenas a espécie *A. funifera* apresentou espécies de *Camarotella* típicas de lixa-grande e de pequena. As médias dos ascósporos de *Camarotella* nesse hospedeiro foram 20,4 x 6,3 µm para lixa-pequena e 26,4 x 9,1 µm para lixa-grande. As palmeiras *Bactris ferruginea* Burret, *B. pickelli*, *Bactris* sp., *S. botryophora*, *S. microphylla*, *S. petraea*, *S. schizophylla*, *S. vagans* e *S. werdermannii* apresentaram sintomas de lixa-pequena, enquanto *Attalea geraensis* Barb. Rodr. apresentou sintomas de lixa-grande. Uma nova espécie de *Camarotella* foi encontrada no hospedeiro *Syagrus schizophylla* (Mart.) Glassman com médias de ascósporos 45,1 x 5,5 µm. Visando confirmar o crescimento dos agentes de lixa em meio artificial, foram testados vários tipos de meios de cultura, entre eles o meio líquido completo e meio mínimo sólido em pH variando de 3,0 a 7,0, no entanto o resultado foi negativo. O modo de infecção do fungo causador da lixa-pequena do coqueiro foi elucidado através de testes de inoculação com ascósporos e picnidíósporos em folíolos jovens e sadios de coqueiro. Em consequência das dificuldades com o cultivo dos agentes etiológicos das lixas, otimizou-se um protocolo para extração de DNA a partir do himênio ascógeno *in natura* e um protocolo de NESTED-PCR para sua amplificação. Os dados morfológicos e moleculares demonstraram diferenças entre as lixas de coqueiro e permitiram classificar os seus agentes como *Camarotella torrendiella* (Batista) Bezerra & Vitória comb. nov (lixa-pequena) e *C. acrocomiae* (Mont.) K. D. Hyde & P. F. Cannon (lixa-grande).

Palavras-chaves: *Cocos nucifera*, lixas-do-coqueiro, *Camarotella acrocomiae*, *C. torrendiella*, taxionomia, NESTED-PCR.

ABSTRACT

VITÓRIA, Nadja Santos, M.S Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, January 2007. Species of *Camarotella* that cause foliar disease in the coconut palm and other palms. Advisor: José Luiz Bezerra. Co-advisor: Karina Peres Gramacho.

Among the more harmful foliage diseases of the coconut (*Cocos nucifera* L.), in Brazil, the small and large verrucosis are the ones that can reduce up to 50% of the productive potential of the culture, without causing the death of the plant. The small verrucosis on coconut was studied first by Batista (1946 and 1948) in Brazil, as occurring from the state of Bahia to the state of Paraíba, having as causal agent a new species of Ascomycota named *Catacauma torrendiella* Batista. The large verrucosis was studied originally by Montagne (1856) who called it *Dothidea acrocomiae* Mont. Since 1999, *Camarotella acrocomiae* (Mont.) K. D. Hyde & P. F. Cannon became the correct name to apply to the causal agent of both small and large verrucosis. Fresh and dried leaflets were examined at the microscope where morphologic characterization, measurements and illustrations of the causal agents were made. The comparative study of stromata, ascomata, picnidia, asci and ascospores demonstrated differences between small and large verrucosis. A total of 420 ascospores from ascomata of coconut and of other native palms were measured and the averages of ascospores length and width were calculated. The ascospores of large verrucosis were generally blunt, brown, shorter and wider, while those of small verrucosis were generally acute and hyaline, longer

and narrower. The averages of length and width of these ascospores were 21,5 X 9,4 μm for large verrucosis and 23,2 X 8,5 μm for small verrucosis on coconut. Amongst the native palms studied only the *Attalea funifera* species presented large and small verrucosis caused by *Camarotella*. The average size of *Camarotella* ascospores in this host had been 20,5 x 6,1 μm for small verrucosis e 26,4 x 9,1 μm for large verrucosis. The palms *Bactris ferruginea*, *B. pickelli*, *Bactris* sp., *Syagrus botryophora*, *S. microphylla*, *S. petraea*, *S. schizophylla*, *S. vagans* and *S. werdermannii* presented symptoms of small verrucosis, while *Attalea geraensis* symptoms of large verrucosis. These hosts are considered new reports for *Camarotella*. A new species of *Camarotella* was found on *Syagrus schizophylla* with ascospores averaging 45,1 x 5,5 μm . To confirm the growth of the agents of verrucosis *in vitro* isolation was tried using complete liquid medium and solid minimum medium in pH varying from 3,0 to 7,0. The mode of infection of the fungus causing the small verrucosis on coconut was elucidated through inoculation tests with ascospores and picnidiospores on healthy young coconut leaflets. Because the difficulties to cultivate the causal agents of verrucosis a DNA protocol extraction was improved using ascal hymenium *in natura* and a NESTED-PCR protocol for amplification. The molecular and morphological data showed differences between the coconut small and larg verrucosis allowing to classify its agents as *Camarotella torrendiella* (Batista) Bezerra & Vitória comb. nov. (small verrucosis) and *C. acrocomiae* (Mont.) K. D. Hyde & P.F. Cannon (large verrucosis).

Key words: *Cocos nucifera*, verrucosis, *Camarotella acrocomiae*, *C. torrendiella*, taxonomy, NESTED -PCR.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Data, local e hospedeiros com sintomas de lixa obtidos de palmeiras de diferentes municípios dos estados da Bahia, Espírito Santo e Amazonas.....15

Tabela 2. Exsicatas de Arecaceae depositadas no herbário do CEPEC apresentando estromas de lixas.....16

Tabela 3. Procedência e hospedeiros dos isolados das lixas grande e pequena utilizados para extração de DNA.....19

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Mapa da organização dos genes ribossomais e localização dos primers no rDNA.....	10
Figura 2. <i>Camarotella torrendiella</i> e <i>C. acrocomiae</i> em coqueiro anão.....	46
A. Estromas periteciais de lixa-pequena e lixa-grande no mesmo folíolo	
B. Queima da extremidade da folha para base	
Figura 3. <i>Camarotella torrendiella</i> em coqueiro anão.....	46
Lixa-pequena do coqueiro: estromas negros dispostos no sentido das nervuras	
Figura 4. <i>Camarotella torrendiella</i> em coqueiro.....	47
A-B. Estromas ascígeros	
C. Himênio mucoso	
D-F. Ascos e paráfises	
G. Ascósporos hialinos, com e sem bainha mucosa.	
Figura 5. <i>Camarotella torrendiella</i> em coqueiro.....	48
A-B. Estromas picnidiais	
C-D. Picnidióforos e conídios	
Figura 6. <i>Catacauma torrendiella</i> de coqueiro.....	49

Peritécios intraepidermais ostiolados, com ascos, paráfises, ascósporos e perífises.

Figura 7. *Catacauma torrendiella* de coqueiro..... 49

Picnostroma, picnidíoforos, conídios; ascomas, ascos, paráfises, ascósporos germinados e ascósporos não germinados.

Figura 8. *Camarotella acrocomiae* de coqueiro50

A. Estromas periteciais na face abaxial do folíolo

B. Detalhe da superfície dos estromas

C. Himênio mucoso

Figura 9. *Camarotella acrocomiae* de coqueiro.....51

A-D. Ascos, paráfises e ascósporos

Figura 10. *Camarotella acrocomiae*..... 51

A-B. Picnídios sub-cuticulares

Figura 11.1 *Camarotella* cf. *acrocomiae* sobre *Attalea funifera*.....52

A. Exsicata nº39573

B. Estromas periteciais

C. Estromas picnidiais

D. Ascósporos.

Figura 11.2 *Camarotella* cf. *torrendiella* sobre *Attalea funifera*.....52

E. Exsicata nº37581

F. Estromas periteciais

G. Estromas picnidiais

H-I. Ascósporos.

Figura 12. *Camarotella* cf. *acrocomiae* sobre *Attalea geraensis*.....53

A. O hospedeiro no seu habitat natural

B. Estromas periteciais na face adaxial do folíolo

C. Detalhe da superfície do estroma

- D. Corte longitudinal de peritécio mostrando as perifises no ostíolo
- E. Ascósporos

Figura 13. *Camarotella* cf. *torrendiella* sobre *Bactris ferruginea*..... 54

- A. O hospedeiro no seu habitat natural
- B. estromas negros dispostos no sentido das nervuras
- C. Estromas periteciais
- D. Himênio mucoso
- E. Estromas picnidiais
- F. Picnidióforos e conídios
- G-H. Ascos e paráfises
- I-J. Ascósporos com e sem bainha mucosa

Figura 14. *Camarotella* cf. *torrendiella* sobre *Bactris pickelli*..... 55

- A. Exsicata nº90204
- B. Estromas ascíferos
- C. Estromas picnidiais
- D-G. Ascos, paráfises e ascósporos

Figura 15. *Camarotella torrendiella* sobre *Bactris* sp.....56

- A. O hospedeiro no seu habitat natural
- B-C. Estromas ascíferos
- D-E. Ascos, paráfises e ascósporos

Figura 16. *Camarotella torrendiella* sobre *Syagrus botryophora*..... 56

- A. O hospedeiro no seu habitat natural
- B-D. Exsicatas nº63571,13275,14773
- E-F. Estromas ascíferos
- G. Ascos, paráfises e ascósporos
- H. Ascósporo gutulado

Figura 17. *Camarotella* cf. *torrendiella* sobre *Syagrus microphylla*.....57

- A-B. Exsicatas nº79839, 30714

- C. Estroma ascífero
- D. Estroma picnidial
- E. Ascósporos
- F. Ascósporo com bainha mucosa

Figura 18. *Camarotella* cf. *Torrendiella* sobre *Syagrus petraea*.....57

- A. Exsicata nº56234
- B. Estromas picnidiais
- C. Picnidióforos
- D. Conídios

Figura 19. *Camarotella dianesii* Vitória & Bezerra spec. nov. sobre *Syagrus schizophylla*.....58

- A. Exsicata nº38317
- B. Estroma ascífero
- C. Estromas picnidiais
- D-E. Ascos
- F. Ascósporo
- G. Ascósporo com bainha mucosa
- H. Picnidióforos

Figura 20. *Camarotella* cf. *torrendiella* sobre *Syagrus vagans*.....59

- A. Exsicata nº14439
- B. Estroma peritecial
- C. Estromas picnidiais
- D. Ascósporos

Figura 21. *Camarotella* cf. *torrendiella* sobre *Syagrus werdermannii*.....59

- A. Exsicata nº55194
- B. Estroma peritecial
- C. Asco e paráfise
- D. Ascósporos

Figura 22. Germinação dos ascósporos60

Figura 23. Modo de infecção de *C. torrendiella* em folíolos de coqueiro.....61

A. Penetração de hifas através dos estômatos

B. Superfície do folíolo mostrando os pontos de infecção

C. Formação de hifas e primórdios estromáticos

Figura 24. NESTED-PCR modificado.....62

A. Isolados das espécies de *Camarotella* amplificados por NESTED PCR, utilizando primers ITS5/ITS4: Canaleta 1, ladder DNA 100 pb (Invitrogen-ladder); Canaleta 2, *C. torrendiella* de *Syagrus botryophora*; Canaleta 3, *C. torrendiella* de *Bactris* sp.; Canaletas 4-5, *C. torrendiella* de coqueiro; Canaleta 6, *C. acrocomiae* de coqueiro; Canaleta 7, *C. cf. torrendiella* de *Bactris ferruginea*; Canaleta 8, reação controle. Resolução foi em gel de agarose a 1,5% e o DNA visualizado com brometo de etídio.

B. Isolados das espécies de *Camarotella* amplificados por NESTED PCR, utilizando primers NS1/NS2 (Canaletas 2-4) e NS3/NS4 (Canaletas 5-7). Canaleta 1, ladder DNA 100 pb (Invitrogen-ladder); Canaleta 2, *C. torrendiella* de coqueiro; Canaleta 3, *C. acrocomiae* de coqueiro; Canaleta 4, reação controle; Canaleta 5, *C. torrendiella* de coqueiro; canaleta 6, *C. acrocomiae* de coqueiro; Canaleta 7, reação controle. Resolução foi em gel de agarose a 1,5% e o DNA visualizado com brometo de etídio.

Figura 25. Mini-prep. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e fotografado sob luz UV.....63

1. *Camarotella torrendiella* de coqueiro, 2. *C. acrocomiae* de coqueiro

INTRODUÇÃO

A cultura de coqueiro (*Cocos nucifera* L.) não é mais uma exclusividade da região nordeste e da área litorânea do Brasil, pois, seu cultivo está em expansão, tornando essa espécie comum a todo território nacional, menos nas regiões mais frias. A ocorrência de problemas fitossanitários como as doenças, diminuem a produtividade e a qualidade do produto (Moreira et al., 2001; Moreira et al., 2000; Warwick et al., 1997).

O coqueiro é susceptível ao ataque dos fitopatógenos *Bipolaris incurvata* Dreschs (mancha-foliar), *Phytophthora* sp. (Butler) (podridão-do-olho), *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. (queda-dos-frutos), *Botryosphaeria cocogena* Subileau (queima-das-folhas), *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb) Baujard (anel-vermelho), *Phytomonas* sp. (murcha-de-phytomonas), *Phyllachora torrendiella* (Batista) Subileau (lixa-pequena), *Sphaerodothis acrocomiae* (Montagne) von Arx & Muller (lixa-grande), entre outros (Warwick, 2001).

A intensidade das doenças é variável, dependendo, principalmente, do estresse climático e dos tratos culturais. O fungo *C. acrocomiae* (Mont.) Hyde & Cannon causa lesões foliares e a morte prematura das folhas inferiores, deixando os cachos mais velhos sem sustentação e prejudicando o amadurecimento normal dos frutos.

As lixas pequena e grande limitam a produtividade da cultura do coco, estando disseminadas em todos os coqueirais brasileiros, reduzindo em até

50% a área foliar do coqueiro, embora não sejam letais para o hospedeiro como acontece com a murcha-de-phytonomas e o anel vermelho.

O controle químico da lixa-pequena não apresenta viabilidade econômica (Oliveira et al., 1984; Ram, 1990). Dentre os fungicidas testados, os produtos à base de difeconazole e de ciproconazole reduzem em 63% e 70% o número de estromas em ensaios experimentais, respectivamente (Warwick, 2001). Fungos hiperparasitas são isolados de estromas parasitados, entre eles: *Septofusidium elegantulum* (Pidopl.) W. Gams, *Acremonium alternatum* Link, *A. strictum* W. Gams, *Dicyma pulvinata* (Berk. & M.A. Curtis) Arx, *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries, *C. spongiosum* Berk. & M.A. Curtis, *Penicillium* sp., *Curvularia* sp. e *Pestalotia* sp., dos quais os três primeiros são citados na literatura como agentes de controle biológico da lixa (Renard, 1988; Sudo et al., 1988; Warwick & Leal, 1994).

As espécies do gênero *Camarotella*, agentes causais das lixas não incidem apenas sobre coqueiro, pois palmeiras nativas tais como: *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. (macaúba), *Allagoptera brevicalyx* Moraes (caxandó), *Acrocomia* sp., *Astrocaryum* sp., *Attalea funifera* Mart. ex Spreng. (piaçava), *Attalea geraensis* Barb. Rodr. (indaiá-do-cerrado), *Bactris ferruginea* Burret (mané véio), *Butia capitata* (Mart.) Becc. (guariroba-do-campo), *Butia yatay* (Mart.) Becc. (yataí), *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. (licuri) e *Syagrus microphylla* Barb. Rodr. (coco-de-quaresma), também são suscetíveis a espécies desse gênero (Von Arx & Muller, 1954; Hennings, 1900; Bezerra, 1991; Hyde & Cannon, 1999; Warwick, 2000). Todavia, haviam controvérsias quanto às lixas grande e pequena serem causadas pela mesma espécie de *Camarotella*.

Do ponto de vista fitopatológico é importante conhecer a etiologia de uma doença para estudos epidemiológicos e de controle, a fim de minimizar os danos causados ao hospedeiro.

Os objetivos deste trabalho são esclarecer a controvérsia sobre os agentes das lixas do coqueiro, caracterizar morfológica e molecularmente as

espécies de *Camarotella* que causam as lixas grande e pequena e identificar a gama de hospedeiros alternativos, definindo a etiologia e biologia das doenças e a classificação taxionômica dos seus agentes.

REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O patógeno: de 1856 aos dias atuais

Um fungo associado com sintoma de lixa em *Acrocomiae sclerocarpa* foi descrito por Montagne (1856) sob o nome de *Dothidea acrocomiae* Mont. Posteriormente Saccardo (1883), Spegazzini (1885), Rehm (1897), Hennings (1904), Shear (1909), Theissen & Sydow (1915), Stevens (1923), Plunkett (1923), Petrak (1928), Batista (1946, 1948), Arx & Müller (1954), Bezerra (1991), Subileau et al. (1994) e Hyde & Cannon (1999) trataram da mesma espécie ou espécies afins sob 22 diferentes binômios: *Auerswaldia felipponeana* Sacc., *A. palmicola* Speg., *A. rimosa* Speg., *Bagnisiopsis astrocaryae* Petr., *B. astrocaryi* Theiss. & Syd., *B. diplothemii* Theiss. & Syd., *B. palmicola* Petr., *B. stevensii* Petr., *Camarotella acrocomiae* (Mont.) K.D. Hyde & P.F. Cannon, *C. astrocaryae* Theiss. & Syd., *Coccostromopsis palmigena* Plunkell, *Dothidina palmicola* Theiss. & Syd., *Hypoxylon desmonei* Rehm, *Leveillinopsis palmicola* Stev., *Montagnella astrocaryae* Rehm, *Phyllachora acrocomiae* (Mont.) Sacc., *Phaeochora acrocomiae* (Mont.) Theiss. & Syd., *Phyllachora astrocaryi* P. Henn., *Plowrightia diplothemii* Rehm, *Sphaerodothis acrocomiae* (Mont.) Arx & E. Müll., *S. rimosa* (Speg.) Shear., *S. palmicola* Shear. A pouca comunicação entre os micologistas da época, assim como a falta de percepção das semelhanças e diferenças entre os materiais estudados, o acesso deficiente às mútuas publicações, a ênfase dada aos novos hospedeiros estudados levaram muitos autores a criar táxons desnecessários ou a fazerem recombinações injustificáveis.

O gênero *Camarotella* foi descrito por Theissen & Sydow (1915) como possuindo ascos de parede espessa e ascósporos hialinos com quatro células. Posteriormente Petrak (1940) reestudando esse gênero corrigiu a descrição de Theissen & Sydow (1915), constatando que os ascos eram unitunicados e os ascósporos unicelulares. Este trabalho de Petrak infelizmente passou despercebido por micologistas que posteriormente estudaram fungos Phyllachorales em palmeiras e que, por conseguinte deixaram de utilizar o gênero *Camarotella* na concepção de Petrak. Desde 1999, o gênero *Camarotella* passou a ser usado para classificar as espécies parasitas de palmeiras com estromas irrompentes, sub ou itraepidérmicos, peritécios escuros, carbonáceos, imersos no estroma, ostiolados, ascos unitunicados, clavados, octospóricos e ascósporos hialinos a escuros, unicelulares, lisos, com bainha mucosa. Atualmente a espécie *C. acrocomiae* é o binômio designado para o agente das lixas grande e pequena do coqueiro (Hyde & Cannon, 1999).

2.2 O gênero *Camarotella*

O gênero *Camarotella* Theiss. & Syd. (Theissen & Sydow, 1915) foi redescrito por Hyde & Cannon (1999) como possuindo estromas negros, pulvinados, fortemente irrompentes, formados em filas lineares. O seu anamorfo é desenvolvido em lóculos estromáticos, de paredes finas com células conidiógenas acuminadas, de proliferação percorrente e conídios filiformes, acuminados, muitas vezes encurvados de forma helicoidal ou sigmóide. Os ascomas em número de um a vários dentro do estroma são alongados na direção das nervuras foliares. Os ascos são cilíndricos ou cilindro-clavados, com ou sem um anel apical, octospóricos. Os ascósporos são curto-fusiformes, hialinos a marrom-pálidos, envolvidos numa bainha mucosa. Holótipo: *Montagnella astrocaryi* Rehm (= *C. acrocomiae* (Mont.) K.D. Hyde & P. Cannon).

O gênero *Coccodiella* difere de *Camarotella* por possuir estromas um tanto gelatinosos com bases constrictas. Este gênero não possui anamorfo e os seus ascósporos não têm bainha mucosa como aquelas de *Camarotella*. A

espécie tipo, provavelmente a única do gênero *Coccodiella*, ocorre em bambus no extremo Oriente.

Camarotella difere de *Sphaerodothis* porque neste gênero os ascomas são imersos na folha e nunca irrompentos, os ascósporos são marrons, esféricos e os ascos são curto-cilíndricos na espécie tipo.

Além destes, os seguintes gêneros foram utilizados por diversos micologistas para designar os agentes de lixas do coqueiro: *Phyllachora* (possui estroma em forma de clípeo); *Catacauma* (sinônimo de *Phyllachora*); *Dothidea* (possui ascos bitunicados); *Dothidina* (sinônimo de *Camarotella*); *Phaeochora* (possui estromas subcuticulares, nunca irrompentos, ascos saculiformes ou fusiformes, evanescentes); *Auerswaldia* (possui ascos bitunicados); *Hysterodothis* v. Höhn (sinônimo de *Sphaerodothis*); *Montagnella* (possui ascos bitunicados); *Coccostroma* (sinônimo de *Coccodiella*); *Bagnisiopsis* (restrito a espécies sulamericanas parasitas de *Melastomataceae*); *Coccostromopsis* (estroma gelatinoso, castanho-amarelado).

2.3 O hospedeiro e a doença

A espécie *C. nucifera*, cuja região de origem mais aceita é o sudeste asiático, pode ser encontrada na região litorânea e no interior de quase todos os países tropicais. Sua ampla distribuição tem sido favorecida pelas inúmeras possibilidades de uso da planta, bem como por sua adaptabilidade a diferentes condições ecológicas (Ohler, 1999). No Brasil, o coqueiro foi introduzido por volta de 1553 (Nucé de Lamothe, 1983).

A palmeira *C. nucifera*, assim como outras, é hospedeira de uma grande variedade de fungos e sujeita a doenças de importância variável. Aguiar et al. (1998) listaram vários fungos encontrados no hospedeiro *C. nucifera*, abrangendo uma espécie de Oomycota, cinco de Myxomycota, 12 de Ascomycota e 31 de fungos anamórficos. Os binômios *Catacauma mucosum* (Speg.) Theiss. & Syd., *Phyllachora mucosa* Speg., *Phyllachora* spp., *P. torrendiella*, *S. acrocomie* e *Sphaerodothis* sp. são citados na literatura como agentes de lixas do coqueiro.

Das muitas enfermidades que afetam a cultura do coqueiro, tais como: queima-das-folhas, anel-vermelho, murcha-de-phytomonas, queda-dos-frutos e queda-das-folhas, entre outras, as lixas grande e pequena se destacam pela grande incidência e regularidade com que ocorrem em plantações desta palmeira, ocasionando lesões foliares necróticas que se expandem chegando a queimar grande parte das folhas.

A lixa-pequena do coqueiro ocorre no Brasil, Chile (Hennings, 1900), Cuba, Guiana Francesa e Paraguai (Hyde & Cannom, 1999). No Brasil, esta doença é considerada a mais importante da cultura nos estados de Pernambuco, Pará, Alagoas, Ceará, Rio Grande do Norte, Sergipe e Bahia. Em condições de alta umidade, onde a incidência é bastante elevada, pode causar perdas significativas na produtividade (Vale, 1997). Embora não tenha sido conduzida uma avaliação sistemática da magnitude dos danos causados, em muitos casos, a grande extensão da área necrosada deve se refletir na intensidade do mecanismo fotossintético da planta acarretando uma diminuição da produção. Batista (1948) afirma que a doença quando ocorre com muita intensidade pode comprometer toda a planta e ocasionar a queda dos cocos.

A lixa-grande é menos prejudicial ao coqueiro do que a lixa-pequena e encontra-se distribuída desde o Estado do Rio de Janeiro até o litoral norte do Rio Grande do Norte. A sua importância maior está relacionada às lesões que servem de porta de entrada para o fungo *Botryosphaeria cocogena* Subileau, causador da queima-das-folhas (Warwick, 2001).

As lixas também ocorrem em outras espécies de palmeiras além do coqueiro. A lixa-grande já foi registrada em *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. (macaúba), *Attalea funifera* Mart. ex Spreng. (piaçava) e *A. geraensis* Barb. Rodr. (indaiá-do-cerrado) (Bezerra, 1991; Warwick, 2000), sendo encontrada com frequência parasitando a palmeira *A. geraensis* no cerrado brasileiro. Este fungo ocorre no Brasil, Paraguai e Suriname (Theissen & Sydow, 1914). A lixa-pequena foi encontrada nos hospedeiros *Allagoptera brevicalyx* Moraes (caxandó), *Acrocomia* sp., *Astrocaryum* sp., *Bactris ferruginea* Burret (mané véio), *Butia capitata* (Mart.) Becc. (guariroba-do-campo), *B. yatay* (Mart.) Becc. (yataí), *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. (licuri)

e *S. picrophylla* Barb. Rodr. (coco-de-quaresma) (von Arx & Muller, 1954; Hennings, 1900; Hyde & Cannon, 1999). Essas palmeiras possuem diversas utilidades, apresentando bom potencial paisagístico e ornamental, além de serem empregadas na construção rural, confecção de fios de pesca, produção de fibra, fonte de alimento para fauna de pequeno porte, entre outras.

2.4 Estudos moleculares e patológicos

Pouco se conhece sobre a variabilidade genética das espécies de *Camarotella* que causam as lixas no coqueiro e em outras palmeiras. Análises genéticas modernas foram pouco realizadas, pois o patógeno, sendo um parasita obrigatório, não cultivável em meio artificial, dificulta as pesquisas nestas áreas.

A produção de micélio sem contaminantes é de grande importância para obtenção de DNA de boa qualidade, além de ser fundamental para as análises moleculares, constituindo-se uma etapa básica. Contudo, é possível analisar molecularmente um microorganismo sem que o mesmo seja cultivado. Silva et al. (2003) relatam a extração de DNA de *Sphaerodothis* a partir de himênios removidos de vários estromas periteciais do fungo. Saenz & Taylor (1999) reportam a extração de DNA de fungos a partir de cleistotécios de *Erysiphales* e Glenn et al. (1998) registram também a extração de DNA a partir da maceração de vários estromas. Esses autores realizaram os estudos moleculares baseados nas seqüências 18S, regiões ITS1, ITS2 (*Internal Transcribed Spacers*) e 5,8S do rDNA utilizando os primers NS1, NS2, NS3, NS4, NS6, ITS1, ITS2, ITS3, ITS4, ITS5 (Figura 1). Métodos baseados em PCR permitem explorar diferenças genéticas independente da presença de estruturas reprodutivas. Análises filogenéticas baseadas em múltiplos genes da região genômica têm sido utilizadas na diferenciação entre espécies.

O DNA que codifica para RNA ribossômico apresenta-se como um cluster gênico, contendo genes 18S, 5,8S e 28S (Bruns et al., 1992). Estes genes são

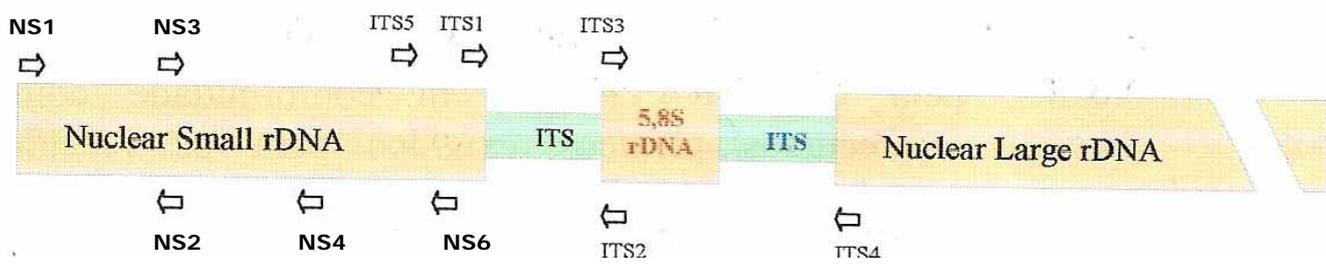
separados por regiões denominadas ITS1 e ITS2, as quais são transcritas e processadas para dar origem ao RNA ribossômico. O cluster gênico que codifica para o RNAr aparece repetido centenas de vezes no genoma fúngico. O fato desse cluster gênico apresentar algumas regiões altamente conservadas e outras variáveis, tem permitido a análise da variação de diferentes níveis taxonômicos. A região 18S, por exemplo, é mais conservada e por isso é utilizada apenas para comparação de táxons distantemente relacionados. A porção 28S é mais variável e, portanto, é apropriada para comparação de diferentes gêneros ou, em alguns casos, de diferentes espécies. As regiões ITS evoluem rapidamente e, então, são apropriadas para discriminar espécies afins ou até mesmo variedades de uma mesma espécie (Harney et al. 1997).

Recentemente, Oliveira et al. (2004) descreveram o cultivo *in vitro* dos fungos *P. torrendiella* e *S. acrocomiae* em meio líquido completo, contendo elementos essenciais. A obtenção de micélio puro desses organismos cria oportunidade para realização de sua caracterização molecular.

Os primeiros estudos patológicos na ordem *Phyllachorales*, foram conduzidos com o gênero *Phyllachora* na década de sessenta e caracteres desconhecidos (para época) foram estudados, incluindo a morfologia dos conídios (espermácios) e conidióforos, e diferenças no desenvolvimento e forma do apressório (Cannon, 1991). Inoculações cruzadas foram realizadas visando determinar a especificidade de *Phyllachora* spp. a seus hospedeiros e à influência destes sobre a morfologia do fungo (Cannon, 1991).

Segundo Rezende & Moura (1995), em experimentos realizados para verificar a infecção do fungo *P. torrendiella*, o período de incubação do patógeno é de aproximadamente 100 dias, sendo os ascósporos as unidades infectivas, contudo, o modo de infecção não foi descrito.

Figura 1. Mapa da organização dos genes ribossomais e localização dos primers no rDNA. A ponta da flecha representa a extremidade 3' de cada primer



3. CAPÍTULO 1

Espécies de *Camarotella* que causam doença foliar no coqueiro e em outras palmeiras

NADJA S. VITÓRIA¹, JOSÉ L. BEZERRA², KARINA P. GRAMACHO²

¹Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Ilhéus-Itabuna, Km 16, 45650-000, BA

E-mail: nadjasv@hotmail.com

²CEPLAC/CEPEC/SEFIT, Cx. Postal 07, 45600-000, Itabuna-BA

E-mail: jlbezerra@hotmail.com

RESUMO

As lixas grande e pequena do coqueiro já foram descritas por 15 autores sob 24 binômios e 13 gêneros diferentes. A princípio foi caracterizada como sendo causada por agentes distintos e atualmente por um único patógeno, embora haja controvérsia no que diz respeito a essa hipótese. Apesar das lixas ocasionarem lesões necróticas semelhantes que se expandem chegando a queimar grandes extensões dos folíolos e apresentarem sinais correspondentes a estromas picnidiais e periteciais, a caracterização morfológica das estruturas mostrou algumas diferenças entre os patógenos causadores de lixa-grande e lixa-pequena. A lixa-pequena apresenta ascomas com ostíolo radialmente estriado e ascósporos geralmente hialinos, subfusóides a elipsóides, 23,16 X 8,54 µm em média, enquanto a lixa-grande tem estroma peritecial com ostíolo rugoso e geralmente ascósporos marrons, ovóides a elípticos, 21,52 X 9,40 µm em média. Das inoculações realizadas

com ascósporos e picnidíósporos de lixa-pequena, apenas os ascósporos infectaram os folíolos, apresentando um crescimento micelial escuro e apressórios ligados aos estômatos. Outras palmeiras foram encontradas como novos hospedeiros de lixas. Morfologicamente algumas lixas nesses hospedeiros foram semelhantes às lixas pequena ou grande do coqueiro quanto aos sinais, sintomas e morfologia do patógeno. A morfologia dos agentes causadores de lixa nas palmeiras nativas sugere a existência de duas ou mais espécies do gênero *Camarotella*, nestes hospedeiros. Este estudo descreve também o desenvolvimento de um método para extração de DNA, e a incorporação em reação de polimerase em cadeia (PCR), NESTED-PCR para amplificação de DNA genômico das espécies *Camarotella torrendiella* (Batista) Bezerra & Vitória comb. nov (lixa-pequena) e *C. acrocomiae* (Mont.) K. D. Hyde & P. F. Cannon (lixa-grande), importante para o estudo da família *Phyllachoraceae*, além de possibilitar a análise molecular que, nessa família, é limitada pela dificuldade de obtenção do DNA.

Palavras-chave: *Camarotella acrocomiae*, *C. torrendiella*, lixas-do-coqueiro, *Cocos nucifera*, taxionomia, patogenicidade, extração de DNA, NESTED-PCR.

ABSTRACT

The small and large verrucosis of coconut have been described by 15 authors under 24 different binomials and 13 genera. At first they were thought to be caused by different fungi and recently by just one pathogen but this question is far from being resolved. Although, both types of verrucosis cause similar necrotic symptoms that evolve to cause blight of the leaflets and form similar types of signals such as stromata, ascomata and conidiomata the morphological characterization of the structures showed some differences between the fungal agents of both verrucosis. The small verrucosis presents ascomata with radiately ridged ostioles and generally hialine, sub-fusoidal elipsoidal, 23,16 X 8,54 µm in average ascospores, while the large verrucosis has larger ascomata with rugose ostioles and brown, ovóides elliptical, 21,52 X 9,40 µm in average ascospores. Of the inoculation trials only the ascospores from small verrucosis pathogen infected the abaxial surface of the leaflets

forming a dark mycelial growth and appressoria attached to the stromata. New palm hosts were discovered presenting verrucosis. The morphology of the pathogens on these new hosts was similar to those on coconut. The morphology of the causal agents of verrucosis on those nature palms suggests the occurrence of two or more *Camarotella* species on these hosts. This study also describes a new method for DNA extraction for incorporation in PCR reactions, NESTED-PCR for genomic DNA amplification of the species *Camarotella torrendiella* (Batista) Bezerra & Vitória comb. nov (small verrucosis) e *C. acrocomiae* (Mont.) K. D. Hyde & P. F. Cannon (large verrucosis). This method is important for studying the Phyllachoraceae and enables the molecular analysis which limited in this family due to the difficulty of DNA obtention.

Keywords: *Camarotella acrocomiae*, *C. torrendiella*, verrucosis, *Cocos nucifera*, taxonomy, pathogenicity, DNA extractin, NESTED-PCR.

3.1 INTRODUÇÃO

O coqueiro é uma das mais úteis dentre as plantas tropicais. Oferece uma ampla gama de produtos para utilização na alimentação humana, na indústria, na construção rural e em artesanatos sendo adaptado aos solos arenosos de baixa fertilidade natural, podendo contribuir para uma agricultura sustentável nas pequenas propriedades da região Nordeste.

A cultura de *C. nucifera* nas condições brasileiras, é sujeita à diversas doenças, havendo, inclusive, algumas pouco estudadas e até de etiologia desconhecida. As pesquisas na área de fitopatologia muitas vezes são dificultadas pelas peculiaridades dos agentes etiológicos. A ocorrência das lixas grande e pequena é responsável pela redução de até 50% da produção de coco no Brasil. Os danos severos causados por estes patógenos justificam a realização deste trabalho.

Atualmente, a lixa-pequena é encontrada em quase todas as regiões do Brasil onde se cultiva o coqueiro, podendo passar despercebida sem causar danos durante anos, ou acarretar acentuada perda na produção (Subileau et

al., 1993). A lixa-grande é uma doença de distribuição semelhante à da lixa-pequena e a sua diferenciação pode ser feita macroscopicamente com base na sintomatologia.

São consideradas suscetíveis a lixas, as seguintes palmeiras: *A. aculeata*, *A. brevicalyx*, *Acrocomia* sp. , *Astrocaryum* sp., *A. funifera*, *A. geraensis*, *B. ferruginea*, *B. capitata*, *B. yatay*, *C. nucifera*, *Cocos* sp., *Jubaea chilensis* (Molina) Baill., *J. spectabilis* HBK, *Roystonea regia* O.F. Cook, *S. coronata* e *S. picrophylla* (Von Arx & Muller, 1954; Hennings, 1900; Bezerra, 1991; Warwick, 2000; Hyde & Cannon, 1999).

Os fungos causadores de lixas não ocorrem no coqueiro em seu centro de origem nem em outras regiões da Ásia, África e Oceania, o que indica que os hospedeiros naturais estão entre as palmeiras nativas das Américas. O fungo *Cocoicola fusispora* (C. Booth & D. E. Shaw) K. D. Hyde ocorre em pecíolos vivos de coqueiro na Malásia e na Nova Caledônia, mas, trata-se de uma espécie não relacionada taxionomicamente com os agentes de lixa que ocorrem no continente americano. Este trabalho se propõe a caracterizar morfológica e molecularmente espécies de *Camatotella* em coqueiro e outras palmeiras nativas.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Coleta de material e análise de exsiccatas

Foram feitas 21 coletas de folhas com sintomas de lixa em nove áreas de ocorrência do hospedeiro *C. nucifera*, compreendendo os seguintes municípios: Buerarema, Ilhéus, Itabuna, Jussari, Maracás, Rio de Contas, Una (Bahia), Linhares (Espírito Santo) e Manaus (Amazonas) no período de Julho de 2005 a setembro de 2006 (Tabela 1). Exsiccatas de Areaceae depositadas no herbário do CEPEC foram examinadas quanto à presença de estromas de lixa (Tabela 2).

Tabela 1. Data, local e hospedeiros com sintomas de lixa obtidos de palmeiras de diferentes municípios dos estados da Bahia, Espírito Santo e Amazonas

Ano	Mês	Procedência	Hospedeiros	Nome popular
2005	JUL	Ilhéus – Campus do CEPEC	<i>Cocos nucifera</i>	Coqueiro
2005	AGO	Ilhéus – Campus do CEPEC	<i>Cocos nucifera</i>	Coqueiro
2005	SET	Ilhéus – Campus do CEPEC	<i>Cocos nucifera</i>	Coqueiro
2005	DEZ	Ilhéus – Campus do CEPEC	<i>Cocos nucifera</i>	Coqueiro
2005	DEZ	Ilhéus – Praias de São Domingos, Jóia do Atlântico e Ponta do Ramo	<i>Cocos nucifera</i>	Coqueiro
2006	JAN	Ilhéus – Sítio Tropical	<i>Cocos nucifera</i>	Coqueiro
2006	JAN	Una – ESMAI	<i>Cocos nucifera</i>	Coqueiro
2006	JAN	Una – Fazenda Vasco da Gama	<i>Cocos nucifera</i>	Coqueiro
2006	JAN	Una – Fazenda de José Luiz Pires	<i>Cocos nucifera</i>	Coqueiro
2006	JAN	Una – Fazenda de José Luiz Pires	<i>Cocos nucifera</i>	Coqueiro
2006	FEV	Rio de Contas –	<i>Bactris sp</i>	Coquinho
2006	MAR	Buerarema – Distrito Rio de Cipó	<i>Bactris ferruginea</i>	Mane véio
2006	ABR	Ilhéus – Praias de São Domingos, Jóia do Atlântico e Ponta do Ramo	<i>Cocos nucifera</i>	Coqueiro
2006	ABR	Maracás	<i>Cocos nucifera</i>	Coqueiro
2006	ABR	Itabuna – Jardim Primavera	<i>Cocos nucifera</i>	Coqueiro
2006	MAI	Jussari – Serra do Teimoso	<i>Syagrus botryophora</i>	Patioba
2006	MAI	Buerarema – Distrito Rio de Cipó	<i>Bactris ferruginea</i>	Mane véio
2006	MAI	Una – ESMAI	<i>Bactris ferruginea</i>	Mane véio
2006	JUN	Km 13, Rodovia Manaus-Balbina	<i>Cocos nucifera</i>	Coqueiro
2006	JUL	Ilhéus – Campus do CEPEC	<i>Cocos nucifera</i>	Coqueiro
2006	SET	Linhares – Espírito Santo	<i>Cocos nucifera</i>	Coqueiro

Tabela 2. Exsicatas de Arecaceae depositadas no herbário do CEPEC apresentando estromas de lixas.

Herbário / nº de acesso	Hospedeiro analisado	Nome popular
Herbário CEPEC/CEPLAC/BA-Brasil /nº39573	<i>Attalea funifera</i>	Piaçava
Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS)/BA-Brasil /nº37581	<i>Attalea funifera</i>	Piaçava
Herbário CEPEC/CEPLAC/BA-Brasil /nº90204	<i>Bactris pickelli</i>	Tucum-mirim
Herbário CEPEC/CEPLAC/BA-Brasil /nº63571, 13275, 14773	<i>Syagrus botryophora</i>	Patioba
Herbário CEPEC/CEPLAC/BA-Brasil /nº79839, 30714	<i>Syagrus microphylla</i>	Coquinho
Prefeitura Municipal de Curitiba/Brasil.Museu Botânico Municipal / nº56234	<i>Syagrus petrae</i>	Tucum-de-índio
Herbário CEPEC/CEPLAC/BA-Brasil /nº38317	<i>Syagrus schizophylla</i>	Coco-babão
Herbário CEPEC/CEPLAC/BA-Brasil /nº14439	<i>Syagrus vagans</i>	Pindoba
Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS)/BA-Brasil /nº55194	<i>Syagrus werdermannii</i>	Coco-de-raposa

3.2.2 Caracterização morfológica

Os sintomas e sinais presentes no hospedeiro foram examinados ao microscópio estereoscópico (Carl Zeiss) e fragmentos das estruturas fúngicas foram montadas entre lâmina e lamínula utilizando-se o lactofenol como meio de montagem com ou sem a adição de azul-de-algodão (lactofenol de Amann). Cortes histológicos manuais também foram efetuados para observação da situação dos estromas nos tecidos do hospedeiro e da anatomia interna dos ascomas.

As preparações foram observadas ao microscópio ótico (Carl Zeiss), em diversos aumentos para interpretação e caracterização morfológica das estruturas do fungo. As medidas das estruturas macroscópicas foram feitas com auxílio de uma lupa de medição (Holtermann modelo LH-20/10x) e as estruturas microscópicas com micrômetro ocular. As micrografias foram realizadas com uma câmara lúcida (Carl Zeiss) e as fotomicrografias com uma câmara digital Cyber-shot 4.1 Mega Pixels.

3.2.3 Testes de germinação, isolamento e cultivo

A germinação dos ascósporos foi observada colocando-se uma gota de uma suspensão aquosa de esporos sobre uma lamínula, invertendo-a sobre uma lâmina escavada a qual foi mantida em câmara úmida e examinada periodicamente ao microscópio. Para germinação testaram-se o caldo glicosado, soro fisiológico estéril, água Mili-Q autoclavada e água de torneira. Isolados de lixa-pequena e lixa-grande do coqueiro foram testados com todas as soluções.

Com auxílio de uma agulha histológica ascomas do fungo foram rompidos e porções de himênio de lixa-pequena e lixa-grande do coqueiro foram retiradas e espalhadas sobre a superfície do meio agar-água (AA) a 2% em placas-de-petri. Em seguida blocos de AA contendo ascósporos foram transferidos para Erlenmeyers de 250 ml com meio de cultura completo contendo os seguintes componentes: glucose (0,5%), tiamina (1,1 µg/ml), riboflavina (0,05 µg/ml), piridoxina (0,05 µg/ml), pantotenato de cálcio (0,2

$\mu\text{g/ml}$), inositol (0,4 $\mu\text{g/ml}$), ácido nicotínico (0,2 $\mu\text{g/ml}$), elementos essenciais (Ryan, 1943) e solução de sais (Holliday, 1974). Em metade do meio de cultura, o pH final foi ajustado para 3,0 e na outra metade para 7,0 (Oliveira et al., 2004). Os Erlenmeyers foram agitados por 15 dias a 135 rpm a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ a fim comprovar a possibilidade de cultivo em meio artificial.

Fragmentos do micélio desenvolvido no meio líquido foram transferidos para placas-de-petri contendo meio mínimo solidificado (glucose 10g, solução de sais 62,4 ml, água destilada e 2% agar) e também para placas-de-petri com meio batata–dextrose–agar (batata 300g, dextrose 15g, agar 15g e água destilada 1000 mL). As culturas foram incubadas a $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Após 15 dias, preparações das colônias desenvolvidas foram observadas ao microscópio.

O crescimento do micélio dos agentes causais das lixas do coqueiro também foi investigado nos meios V8-agar (suco V8 100 mL, CaCO_3 1,5g, agar 85g e água destilada 400 mL), extrato-de-levedura-agar (extrato de levedura 2g, extrato de malte 5g, dextrose 2g, agar 8,5g e água destilada 500 mL) e cafeína-agar (agar 30g, cafeína 10 mg e glicerol 20mL e completar com água destilada até o volume desejado).

3.2.4 Testes de inoculação

Folíolos jovens e sadios foram coletados. Himênios ascógenos e conidiógenos de lixa-pequena do coqueiro obtidos com o auxílio de uma agulha histológica foram depositados na superfície adaxial e abaxial de folíolos sem causar ferimentos, visando estudar o modo de infecção do fungo.

Foram inoculados com himênios ascógenos 20 folíolos na face adaxial e 20 na face abaxial, repetindo-se o mesmo para os himênios conidiógenos. Os folíolos foram colocados em placas de petri recobertas com papel toalha e umedecidas com água destilada. Em cada placa havia dois folíolos com cinco inoculações em cada folíolo. Após dez dias observou-se os resultados das inoculações.

3.2.5 Otimização da metodologia de extração e amplificação do DNA de espécies de *Camarotella*

3.2.5.1 Coleta e manutenção dos isolados (material fúngico)

O DNA genômico das espécies de *Camarotella* foi obtido a partir de himênios. O himênio foi exposto mediante corte da parte superior do peritécio e porções do mesmo foram colocados em tubos de PCR os quais qual foram armazenados a -80°C para uso posterior. O DNA foi obtido a partir de 13 isolados de lixa-grande e lixa-pequena, sendo dez em coqueiros e três em palmeiras nativas como *B. ferruginea*, *Bactris* sp. e *S. botryophora*, provenientes de coleta na região cacauera e no centro-oeste da Bahia (Tabela 3).

Tabela 3- Procedência e hospedeiros dos isolados das lixas grande e pequena utilizados para extração de DNA

Tipo de Lixa	Hospedeiro	Procedência/Data
Pequena	<i>Cocos nucifera</i>	Ilhéus/BA – Campus do CEPEC /2005
Pequena	<i>Cocos nucifera</i>	Ilhéus/BA – Praia Ponta do Ramo /2005
Grande	<i>Cocos nucifera</i>	Ilhéus/BA – Praia Jóia do Atlântico /2005
Grande	<i>Cocos nucifera</i>	Ilhéus/BA – Praia São Domingos /2005
Pequena	<i>Cocos nucifera</i>	Ilhéus/BA – Sítio Tropical /2006
Pequena	<i>Cocos nucifera</i>	Una/BA – ESMAl /2006
Pequena	<i>Cocos nucifera</i>	Itabuna/BA – Jardim Primavera /2006
Grande	<i>Cocos nucifera</i>	Una/BA – Fazenda José Luiz Pires /2006
Grande	<i>Cocos nucifera</i>	Una/BA – Fazenda José Luiz Pires /2006
Grande	<i>Cocos nucifera</i>	Una/BA – Fazenda Vasco da Gama /2006
Pequena	<i>Syagrus botryophora</i>	Jussari/BA – Serra do Teimoso /2006
Pequena	<i>Bactris ferruginea</i>	Buerarema/BA e Una/BA (ESMAI) /2006
Pequena	<i>Bactris</i> sp.	Rio de Contas/BA /2006

3.2.5.2 Extração de DNA

Quatro métodos de extração de DNA foram testados:

Método 1: Método CTAB – modificado (Graham et al., 1994)

Os himênios foram colocados em tubos Eppendorf de 2,0 ml, macerados em nitrogênio líquido com bastão de plástico, suspensos em 300 µl de tampão de extração [100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 2 %CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA] e posto em banho-maria (55°C) por 20 minutos. Em seguida o material foi centrifugado por cinco minutos a 14000 g e o sobrenadante transferido para novos tubos de 2,0 ml, adicionando-se igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1v/v). Após homogeneização com inversões suaves por dois minutos e centrifugação a 14000 g por 20 segundos, o sobrenadante de cada amostra foi transferido para tubos Eppendorf de 2,0 ml limpos e adicionados dois volumes de etanol absoluto gelado. Os tubos foram guardados no freezer -20 °C por 12 horas para precipitação do DNA e a seguir, centrifugados por 10 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com etanol 70 % gelado e seco a temperatura ambiente. Os ácidos nucleicos foram ressuspensos em 30 µl de água contendo RNase na concentração de 40µg/mL e colocados em banho-maria por 30 minutos a 37°C. Posteriormente colocou-se no concentrador por aproximadamente 30 minutos e para completa ressuspensão foram utilizados 15 µl de água MiliQ autoclavada.

Método 2: Método Walsh modificado (Walsh et al., 1991).

Os himênios foram macerados em tubos Eppendorf de 2,0 ml, contendo 500 µl da solução de Chelex 5% (Bio-Rad) e autoclavados por 20 minutos, uma modificação do protocolo de Walsh. Em seguida o material foi centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante diluído numa concentração de 1:5. Outras séries de diluições em água com concentrações de 1:10, 1:100 foram feitas (v:v).

Método 3: Método direto com choque térmico

Um único himênio foi transferido para um tubo de PCR com 5 µl de água MiliQ autoclavada. Em seguida, a suspensão foi incubada a 80°C durante cinco minutos e imediatamente resfriada no nitrogênio líquido por 10 segundos. Esse passo foi repetido por três vezes.

Método 4: Método direto com solução de lise celular

Um único himênio foi transferido para um tubo de PCR, contendo 3 µL de solução de lise celular (*Cell Lysis Buffer*) (0,05M NaOH, 0,25% SDS) em seguida a solução foi agitada em vortex durante 2 minutos na velocidade máxima e por fim incubada a 80 °C por 15 minutos.

Análise e quantificação do DNA total

As amostras de DNA extraído foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1,5 %, em tampão TAE (Tris-acetato 40mM; EDTA 10mM), e corados com brometo de etídio, com a finalidade de verificar a integridade e a qualidade da amostra.

A quantificação do DNA foi realizada espectrofotometricamente. O DNA foi estocado a -20 °C até sua utilização.

3.2.5.3 Amplificações

A reação de PCR foi inicialmente otimizada utilizando-se os primers ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White et al., 1990).

PCR 1 - Simples

As amplificações foram feitas em um volume final de 50 µl, contendo 100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 500 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 2,5 mM de cada dNTP, 0,4 µM de cada primer forward ITS4 e reverse ITS5, 0,5 U de Taq polymerase e

aproximadamente 30 ng de DNA. As reações com os primers NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3'), NS2 (5'-GGCTGCTGGCACCAGACTTGC-3'), NS3(5'-GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC-3') e NS4 (5'-CTTCCGTCAA TTCCTTTAA-3') (White et al., 1990) foram realizadas em um volume final de 50 µl, usando os mesmos componentes e concentrações.

O programa de amplificação das reações de polimerase em cadeia (PCR) consistiu de uma desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos. As reações foram finalizadas com uma extensão a 72°C por 10 minutos

PCR 2 - NESTED-PCR modificado

As primeiras PCRs com os primers ITS4F e ITS5R, como especificado acima, demonstrou a necessidade de repetir a primeira PCR com uma amostra mais concentrada. As reações foram feitas no volume final de 25 µl, utilizando as mesmas concentrações, componentes e programa de amplificação da primeira PCR simples. A modificação consistiu em utilizar como fonte de DNA 12,6 µl do produto amplificado da primeira PCR e 3,0 µl de água.

As amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,5% submergidos em tampão TBE 1X (Tris/Borato 90mM;EDTA 1mM). A eletroforese levou aproximadamente 40 minutos a 100 volts. Os géis foram corados com brometo de etídeo e fotografados em luz ultravioleta. Padrão de peso molecular de 100 pb (Invitrogen-ladder) foi usado para estimar o tamanho dos fragmentos.

3.2.5.3 Clonagem

Os produtos da reação de NESTED-PCR modificado foram clonados no plasmídeo PTZ57RT e depois purificados. A ligase foi preparada no volume final de 5,0 µl, adicionando-se 0,5 µl da enzima T4 na solução contendo 0,5 µl do vetor PTZ57RT e 1,5 µl da NESTED-PCR a 4°C overnight. O produto da ligação foi transformado em células competentes DH5-alpha. Posteriormente

foram utilizados 100 µl da bactéria transformada para serem plaqueados em meio LB, Amp e em seguida incubado a 37°C. Após o crescimento das colônias realizou-se a extração do plasmídeo.

3.2.5.4 Sequenciamento direto

Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 1,5% de baixo ponto de fusão (nuSieve), eluídos do gel, congelados a -80°C por 1 hora e centrifugados por 15 minutos a 14000 g. O sobrenadante foi usado como fonte de DNA diretamente para o sequenciamento. O sequenciamento foi feito com o BigDye Deoxy terminator sequencing Kit (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante, em um volume total de 5 µl, contendo 0,5 µl de BigDye, 1 µl de tampão de sequenciamento (5X), 2 pmol dos primers ITS4 e ITS5 e 30 ng de DNA. As reações de sequenciamento foram feitas em um termociclador PTC-100 e consistiram-se 40 ciclos de uma desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto, anelamento a 60 °C por 1 minuto e extensão a 60 °C por 4 minutos. Após a reação o DNA foi purificado com 20 µl de isopropanol 65%, a seguir permaneceu no escuro em temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente foi centrifugada por 40 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a placa invertida sobre papel toalha. Acrescentou-se 100 µl de etanol 60% e centrifugou-se à mesma velocidade por oito minutos. O etanol foi descartado e a placa foi centrifugada sobre o papel toalha a 700 rpm por 10 segundos para remover o excesso de etanol. Após secagem, a temperatura ambiente por 15 minutos, foi adicionado 10 µl de formamida a cada amostra e a placa encaminhada para o termociclador para desnaturação a 94 °C por três minutos. Após essa etapa, a placa foi encaminhada para o Seqüenciador Automático de DNA, modelo ABI PRISM 3100 Genetic Analyser.

3.3 RESULTADOS

Das nove áreas de coqueiro visitadas sete apresentaram plantas com sintomas de lixa-grande, enquanto a lixa-pequena apareceu em todas as áreas. A lixa-grande foi encontrada em maior proporção em coqueiros próximos ao litoral e nessas áreas foram observados, às vezes, estromas de lixas grande e pequena no mesmo folíolo (Figura 2A). Observou-se que a queima ocorre da extremidade para a base das folhas as quais se tornam senescentes prematuramente (Figura 2B).

Os folíolos com lixa-pequena coletados nos meses de novembro de 2005 e novembro de 2006 apresentavam predominância de lesões antigas e menor quantidade de ascomas férteis.

As seguintes palmeiras nativas *A. funifera*, *Bactris pickelli* Burret, *Bactris* sp., *Syagrus botryophora* (Mart.) Mart, *S. microphylla* Burret, *S. petraea* (Mart.) Becc, *S. schizophylla* (Mart.) Glessman, *S. vagans* (Bondar) A.D. Hawk e *S. werdermannii* Burret são registradas como novos hospedeiros para *C. torrendiella*. *Attalea funifera* e *A. geraensis* são novos hospedeiros de *C. acrocomiae*. *Camarotella torrendiella* está sendo registrada pela primeira vez em coqueiro no estado do Amazonas.

3.3.1 Sintomas, caracterização e classificação

1. *Cocos nucifera* – lixa-pequena

Sintomas

Os sintomas podem ser observados nos folíolos, ráquis, pedúnculos florais e frutos. Nas folhas, há inicialmente, a formação de lesões amareladas e posteriormente necróticas de forma elíptica a losangular as quais se expandem ao mesmo tempo em que se dá o aparecimento, a princípio, dos estromas picnidiais e, a seguir, dos estromas ascígeros do fungo. Nos folíolos, os estromas tomam à maturidade o aspecto de verrugas negras, opacas, irrompentes, hemisféricas, dispostas no sentido das nervuras, por vezes, também se desenvolvendo no sentido lateral, formando filas paralelas, livres

ou anastomosadas (Figura 3). No raque e pedúnculo floral o micélio do fungo aprofunda-se nos tecidos parasitados causando lesões alongadas, as quais, exsudam uma resina clara que logo se oxida em contato com o ar, ficando cor âmbar. Também sobre estas lesões aparecem posteriormente os estromas do fungo.

Descrição do patógeno

Os estromas ascígeros são de base aplanada, geralmente epífilos, ocasionalmente hipófilos, negros, carbonáceos, subglobosos, ásperos, a princípio isolados, posteriormente confluentes, formando linhas mais ou menos paralelas de verrugas, as quais medem 0,8-1,0 mm de diâmetro. Tecido estromático formado pela colonização das células da epiderme e da hipoderme, pseudoparenquimático, negro, 63-126 µm de espessura. Peritécios irrompentes, glabros, subglobosos a dimidiados, coriáceos, isolados ou confluentes, 450-1,000 µm de diâmetro e 315-705 µm de altura; ostíolo central, plano, circular, estriado, 37-45 µm de diâmetro revestido internamente de perífises; paredes periteciais, opacas, pseudoparenquimáticas, 90-150 µm de espessura, revestida internamente por várias camadas de células hialinas, 10-15 x 3-4,5 µm; células parietais externas poligonais, marron-negras, 3-10 µm de diâmetro. Himênio mucoso, de cor branca a cremosa e consistência elástica nas frutificações férteis. Ascos clavados, unitunicados, paralelos, octospóricos, pedicelados, 110-150 x 16-32 µm; paráfises filiformes, septadas, simples ou ramificadas 0,8-1,5 µm de diâmetro, um tanto evanescentes. Ascósporos hialinos, monósticos a dísticos, sub-fusóides a elipsóides, gutulados, de pólos sub-agudos, envoltos numa bainha mucosa, medindo 17,5-27,5 X 7,5-9 µm excluindo a camada mucosa e 26,5-29 x 15- 21,5 µm incluindo a camada mucosa; os ascósporos germinam através de um tubo germinativo geralmente sub-equatorial, ocasionalmente equatorial ou sub-apical, a princípio subgloboso a lobado, contínuo, e, posteriormente, subcilindráceo, flexuoso, septado perto da base, atenuado em direção à extremidade.

Estromas picnidiais irrompentes, pulvinados, às vezes um pouco alongados, carbonáceos, 0,2-0,4 mm de diâmetro, de textura e disposição

semelhantes aos estromas ascígeros. Picnídios formados lateralmente sobre os peritécios ou irrompendo a partir das células de epiderme e hipoderme, ficando em grande parte recobertos pela cutícula, de contorno sub-globoso a alongado, dimidiados, isolados ou confluentes, dispostos como os peritécios, negros, 160-380 μm de diâmetro e 150-284 μm de altura; ostíolo central ou excêntrico, plano 11-26 μm de diâmetro; paredes pseudoparenquimáticas, 15-40 μm de espessura, formadas de várias camadas de células poligonais, 5-7,5 μm de diâmetro. Picnidióforos revestindo todo o lóculo picnidial, dispostos em paliçada, hialinos, simples ou ramificados, 10-22,5 x 1,5-2 μm , ápices acuminados de proliferação percurrente. Picnidiósporos filiformes, hialinos, recurvos, sigmóides, acropleurógenos, não catenulados, 15-28 x 0,5-0,8 μm , contínuos.

Classificação do patógeno

Camarotella torrendiella (Batista) Bezerra & Vitória comb. nov.

Sinonímia:

Catacauma torrendiella Batista – *Boletim da Secretaria de Agricultura, Industria e Comercio do Estado de Pernambuco* 15: 130 (1948)

Phyllachora torrendiella (Batista) Subileau, Renard & Dennet., *Mycotaxon* 49: 180 (1993).

Sphaerodothis torrendiella (Batista) J.L. Bezerra, *Fitopatol. Brasil* 16 (2): xxxvi (1991).

Espécimes examinados

BRASIL: SERGIPE: Estância, sobre folíolos de coqueiro, junho de 1976, C. Robbs 01, Coleção Micológica – Herbário CEPEC 23.

BRASIL: BAHIA: Município de Ilhéus, praia Ponta do Ramo, sobre folíolos de coqueiro, 16/12/2005, JLB 461, Coleção Micológica – Herbário CEPEC 696.

BRASIL: BAHIA: Município de Ilhéus, praia Jóia do Atlântico, sobre folíolos de coqueiro, 16/12/2005, JLB 462, Coleção Micológica – Herbário CEPEC 697.

BRASIL: AMAZONAS: Balbina – Chácara Eurunupé, sobre folíolos de coqueiro, 10/06/2006, JLB 361, Coleção Micológica – Herbário CEPEC 487.

BRASIL: BAHIA: Município de Itabuna, Jardim Primavera, sobre folíolos de coqueiro, 18/04/2006, Nadja S. Vitória 04, Coleção Micológica – Herbário CEPEC 695.

BRASIL: BAHIA: Ilhéus – Campus do CEPEC/CEPLAC, sobre folíolos de coqueiro, 13/07/2006, Nadja S. Vitória 05, Coleção Micológica – Herbário CEPEC 699.

BRASIL: BAHIA: Ilhéus – Sítio Tropical, sobre folíolos de coqueiro, 03/01/2007, Nadja S. Vitória 06, Coleção Micológica – Herbário CEPEC 700.

Ilustrações: Figuras 4–7.

Habitat

Palmeira domesticada, só encontrada em cultivo. No Brasil, as maiores plantações estão ao longo da costa litorânea, do Rio de Janeiro ao Pará. Prefere solos arenosos ou bem drenados. Não se desenvolve bem em lugares encharcados.

Comentário

As descrições e ilustrações de Batista (1948) e Subileau et al. (1993) são bastante ilustrativas para esta espécie.

2. *Cocos nucifera* – lixa-grande

Sintomas

A doença manifesta-se sobre o limbo, na nervura dos folíolos e na ráquis foliar, como grossos estromas de coloração escura. Essas frutificações estão geralmente dispostas na borda dos folíolos, ao lado da nervura central ou sobre

ela. Os peritécios também aparecem na face inferior do limbo. A ráquis é igualmente parasitada pelo fungo. Os estromas produzidos pela lixa-grande são fracamente aderidos à superfície dos folíolos, podendo ser desalojados com facilidade.

Descrição do patógeno

Estromas ascígeros, anfígenos, negros, carbonáceos, subglobosos, de base aplanada, às vezes isolados, mas geralmente agrupados em linha sobre as nervuras, ostiolados, medindo de 0,9–1,5 mm, mas podendo atingir até 2,0 mm de diâmetro; ostíolo central, plano, não estriado, revestido internamente de perífises; paredes periteciais semelhantes às de *C. torrendiella*. Himênio mucoso de cor branca à cremosa, quase sempre aderidos à parede do peritécio, mas facilmente removível.

Ascos paralelos, parafisados, translúcidos, às vezes evanescentes, cilíndricos a clavados, octospóricos, unitunicados, pedicelados, medindo 124–180 x 28–34 µm. Ascósporos unicelulares de coloração hialina quando imaturos, mas geralmente escuros (castanhos), extremidades obtusas, dísticos, ovóides a elípticos com 17,5–25 x 7,5–12,5 µm.

Os picnídios irrompentes, pulvinados, globosos, mas às vezes um pouco alongados, 0,3–0,9 mm de diâmetro, escuros, isolados ou formando linhas mais ou menos paralelas. Alguns recobertos pela cutícula. Picnidióforos e picnídios semelhantes aos de *C. torrendiella*.

Classificação do patógeno

Camarotella acrocomiae (Mont.) K.D. Hyde & P.F. Cannon, Mycol. Pap. 175: 51 (1999).

Sinonímia:

Auerswaldia rimosa Speg., An. Soc. Cient. Argent. 26: 43 (1888).

Bagnisiopsis astrocaryae (Rehm) Petr., Annls mycol. 38(2/4): 245 (1940).

Bagnisiopsis roystoneae (J.R. Johnst. & Bruner) Cif., Quaderno Ist. Bot. Univ. Pavia 19: 214 (1961).

Camarotella astrocaryae (Rehm) Theiss. & Syd., Annls mycol. 13(3/4): 370 (1915).

Dothidea acrocomiae Mont., *Syll. Gen. Sp. Crypt.* (Paris): 223 (1856).
Hysterodothis rimosa (Speg.) Höhn., *Sber. Akad. Wiss. Wien, Math.-naturw. Kl.,*
Abt. 1 118: 1513 (1909).
Montagnella astrocaryae Rehm, *Hedwigia* 36: 379 (1897).
Phaeochora acrocomiae (Mont.) Theiss. & Syd., *Annls mycol.* 13(3/4): 402
(1915)
Phyllachora acrocomiae (Mont.) Sacc., *Syll. Fung.* (Abellini) 2: 606 (1883).
Phyllachora cocoicola Henn., *Hedwigia* 34: 110 (1895).
Phyllachora roystoneae J.R. Johnst. & Bruner, *Mycologia* 10: 43 (1918).
Sphaerodothis acrocomiae (Mont.) Arx & Müll., *Beitr. Kryptfl. Schweiz* 11(1):
246 (1954).
Sphaerodothis rimosa (Speg.) Shear, *Mycologia* 1(4): 162 (1909).

Espécimes examinados

BRASIL: BAHIA: Município Ilhéus, praia de São Domingos, sobre folíolos de coqueiro, 16/12/2005, JLB 460, Coleção Micológica – Herbário CEPEC 694.

BRASIL: BAHIA: Município de Ilhéus, praia Ponta do Ramo, sobre folíolos de coqueiro, 16/12/2005, JLB 461, Coleção Micológica – Herbário CEPEC 696.

BRASIL: BAHIA: Município de Ilhéus, praia Jóia do Atlântico, sobre folíolos de coqueiro, 16/12/2005, JLB 462, Coleção Micológica – Herbário CEPEC 697. BRASIL: BAHIA: Município de Ilhéus, praia de São Domingos, sobre folíolos de coqueiro, 06/04/2006, Nadja S. Vitória 02, Coleção Micológica – Herbário CEPEC 677.

BRASIL: BAHIA: Município de Itabuna, Jardim Primavera, sobre folíolos de coqueiro, 18/04/2006, Nadja S. Vitória 04, Coleção Micológica – Herbário CEPEC 695.

Ilustrações : Figuras 8–10

3. *Attalea funifera* – lixa-grande

Sintomas: Lesões necróticas, alongadas.

Descrição do patógeno

Estromas ascígeros escuros, 1,0–1,2 mm de diâmetro, peritécios com ostíolo rugoso, ascos e paráfises inobservados, ascósporos geralmente castanhos claros, elípticos a ovóides, às vezes com pequenos vacúolos, 22–32 x 8–10 µm. Picnídios enegrecidos, 0,2–1,0 mm de diâmetro, pulvinados, alongados, isolados ou em linha. Picnidióforos e conídios inobservados.

Classificação do patógeno

Camarotella cf. *acrocomiae* (Mont.) Hyde & Cannon

Espécimes examinados

BRASIL: BAHIA: Município de Ilhéus, sobre folíolos de *Attalea funifera*, 10/01/1985, R. Voeks 81, Herbário Central de Pesquisas do Cacau 39573.

Ilustrações : Figuras 11. 1 A–D

Habitat

Alagoas, Bahia e Sergipe, na floresta costeira e restingas, em diversos tipos de solos (Lorenzi, 2004).

Comentário

Os ascósporos são semelhantes aos de *C. acrocomiae*, embora mais compridos. Há necessidade de novas coletas do fungo.

4. *Attalea funifera* – lixa pequena

Sintomas: Lesões necróticas alongadas.

Descrição do patógeno

Estromas ascígeros escuros, dispersos sobre a superfície do folíolo, sub-globosos, isolados ou confluentes formando linhas e variando de 0,7–1,2 mm de diâmetro. Ascósporos hialinos, fusóides a losangulares, 18–26 x 6–8 µm com um grande vacúolo central. Ascos e paráfises inobservados. Picnídios irrompentes, pulvinados, negros, dispostos de maneira análoga à dos estromas, globosos, sub-globosos ou alongados, 0,3–1,0 mm de diâmetro. Picnidióforos e conídios inobservados.

Classificação do patógeno

Camarotella cf. *torrendiella* (Batista) Bezerra & Vitória

Espécimes examinados

BRASIL: BAHIA: Município de Ilhéus, sobre folíolos de *Attalea funifera*, 07/08/1985, L. R. Noblick et al. 4245, Herbário Central de Pesquisas do Cacau 37581.

Ilustrações : Figuras 11. 2 E–I.

Comentário

Exceto pela presença do grande vacúolo nos ascósporos, o fungo analisado nesse hospedeiro assemelha-se a *C. torrendiella*.

5. *Attalea geraensis* – lixa-grande

Sintomas:

Lesões necróticas e alongadas, ocasionando a queima das folhas da extremidade para base e tornando-as senescentes.

Descrição do patógeno

Estromas ascígeros escuros, dispersos sobre as superfícies do folíolo, 0,8–2,0 mm de diâmetro. Peritécios com ostíolo rugoso. Ascos e paráfises inobservados. Ascósporos geralmente castanho escuro, elípticos a ovóides, 18–25 x 7–10 µm. Picnidióforos e conídios inobservados.

Classificação do patógeno

Camarotella cf. acrocomiae (Mont.) Hyde & Cannon

Espécime examinado

BRASIL: MINAS GERAIS: Uberlândia, sobre folíolos de *Attalea geraensis*, 06/03/1991, JLB 459, Coleção Micológica – Herbário CEPEC 693.

Ilustrações : Figuras 12A–E.

Habitat

São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Bahia, na vegetação aberta de cerrado, sendo particularmente comum na região dos “gerais” na Bahia (Lorenzi 2004).

Comentário

Os ascósporos são semelhantes aos de *C. acrocomiae* de lixa grande de coqueiro. Há necessidade de novas coletas.

6. *Bactris ferruginea* – lixa-pequena

Sintomas:

Os peritécios e picnídios podem ser observados na face inferior e superior do limbo, na nervura dos folíolos e na ráquis. Nos folíolos, há inicialmente a formação de lesões amareladas e posteriormente necróticas as quais se expandem ao mesmo tempo em que se dá a queima e secamento das folhas. Os estromas periteciais geralmente encontram-se parasitados.

Descrição do patógeno

Estromas ascíferos negros, hemisféricos, 0,8–1,5 mm de diâmetro, ásperos, isolados, dispersos ou formando linhas ao longo das nervuras. Peritécios com ostíolo estriado. Ascospas parafisados, cilíndricos, unitunicados, pedicelados, 140–144 x 16–18, com oito ascósporos. Ascósporos hialinos, elípticos a fusóides, dísticos, octospóricos, 20–29 x 8–10 µm. Picnídios negros, brilhantes, pulvinados, ocorrendo ao lado dos estromas ascíferos, 0,3–0,7 mm de diâmetro. Picnidióforos revestindo todo o lóculo picnidial. Picnidiósporos filiformes, hialinos.

Classificação do patógeno

Camarotella cf. torrendiella (Batista) Bezerra & Vitória

Espécime examinado

BRASIL: BAHIA: Município de Buerarema, sobre folíolos de *Bactris ferruginea*, 17/05/2006, Nadja S. Vitória 03, Coleção Micológica – Herbário CEPEC 678.

BRASIL: BAHIA: Município de Una, sobre folíolos de *Bactris ferruginea*, 26/05/2006, JLB 457, Coleção Micológica – Herbário CEPEC 673.

BRASIL: BAHIA: Município de Entre Rios, folíolos de *Bactris ferruginea*, 29/09/1988, L.R. Noblick & R. Soeiro 4693, Herbário Central de Pesquisas do Cacau 60363.

Ilustrações : Figuras 13A–J.

Habitat

Costa litorânea, de Pernambuco até o sul da Bahia, na floresta Atlântica, bordas de matas e clareiras, sobre solos bem drenados (Lorenzi 2004).

Comentário

A lixa nesse hospedeiro assemelha-se morfológicamente à lixa-pequena do coqueiro. Embora os ascósporos sejam semelhantes aos de *C. torrendiella*, em gel de agarose 1,5%, foi possível observar que o tamanho do fragmento de *C. torrendiella* de *Bactris ferruginea*, aparentemente, é um pouco maior quando comparado ao fragmento de *C. torrendiella* de coqueiro, havendo a necessidade de realizar o sequenciamento para confirmação. Esses fragmentos foram amplificados com primers ITS4 e ITS5 (Figura 24B). Este é o primeiro registro de extração e amplificação do DNA do patógeno nesse hospedeiro.

7. *Bactris pickelli* – lixa-pequena

Sintomas:

Lesões necróticas, alongadas.

Descrição do patógeno

Estromas ascígeros escuros concentrados principalmente nos bordos dos folíolos, 0,5–1,1 mm de diâmetro, isolados ou confluentes formando linhas. Peritécios com ostíolo estriado. Ascos parafisados, cilíndricos, unitunicados, pedicelados, 86–124 x 10–14 µm. Ascósporos hialinos, elípticos a fusóides, dísticos, octospóricos, 22–30 x 6–10 µm. Picnídios negros, brilhantes, pulvinados, aproximadamente esféricos, ocorrendo ao lado dos estromas ascígeros, 0,2–0,4 mm de diâmetro. Picnidióforos e conídios inobservados.

Classificação do patógeno

Camarotella cf. *torrendiella* (Batista) Bezerra & Vitória

Espécime examinado

BRASIL: ALAGOAS: Murici-Bananeiras, folíolos de *Bactris pickelli*, 16/03/2002, André M. de Carvalho e colaboradores 7066, Herbário Central de Pesquisas do Cacau 90204.

Ilustrações : Figuras 14A–G.

Habitat

Faixa litorânea leste, desde a Paraíba até o norte do Espírito Santo, no su-bosque da floresta Atlântica, sobre solos argilosos lateríticos de encostas e planícies bem drenadas (Lorenzi 2004).

Comentário

A lixa nesse hospedeiro assemelha-se à lixa-pequena do coqueiro. Há necessidade de novas coletas.

8. *Bactris* sp. – lixa-pequena

Sintomas:

Lesões necróticas, alongadas.

Descrição do patógeno

Estromas ascígeros negros, hemisféricos, com um ou mais lóculos, ásperos, isolados, dispersos ou formando linhas ao longo das nervuras. Peritécios com ostíolo estriado. Ascos parafisados, cilíndricos a clavados, unitunicados, pedicelados, 90–126 x 10–16 µm, com oito ascósporos. Ascósporos dísticos, hialinos, elípticos a fusóides, 17,5–20.0 x 7,5 µm. Picnídios inobservados.

Classificação do patógeno

Camarotella torrendiella (Batista) Bezerra & Vitória

Espécime examinado

BRASIL: BAHIA: Rio de Contas, sobre folíolos de *Bactris* sp., 22/02/2006, JLB 463, Coleção Micológica – Herbário CEPEC 698.

Ilustrações : Figuras 15A–E.

Comentário

Além das semelhanças morfológicas, os produtos da amplificação de DNA a partir de ascósporos de *C. torrendiella* do *Bactris* sp. e *C. torrendiella* de *C. nucifera*, usando primers de ITS4 e ITS5 combinados, apresentaram bandas com mesmo peso molecular (Figura 24A). Esse é o primeiro registro da caracterização morfológica, extração e amplificação do patógeno no hospedeiro.

9. *Syagrus botryophora* – lixa-pequena

Sintomas:

Lesões necróticas, alongadas. Sobre estas lesões aparecem os estromas do fungo.

Descrição do patógeno

Estromas ascígeros negros, globosos a sub-globosos, 0,7–1,0 mm de diâmetro, isolados ou agregados formando linhas. Peritécios com ostíolo estriado. Ascos parafisados, unitunicados, cilíndricos a clavados, pedicelados, transparentes, octosporicos, 160–200 x 16–24 µm. Ascósporos hialinos, fusóides, dísticos, asseptados, com dois grandes vacúolos, 18–25 x 7–10 µm. Picnídios brilhantes, negros, pulvinados, alongados ou hemisféricos, próximos dos estromas, 0,2–0,4 mm de diâmetro. Picnidióforos e conídios não observados.

Classificação do patógeno

Camaretella torrendiella (Batista) Bezerra & Vitória

Espécimes examinados

BRASIL: BAHIA: Município de Jussari, sobre folíolos de *Syagrus botryophora*, 26/05/2006, JLB 458, Coleção Micológica – Herbário CEPEC 674.

BRASIL: BAHIA: Município de Belmonte, sobre folíolos de *Syagrus botryophora*, 29/09/1994, Noblick et al.5002, Herbário Central de Pesquisas do Cacau 63571.

BRASIL: BAHIA: Município de Itambé, sobre folíolos de *Syagrus botryophora*, 03/03/1978, S. A. Mori et al. 9388, Herbário Central de Pesquisas do Cacau, 13275.

BRASIL: BAHIA: Município de Itamarajú, sobre folíolos de *Syagrus botryophora*, 19/09/1978, S. A. Mori et al. 10710, Herbário Central de Pesquisas do Cacau 14773.

Ilustrações : Figura 16A–H

Habitat

Costa Atlântica leste do país (de Sergipe ao norte do Espírito Santo), na floresta Atlântica da planície litorânea (menos de 400m de altitude) em solos argilosos lateríticos (Lorenzi 2004).

Comentário

Morfologicamente corresponde a *C. torrendiella* e molecularmente os produtos da amplificação dos fragmentos de DNA a partir de ascósporos de *C. torrendiella* de *Syagrus botryophora* e *C. torrendiella* de *C. nucifera*, usando primers de ITS4 e ITS5 combinados, apresentaram bandas com mesmo peso molecular (Figura 24A). Esse é o primeiro registro da caracterização morfológica, extração e amplificação do patógeno no hospedeiro.

10. *Syagrus microphylla* – lixa-pequena

Sintomas:

Lesões necróticas, alongadas.

Descrição do patógeno

Estromas ascígeros negros. Peritécios com ostíolo estriado, 0,8–1,0 mm de diâmetro. Ascos e paráfises inobservados. Ascósporos hialinos, fusóides, 16–24 x 4–6 µm sem bainha mucosa. Picnídios enegrecidos, ocorrendo nas duas superfícies adaxial e abaxial, pulvinados, alongados ou esféricos, alguns distorcidos pela pressão dos estromas ascígeros em desenvolvimento, 0,3–0,6 mm de diâmetro. Picnidóforos e conídios inobservados.

Classificação do patógeno

Camarotella cf. *torrendiella* (Batista) Bezerra & Vitória

Espécimes examinados

BRASIL: BAHIA: Município de Delfino, sobre folíolos de *Syagrus microphylla*, 09/03/1997, P. Gasson, R. Harley, A. M. Giulletti, E. N. Lughadha 6175, Herbário Central de Pesquisas do Cacau 79839.

BRASIL: BAHIA: Morro do Chapéu, sobre folíolos de *Syagrus microphylla*, 30/03/1980, R. M. Harley 22816, Herbário Central de Pesquisas do Cacau 30714.

Ilustrações: Figura 17A–F

Habitat

Endêmica ao estado da Bahia, região da Chapada Diamantina (Serra do Tombador), na transição entre a caatinga e os campos rupestres, de altitudes superiores a 800m, geralmente sobre solos arenosos e cascalhentos (Lorenzi 2004).

Comentário

Ascósporos semelhantes aos de *C. torrendiella*, embora mais finos.

11. *Syagrus petraea* – lixa-pequena

Sintomas:

Lesões necróticas, alongadas.

Descrição do patógeno

Observaram-se apenas picnídios anfégenos, enegrecidos, brilhantes, um pouco alongados, irrompentes, pulvinados, 0,3–0,5 podendo atingir até 1,6 mm de diâmetro, hialinos. Picnidióforos alongados, hialinos, dispostos em paliçada. Conídios hialinos, filiformes, recurvados.

Classificação do patógeno

Camarotella cf. *torrendiella* (Batista) Bezerra & Vitória

Espécime examinado

BRASIL: BAHIA: Município de Barreiras, sobre folíolos de *Syagrus petraea*, 09/10/1981, G. Hatschbach 44102, Herbário Central de Pesquisas do Cacau 56234.

Ilustração: Figura 18A–D

Habitat

Pará, Maranhão, Piauí, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Tocantins, Goiás, Mato Grosso, Rondônia e Mato Grosso do Sul, no cerrado de solos arenosos e nas matas abertas (semidecíduas) em terrenos rochosos, até 1000 m de altitude. Também na Bolívia e Paraguai (Lorenzi 2004).

Comentário

Morfologicamente os estromas picnidiais assemelham-se aos de *C. torrendiella*, embora peritécios, ascos, ascósporos e paráfises não tenham sido observados. É necessário fazer novas coletas para poder confirmar a classificação do fungo.

12. *Syagrus schizophylla*

Sintomas:

Lesões necróticas, alongadas.

Descrição do patógeno

Estromas ascígeros irrompentes, isolados ou confluentes, geralmente epífilos, ocasionalmente hipófilos, de base aplanada, marrom a negros, às vezes revestido por um pigmento amarelado, evanescente, carbonáceos, subglobosos a elipsóides, ásperos, confluentes, formando linhas de verrugas ao longo da nervura, 0,8–1,4 x 0,5–0,8 mm. Tecido estromático formado pela colonização das células da epiderme e da hipoderme, pseudoparenquimático, negro, opaco; paredes do estroma vistas em cortes transversais, escuras, pseudoparenquimáticas, 152–256 µm de espessura nos lados, 104–176 µm de

espessura na parte superior e 24–104 μm de espessura na parte inferior; células parietais externas marrom-negras, 4,0–8,0 x 4,8–5,6 μm ; células parietais internas, comprimidas lateralmente, alongadas, 1,6–2,4 μm de diam. Peritécios, subglobosos, imersos no estroma, 480–504 μm de altura e 680–800 μm de largura; lóculo peritecual geralmente um só por estroma, 256–344 μm de altura e 216–400 μm de largura; paredes periteciais pouco distintas do estroma; ostíolo central, plano, circular, estriado externamente, revestido internamente de perífises hialinas que variam de 0,8–2,4 μm de diâmetro; Ascos clavados, unitunicados, paralelos, octospóricos, subpedicelados, 110–150 x 16–32 μm ; paráfises septadas, irregulares, 1,6–4,0 μm de diâmetro, hialinas, às vezes um tanto evanescentes. Ascósporos hialinos, dísticos a trísticos, fusóides, de pólos agudos, envoltos numa bainha mucosa, medindo 30–54 x 4,0–6,0 μm excluindo a camada mucosa e 40–70 x 14–20 μm incluindo a bainha.

Estromas picnidiais irrompendo a partir das células de epiderme e hipoderme, alguns recobertos pela cutícula, pulvinados, subglobosos, mas às vezes um pouco alongados, carbonáceos, negros, brilhantes, dispostos de maneira análoga a dos estromas ascígeros, 0,2–0,6 mm de diâmetro. Picnídios imersos no estroma, dimidiados, negros, até 320 μm de largura e até 176 μm de altura de paredes delgadas, mais espessas na parte basal. Picnidióforos filídicos revestindo todo o lóculo picnidial, dispostos em paliçada, hialinos, ramificados, 0,8–1,6 μm , ápices acuminados. Picnidiósporos filiformes, hialinos, recurvos, sigmóides, acropleurógenos, 3,0–14,4 x 0,8 μm , contínuos.

Classificação do patógeno

Camarotella dianesii Vitória & Bezerra spec. nov.

(Em homenagem ao micologista brasileiro J. C. Dianese).

Espécime examinado

BRASIL: BAHIA: Município de Valença, sobre folíolos de *Syagrus schizophylla*, 25/02/1986, L. Hage 1946, Herbário Central de Pesquisas do Cacau 38317.

BRASIL: SERGIPE: Município de Pacatuba, sobre folíolos de *Syagrus schizophylla*, 16/11/2006, Dulce Regina Warwick 01, Coleção Micológica – Herbário CEPEC 679.

Ilustração: Figura 19A–H

Habitat

Pernambuco até a Bahia, na região litorânea, em restingas abertas ao longo das praias, bem como nas florestas, sempre em solos arenosos (Lorenzi 2004).

Comentário

O tamanho dos ascósporos não é compatível com os das espécies *C. acrocomiae* e *C. torrendiella*. Sanchez et al. (2003) registraram uma espécie considerada nova para a ciência, mas, não apresentaram uma diagnose formal. As características do fungo apresentadas pelos autores são compatíveis com as do presente estudo. Trata-se de uma nova espécie que necessita ser descrita formalmente para ter validade.

13. *Syagrus vagans* – lixa-pequena

Sintomas:

Lesões necróticas, alongadas.

Descrição do patógeno

Estromas ascígeros escuros, isolados ou aglomerados formando linhas, 0,8–1,4 mm de diâmetro. Peritécios com ostíolo rugoso. Ascos e paráfises inobservados. Ascósporos hialinos, fusóides, 16–24 x 4–8 µm. Picnídios negros, brilhantes, pulvinados, sub-globosos ou alongados, 0,3–1,0 mm de diâmetro.

Classificação do patógeno

Camarotella cf. *torrendiella* (Batista) Bezerra & Vitória

Espécime examinado

BRASIL: BAHIA: Município de Maracás, sobre folíolos de *Syagrus vagans*, 27/04/1978, S.A. Mori et al. 10066, Herbário Central de Pesquisas do Cacau 14439.

Ilustração: Figura 20A–D

Habitat

Endêmica ao estado da Bahia, na vegetação da caatinga, em altitudes superiores a 250 m (Lorenzi 2004).

Comentário

Morfologicamente assemelha-se ao *C. torrendiella*, mas, necessita de novas coletas para confirmação.

14. *Syagrus werdermannii* – lixa-pequena

Sintomas:

Lesões necróticas, alongadas.

Descrição do patógeno

Estromas ascígeros negros, hemisféricos, isolados, dispostos sobre a face adaxial dos folíolos, 0,7–1,0 mm de diâmetro. Peritécios com ostíolo rugoso. Ascos parafisados, cilíndricos, unitunicados, com oito ascósporos, dísticos ou monósticos, 80–128 x 10–20 µm. Ascósporos hialinos a castanhos-claros, fusóides a elípticos, 16–24 x 8–10 µm, sem bainha mucosa, e 26–28 x 14 µm com bainha mucosa. Picnídios inobservados.

Classificação do patógeno

Camarotella cf. torrendiella (Batista) Bezerra & Vitória

Espécime examinado

BRASIL: BAHIA: Município de Caetité, sobre folíolos de *Syagrus werdermannii*, 29/01/1986, L.R. Noblick & G. Lobo 4519, Herbário Central de Pesquisas do Cacau 55194.

Ilustração: Figuras 21A–D

Habitat

Endêmica ao estado da Bahia, no cerrado de altitude sobre solos arenosos. Sua ocorrência restringe-se à uma pequena área do município de Caetité (centro-oeste da BA), onde está seriamente ameaçada de extinção (Lorenzi 2004).

Comentário

É preciso mais coletas para confirmação da espécie.

5.3.2 Testes de germinação, isolamento e cultivo

Os ascósporos germinaram após 24 horas em água de torneira (gota pendente). Houve a formação de tubo germinativo geralmente sub-equatorial, ocasionalmente equatorial ou sub-apical, a princípio subgloboso a lobado, contínuo, e, posteriormente, subcilindráceo, flexuoso, septado perto da base, atenuado em direção à extremidade (Figura 22).

Os testes de isolamento e cultivo realizados com meio líquido completo e meio mínimo sólido (Oliveira et al., 2004) e também utilizando suco v8-agar, extrato-de-levedura-agar, batata-dextrose-agar e cafeína-agar apresentaram resultados negativos, ocorrendo contaminação com fungos dos gêneros *Pestalotia*, *Trichoderma* e *Penicillium*, além de leveduras, não havendo germinação dos ascósporos.

3.3.3 Testes de Inoculação

Aproximadamente dez dias após a inoculação observaram-se os primeiros sinais de infecção apenas nas inoculações com ascósporos. Pequenos pontos negros apareceram na parte abaxial do folíolo com crescimento micelial de cor escura e apressórios ligados aos estômatos dando origem à formação dos primórdios de estroma (Figuras 23A-C).

3.3.4 Extração de DNA, quantificação e visualização

A extração de DNA, utilizando-se himênios colhidos de amostras recém coletadas (um ou dois dias antes da extração de DNA), apresentou melhor resultado, quando comparada com as extrações a partir de himênios estocados a – 80°C por duas ou três semanas. Após esse prazo, o DNA genômico degrada não sendo adequado às ampliações.

Com relação aos métodos, o método direto 2, o qual utilizou um tampão de lise celular (*Cell Lysis Buffer*) no lugar da maceração, mostrou-se mais adequado para extração de DNA de *Camarotella torrendiella* e *C. acrocomiae*, tendo apresentado um DNA de boa qualidade e quantidade satisfatória para realização da PCR, além de possibilitar extrair o DNA a partir de um único himênio.

3.3.5 Reação de PCR

A qualidade do DNA produzida pelo método 2 foi suficiente para completar as etapas de PCR, sequenciamento e clonagem. Com relação ao PCR, a visualização das bandas só foi possível após o NESTED-PCR modificado com himênio “fresco” (Figura 24 A-B). A reproducibilidade da técnica foi excelente, com *fingerprints* identificáveis, mostrando semelhanças no padrão de bandas entre *C. torrendiella* de coqueiro e *C. torrendiella* de *Bactris* sp. e *S. botryophora* (Figura 24 A) . Também foi possível visualizar que o tamanho do fragmento de *C. torrendiella* de *B. ferruginea*, aparentemente, é um pouco maior quando comparado ao fragmento de *C. torrendiella* de coqueiro, havendo a necessidade de realizar o sequenciamento para confirmação. Todos

esses foram amplificados com primers ITS4/ITS5 (Figura 24 A). Em gel de agarose 1,5%, foi possível observar pouca diferença entre *C. torrendiella* e *C. acrocomiae* de coqueiro, do qual obtivemos um fragmento de aproximadamente 600 pb para o conjunto de pares ITS4/ITS5, 600 pb para NS1/NS2 e 700 pb para NS3/NS4, indicando também a necessidade de sequenciamento para confirmar essa sutil diferença (figuras 24A-B). O sequenciamento direto foi realizado, no entanto, não obtivemos sucesso, havendo a necessidade de clonagem dos fragmentos. Bons resultados foram obtidos para clonagem dos produtos de NESTED-PCR até a etapa de purificação (Figura 25) e o sequenciamento desses fragmentos estão em processamento.



FIG. 2 – *Camarotella torrendiella* e *C. acrocomiae* em coqueiro anão. A. Estromas periteciais de lixa-pequena (seta longa) e lixa-grande (seta curta) no mesmo folíolo; B. Queima da extremidade da folha para base.

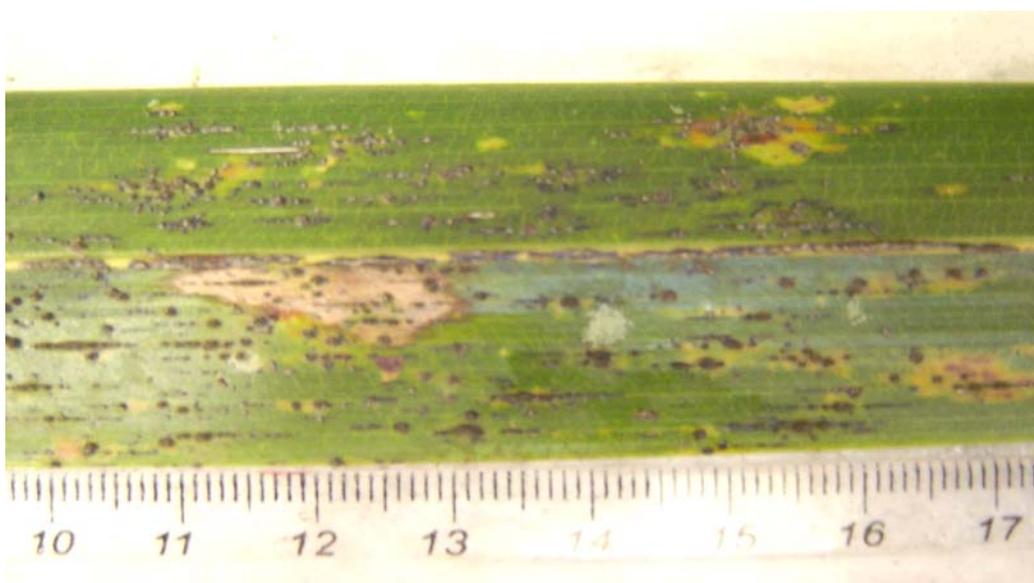


FIG. 3 – *Camarotella torrendiella* em coqueiro anão. Lixa-pequena do coqueiro: estromas negros dispostos no sentido das nervuras.

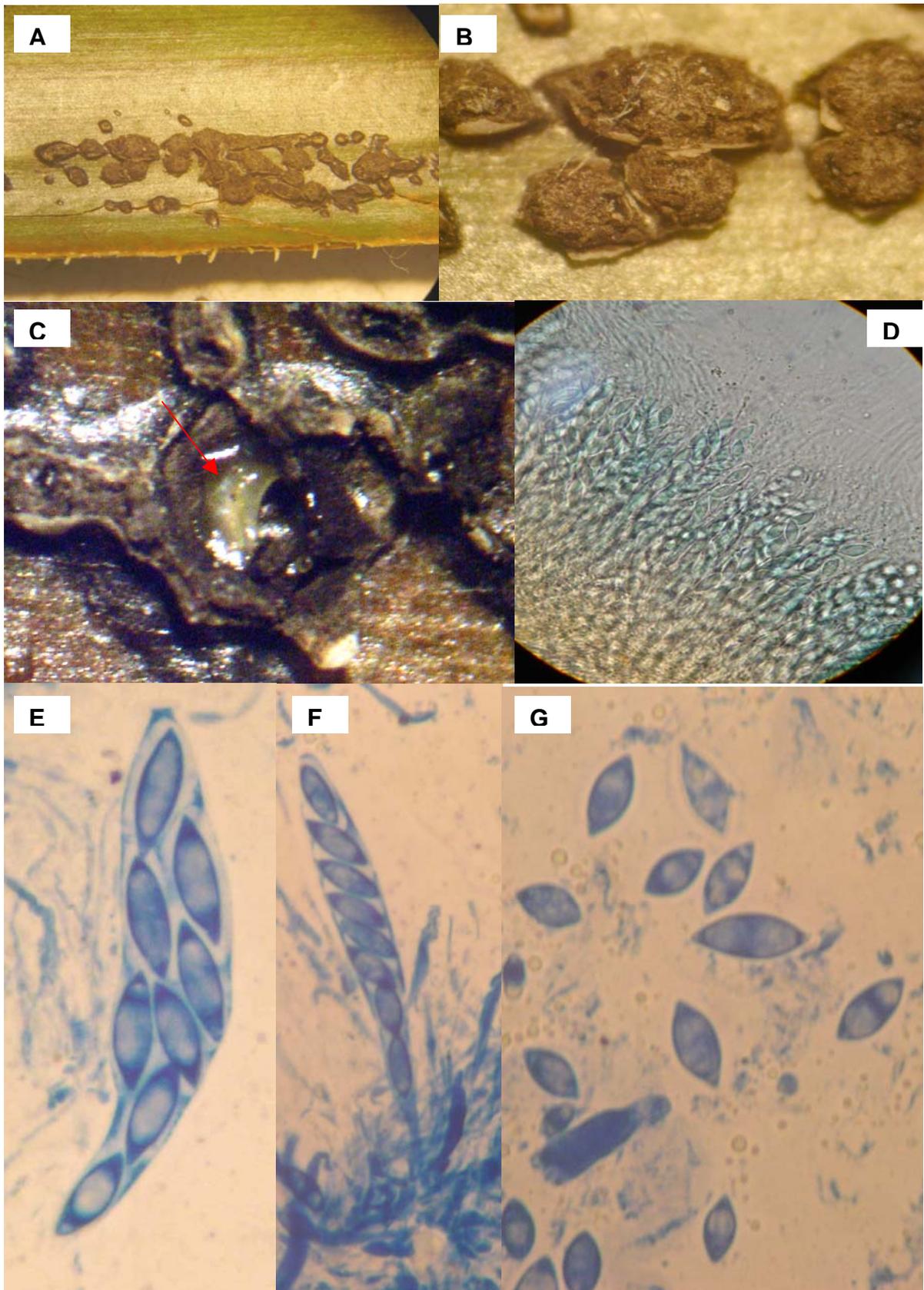


FIG. 4 – *Camarotella torrendiella* em coqueiro: A-B. Estromas ascígeros; C. Himênio mucoso; D-F. Ascós e paráfises; G. Ascósporos hialinos, com e sem bainha mucosa.

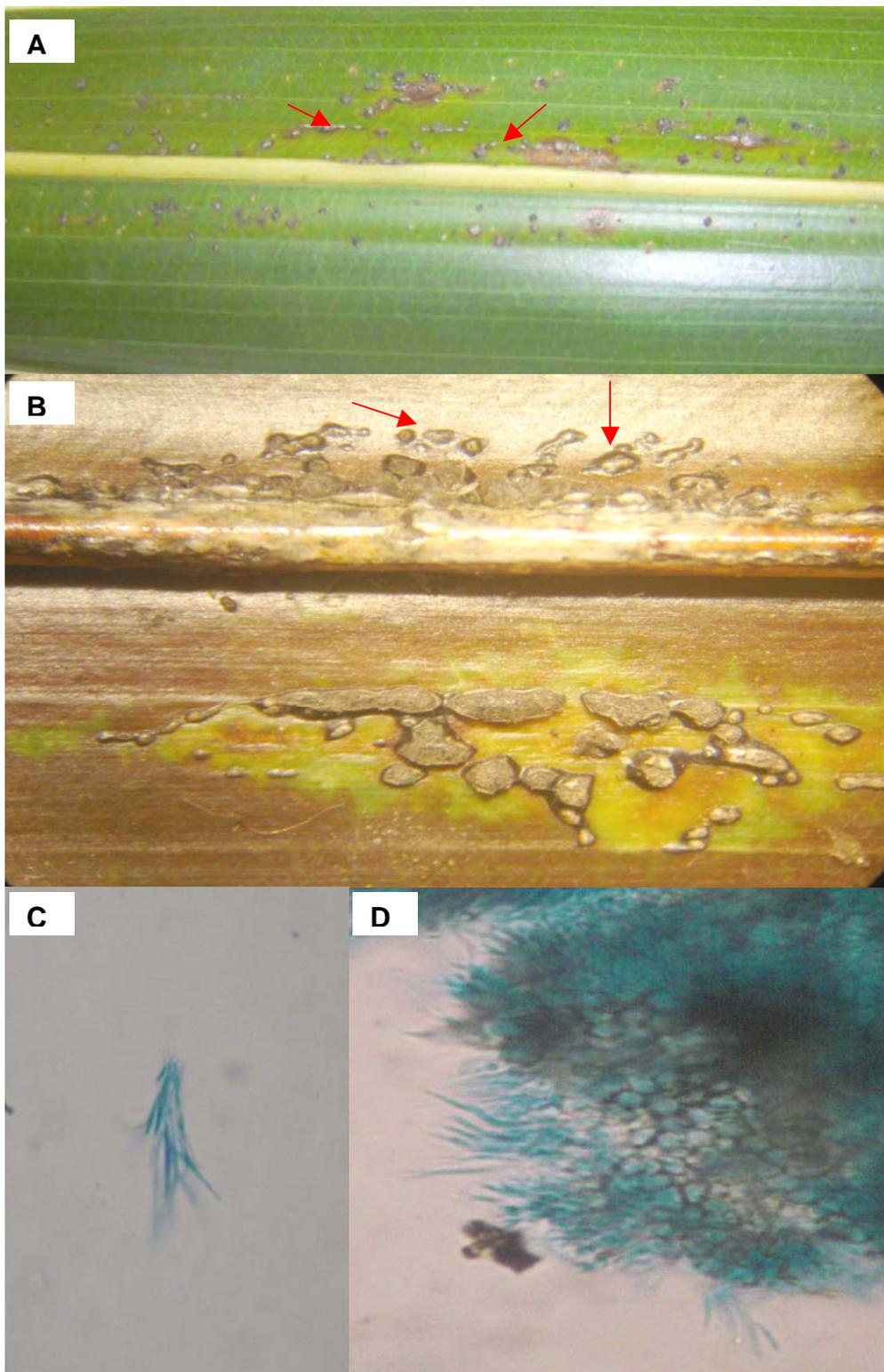


FIG. 5 – *Camarotella torrendiella* em coqueiro: A-B. Estromas picnidiais (setas); C-D. Picnidióforos e conídios.

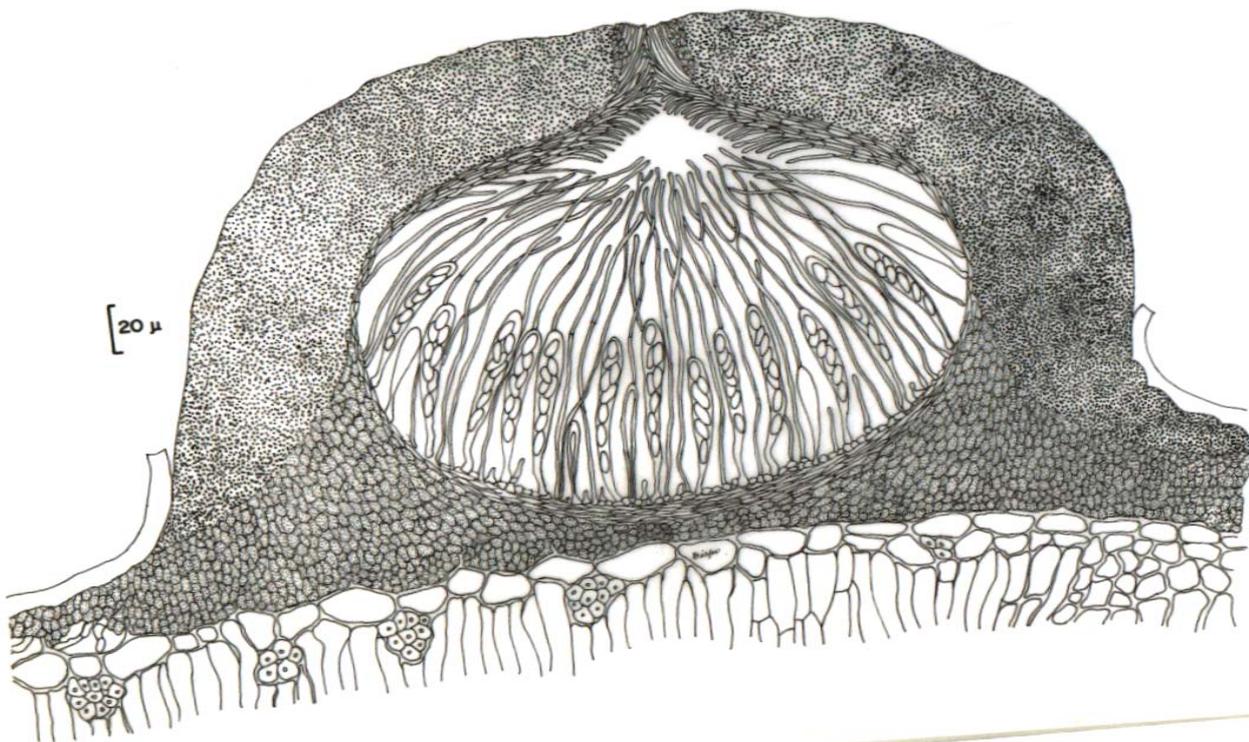


FIG. 6 – Desenho: Bezerra, J.L. *Catacauma torrendiella* de coqueiro. Peritécios intraepidermais ostiolados, com ascos, paráfises, ascósporos e perifises.

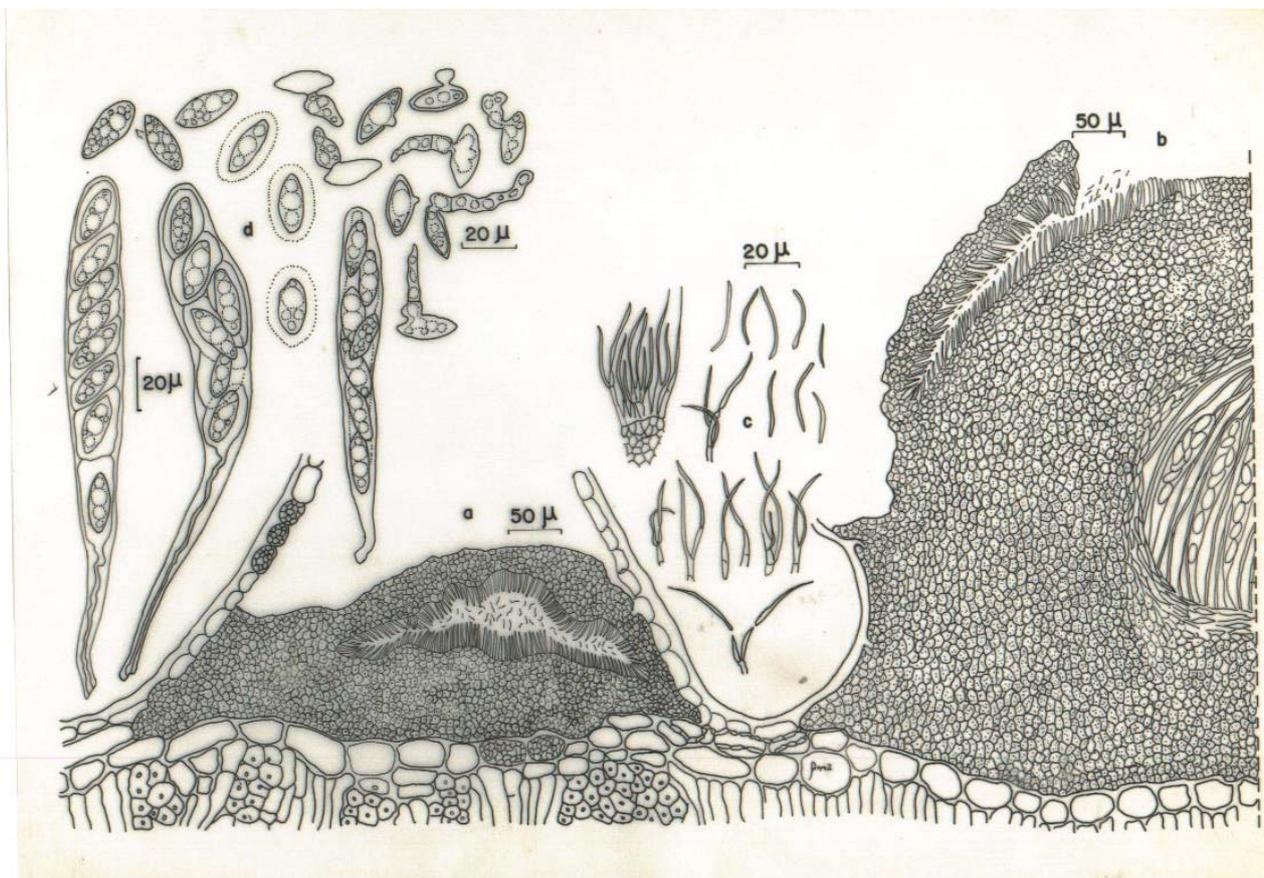


FIG. 7 – Desenho: Bezerra, J.L. *Catacauma torrendiella* de coqueiro. Piconostroma, picnidióforos, conídios; ascomas, ascos, paráfises, ascósporos germinados e ascósporos não germinados.

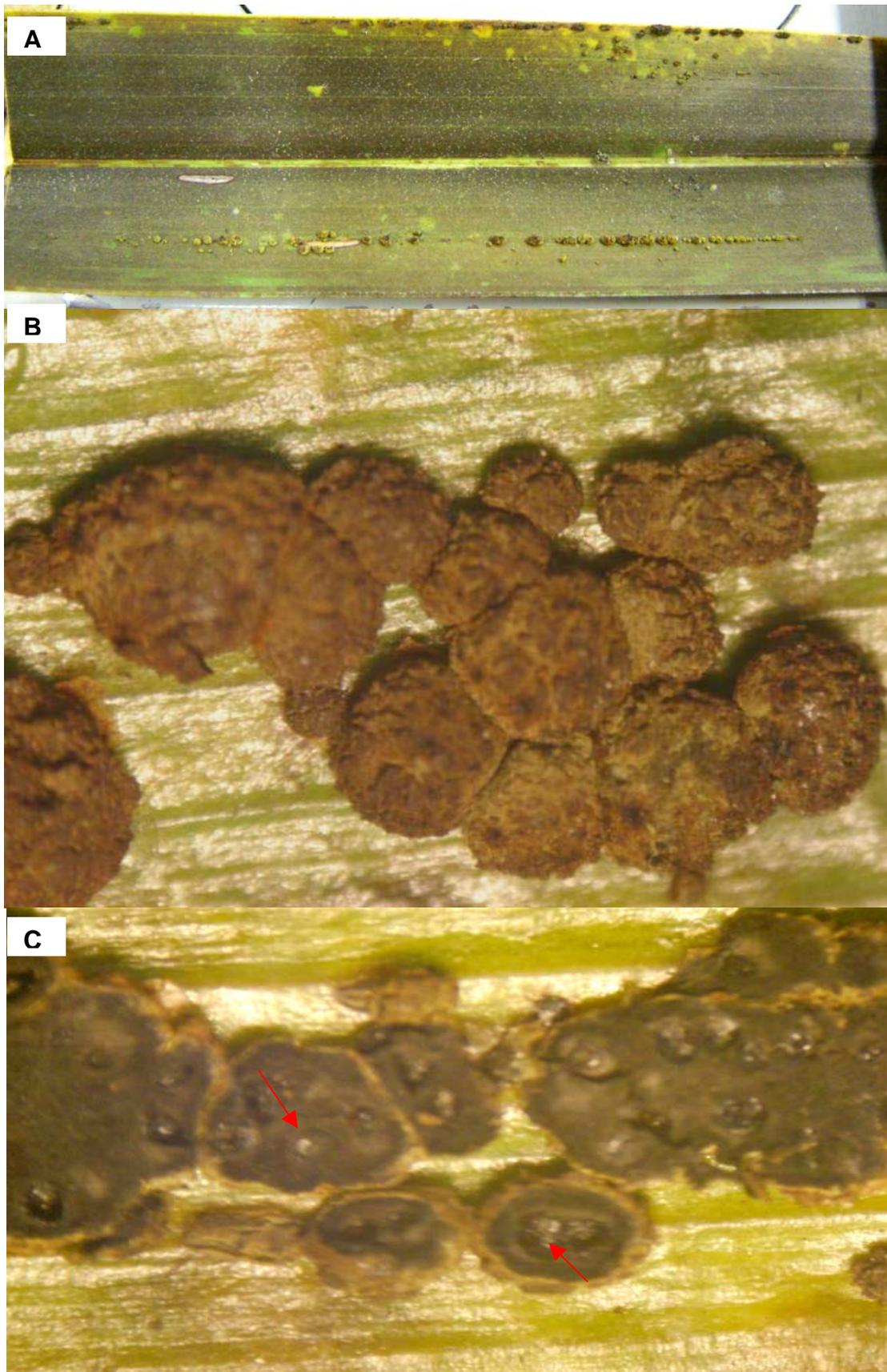


FIG. 8 – *Camarotella acrocomiae* de coqueiro. A. Estromas periteciais na face abaxial do folíolo; B. Detalhe da superfície dos estromas; C. Himênio mucoso.

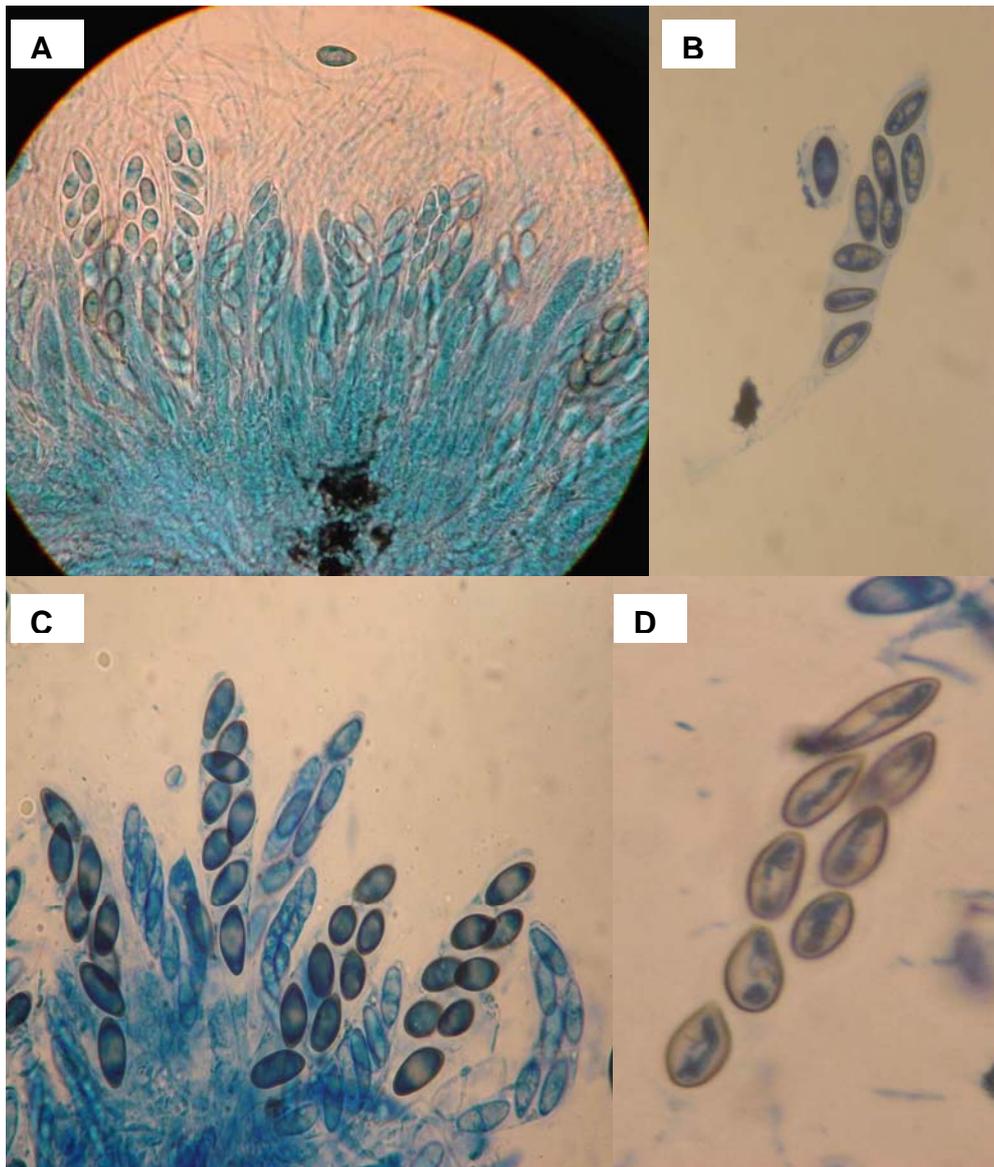


FIG. 9 – *Camarotella acrocomiae* de coqueiro: A-D. Ascospores, paraphyses and ascospores.

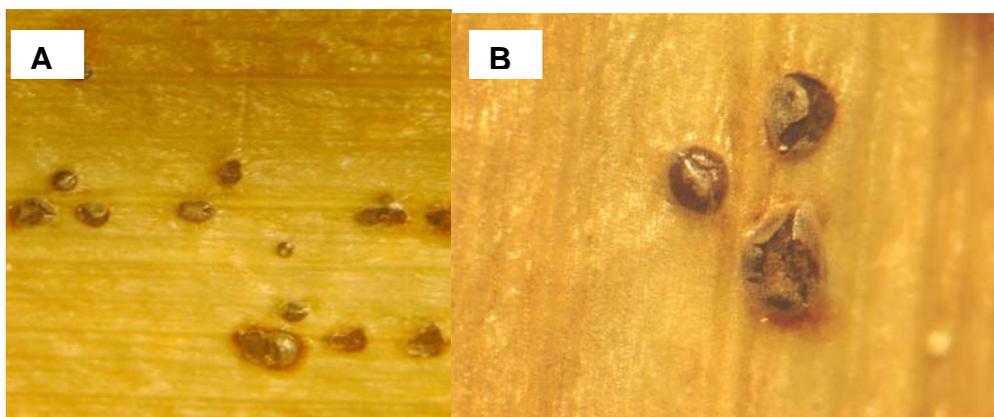


FIG. 10 – *Camarotella acrocomiae* de coqueiro. A-B. Subcuticular picnidia.

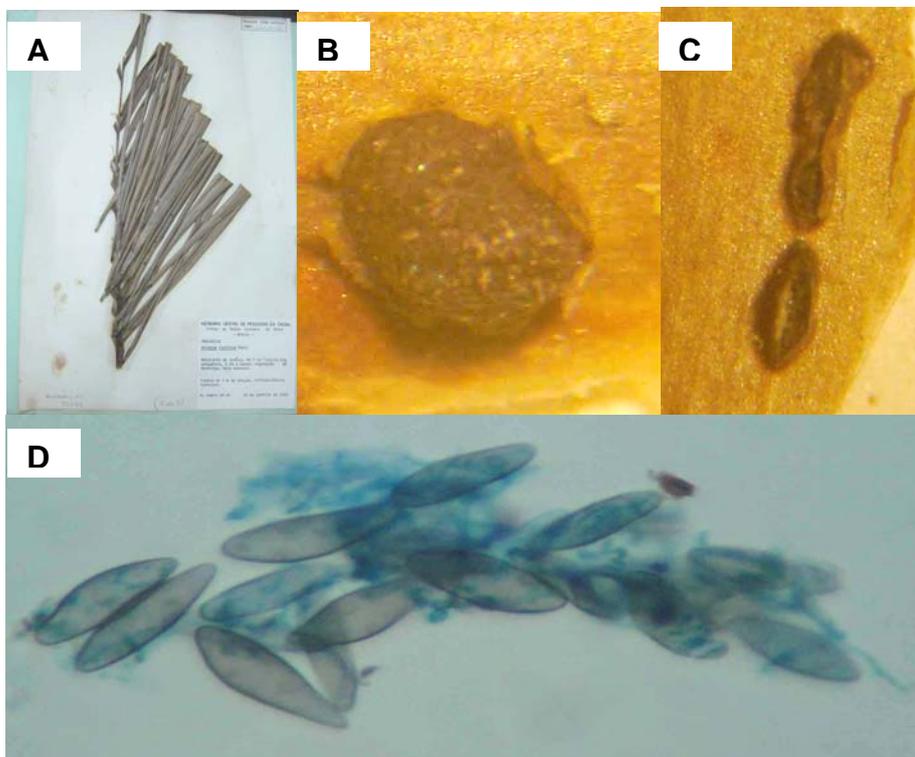


FIG. 11.1 – *Camarotella* cf. *acrocomiae* sobre *Attalea funifera*: A. Exsicata n°39573; B. Estromas periteciais; C. Estromas picnidiais; D. Ascósporos.

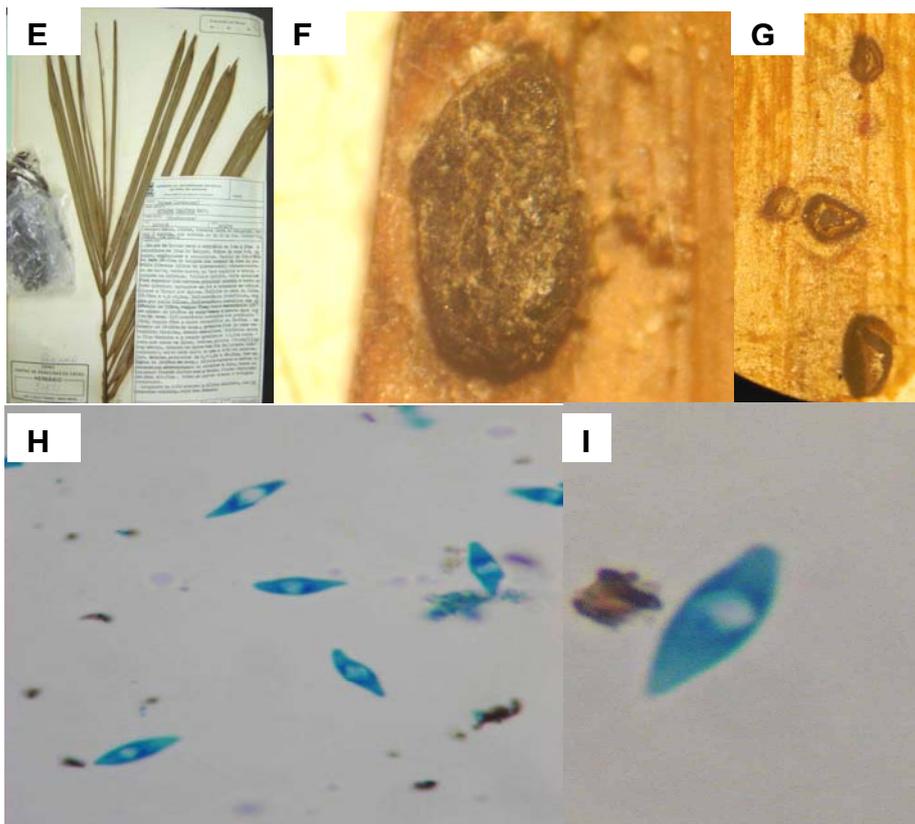


FIG. 11.2 – *Camarotella* cf. *torrendiella* sobre *Attalea funifera*: E. Exsicata n°37581; F. Estromas periteciais; G. Estromas picnidiais; H-I. Ascósporos.

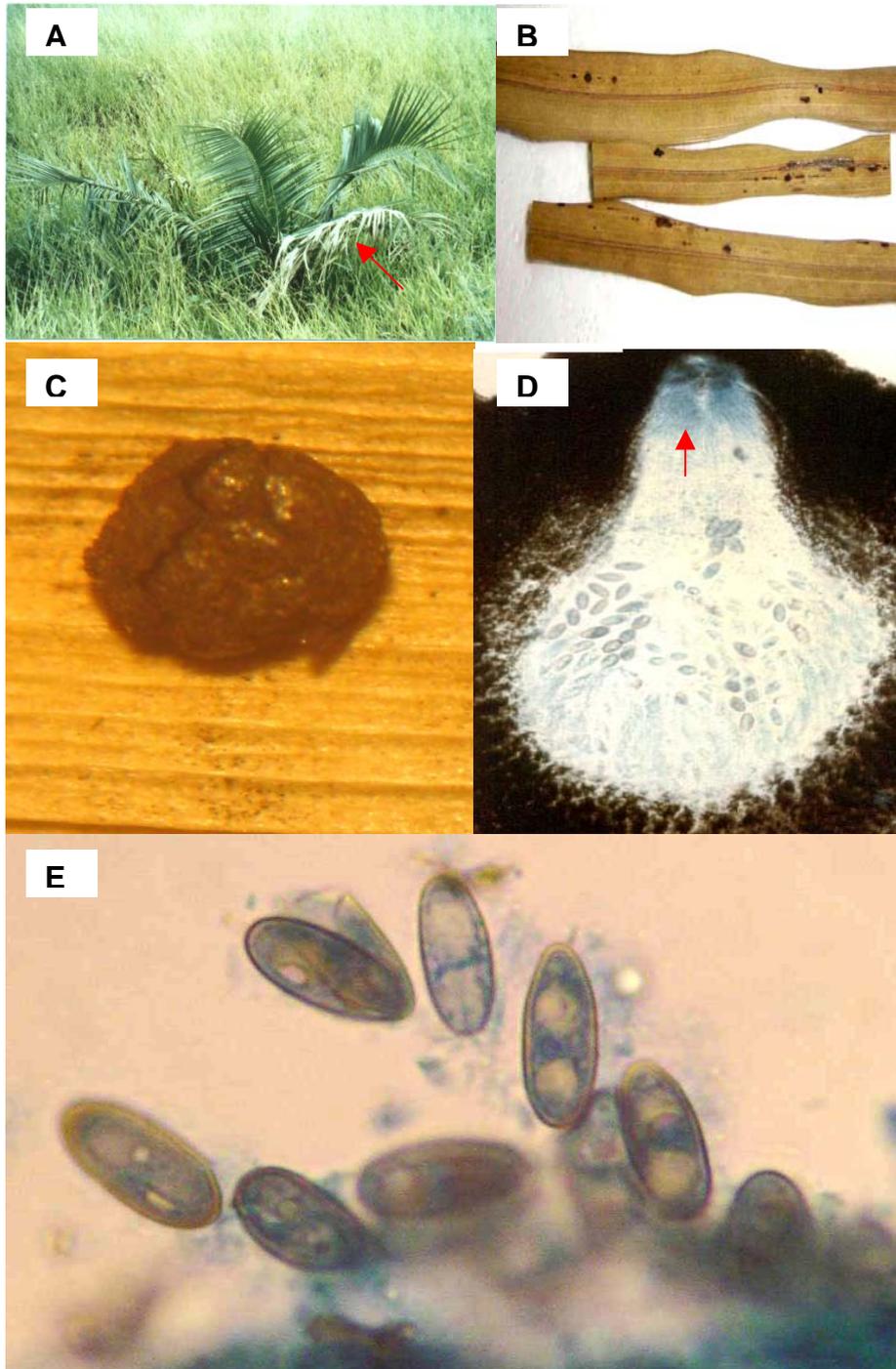


FIG. 12 – *Camarotella* cf. *acrocomiae* sobre *Attalea geraensis*: A. O hospedeiro no seu habitat natural; B. Estromas periteciais na face adaxial do folíolo; C. Detalhe da superfície do estroma; D. Corte longitudinal de peritécio mostrando as períspores no ostíolo (seta) E. Ascósporos.

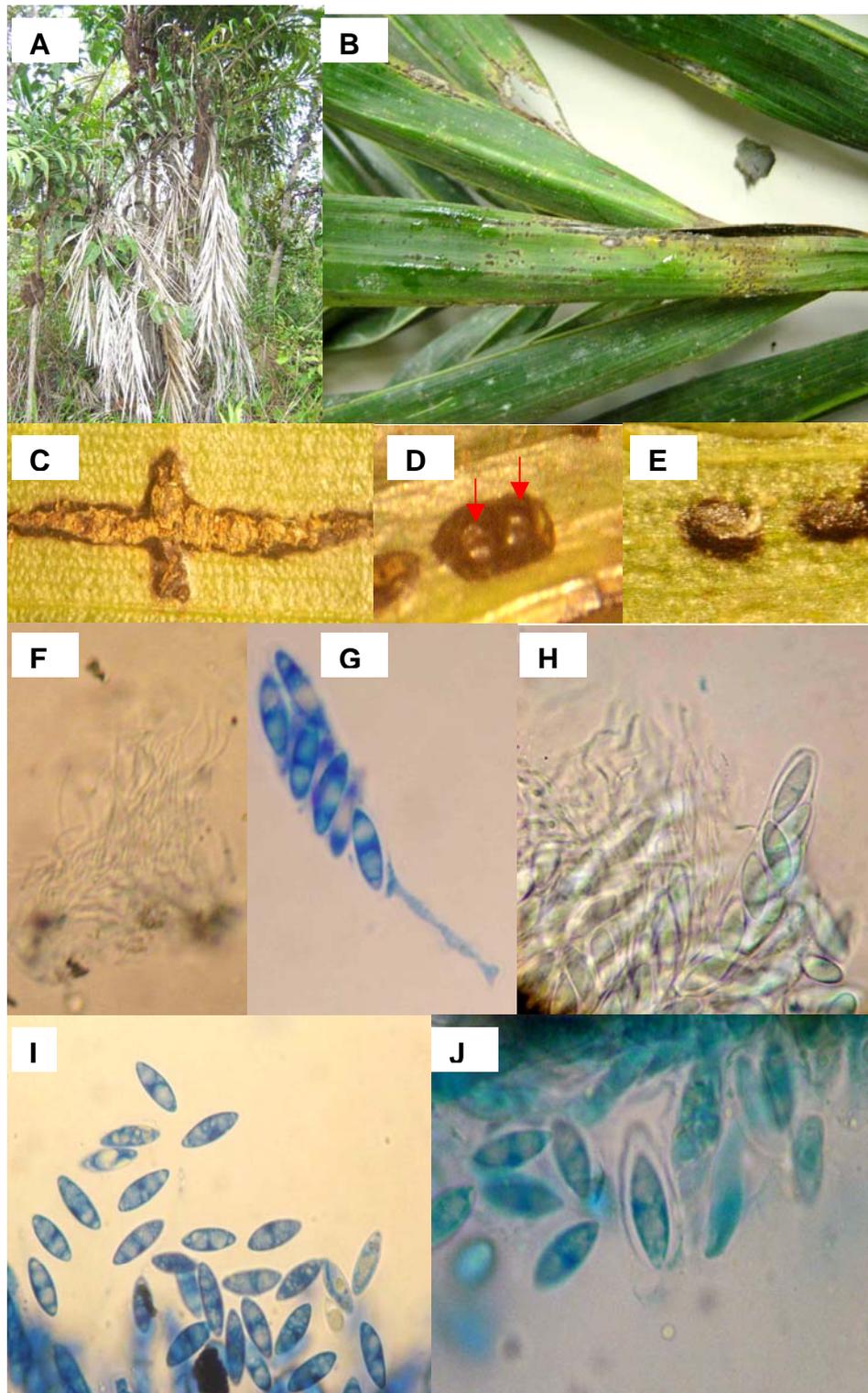


FIG. 13 – *Camarotella* cf. *torrendiella* sobre *Bactris ferruginea*: A. O hospedeiro no seu habitat natural; B. estromas negros dispostos no sentido das nervuras; C. Estromas periteciais; D. Himênio mucoso (setas); E. Estromas picnidiais; F. Picnidióforos e conídios; G-H. Ascós e paráfises; I-J. Ascósporos com e sem bainha mucosa.

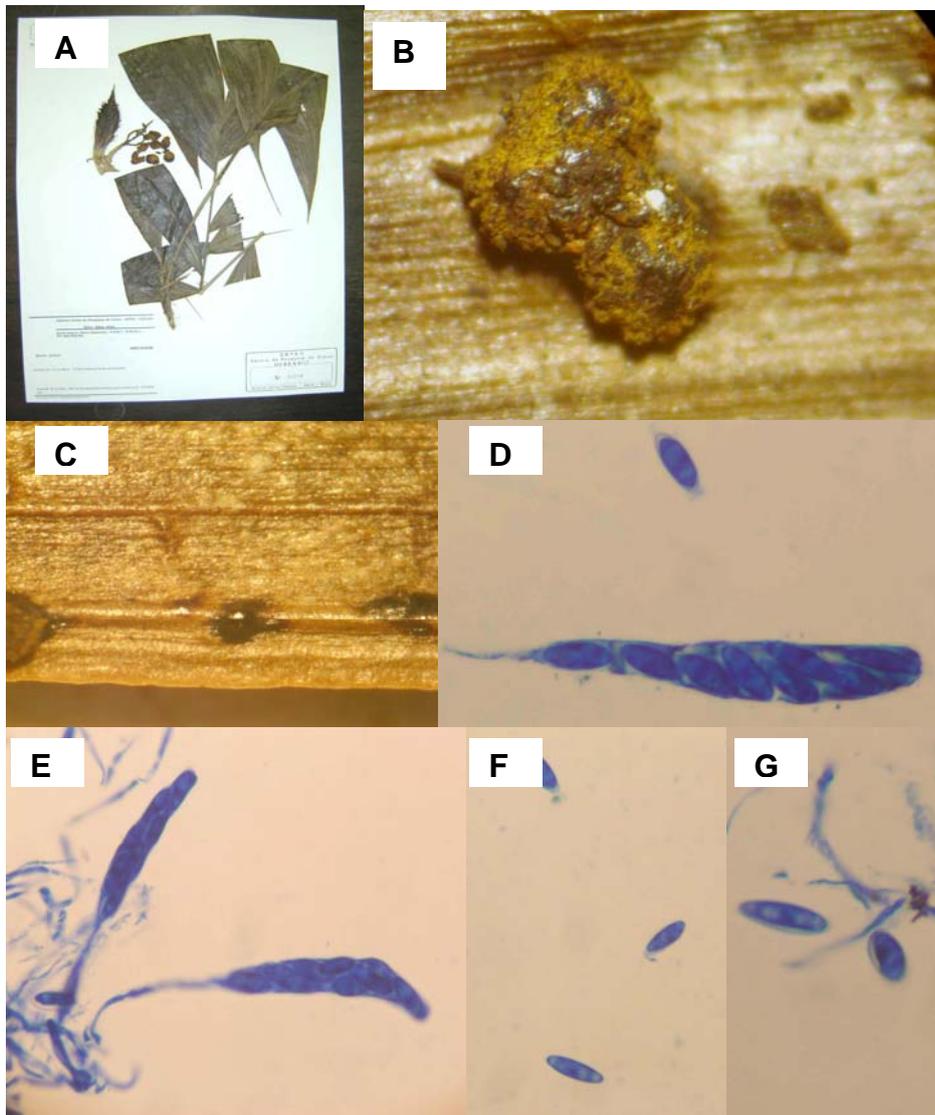


FIG. 14 – *Camarotella* cf. *torrendiella* sobre *Bactris pickelli*: A. Exsicata n°90204; B. Estromas ascígeros; C. Estromas picnidiais; D-G. Ascós, paráfises e ascósporos.

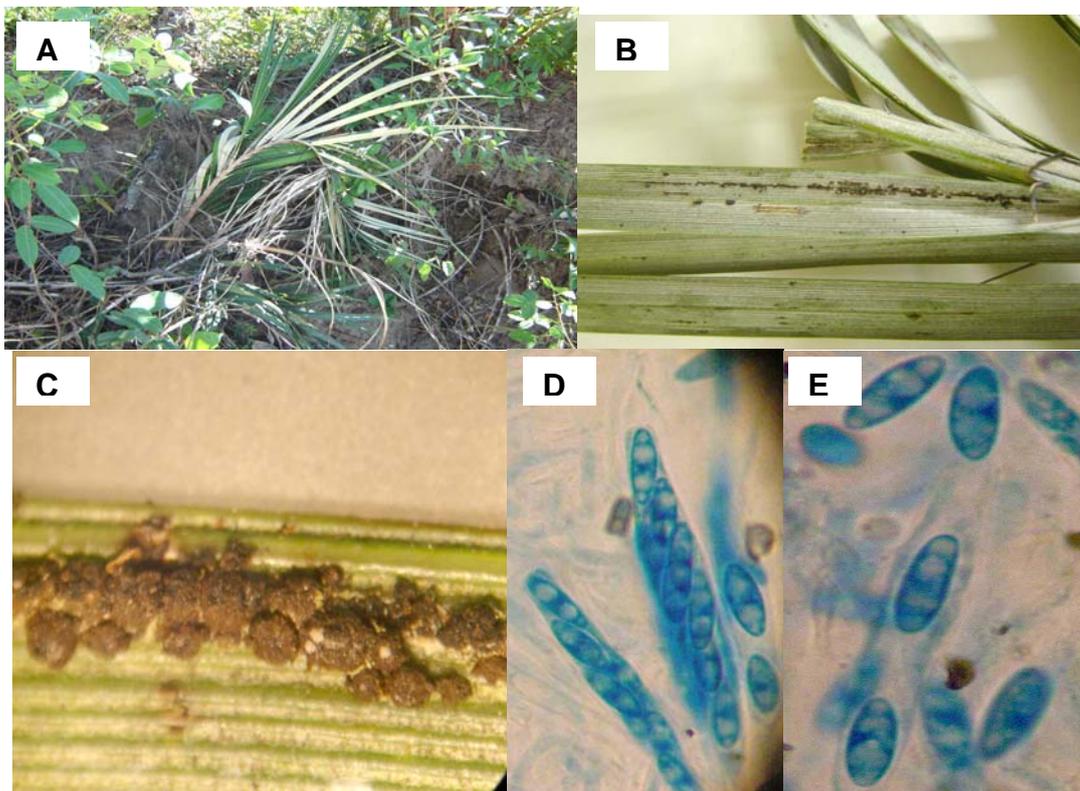


FIG. 15 – *Camarotella torrendiella* sobre *Bactris* sp. : A. O hospedeiro no seu habitat natural; B-C. Estromas ascígeros; D-E. Ascospores, paráfises e ascósporos.

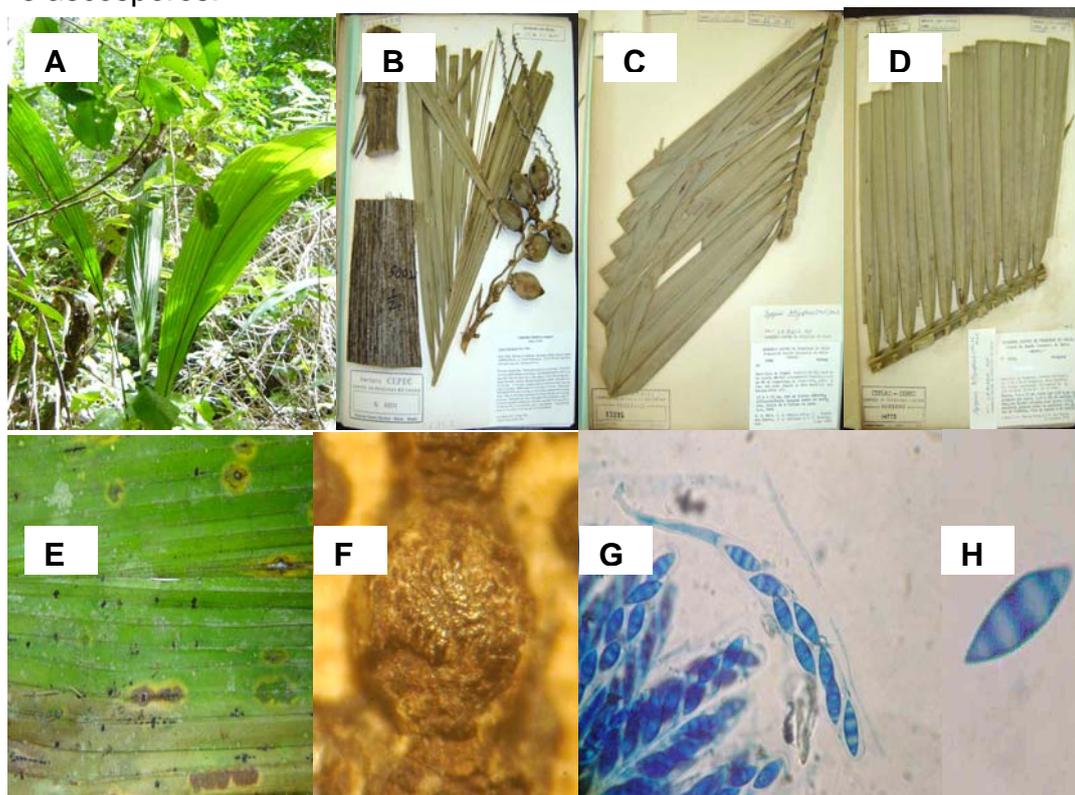


FIG. 16 – *Camarotella torrendiella* sobre *Syagrus botryophora*: A. O hospedeiro no seu habitat natural; B-D. Exsicatas nº63571,13275,14773; E-F. Estromas ascígeros; G. Ascospores, paráfises e ascósporos; H. Ascósporo gutulado.

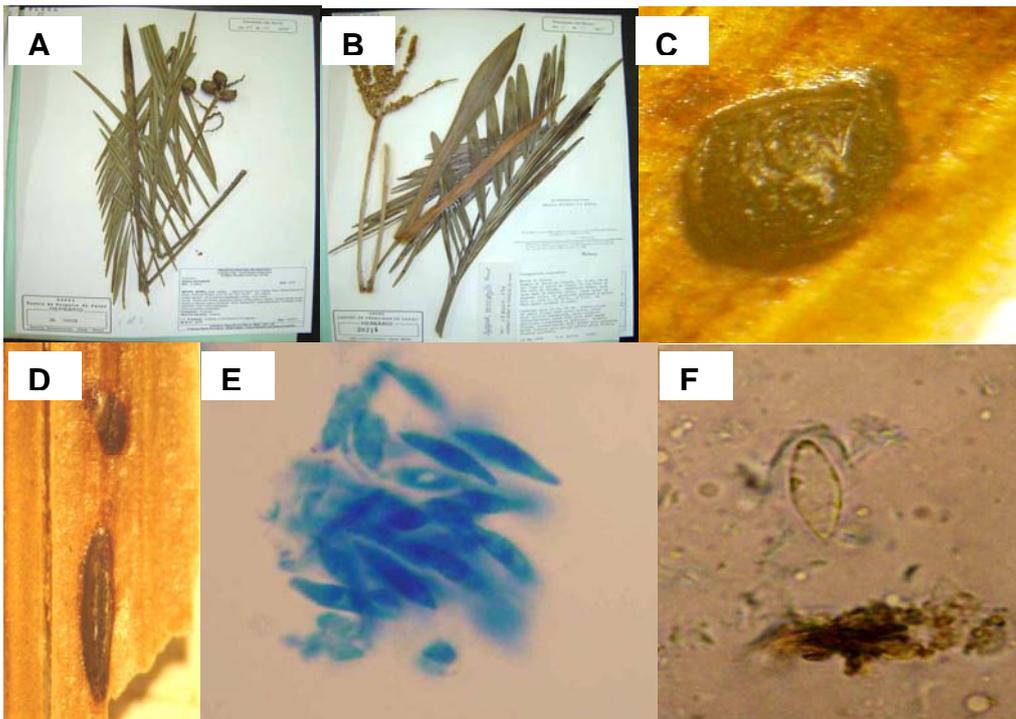


FIG. 17 – *Camarotella* cf. *torrendiella* sobre *Syagrus microphylla*: A-B. Exsicatas n°79839, 30714; C. Estroma ascífero; D. Estroma picnidial; E. Ascósporos; F. Ascósporo com bainha mucosa.

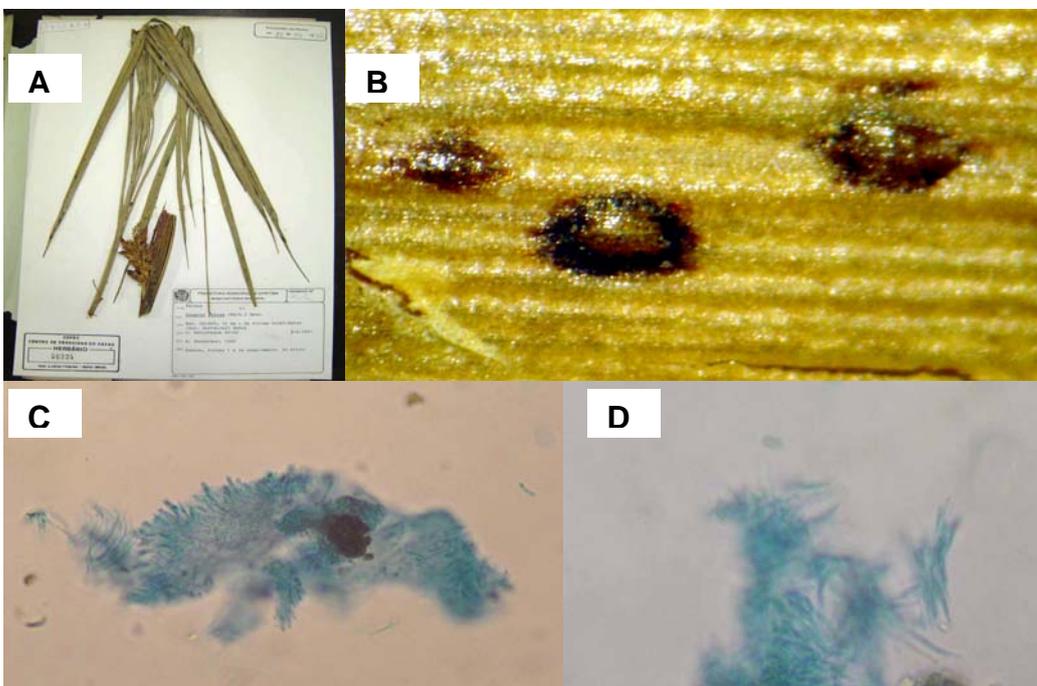


FIG. 18 – *Camarotella* cf. *Torrendiella* sobre *Syagrus petraea*: A. Exsicata n°56234; B. Estromas picnidiais; C. Picnidióforos; D. Conídios.

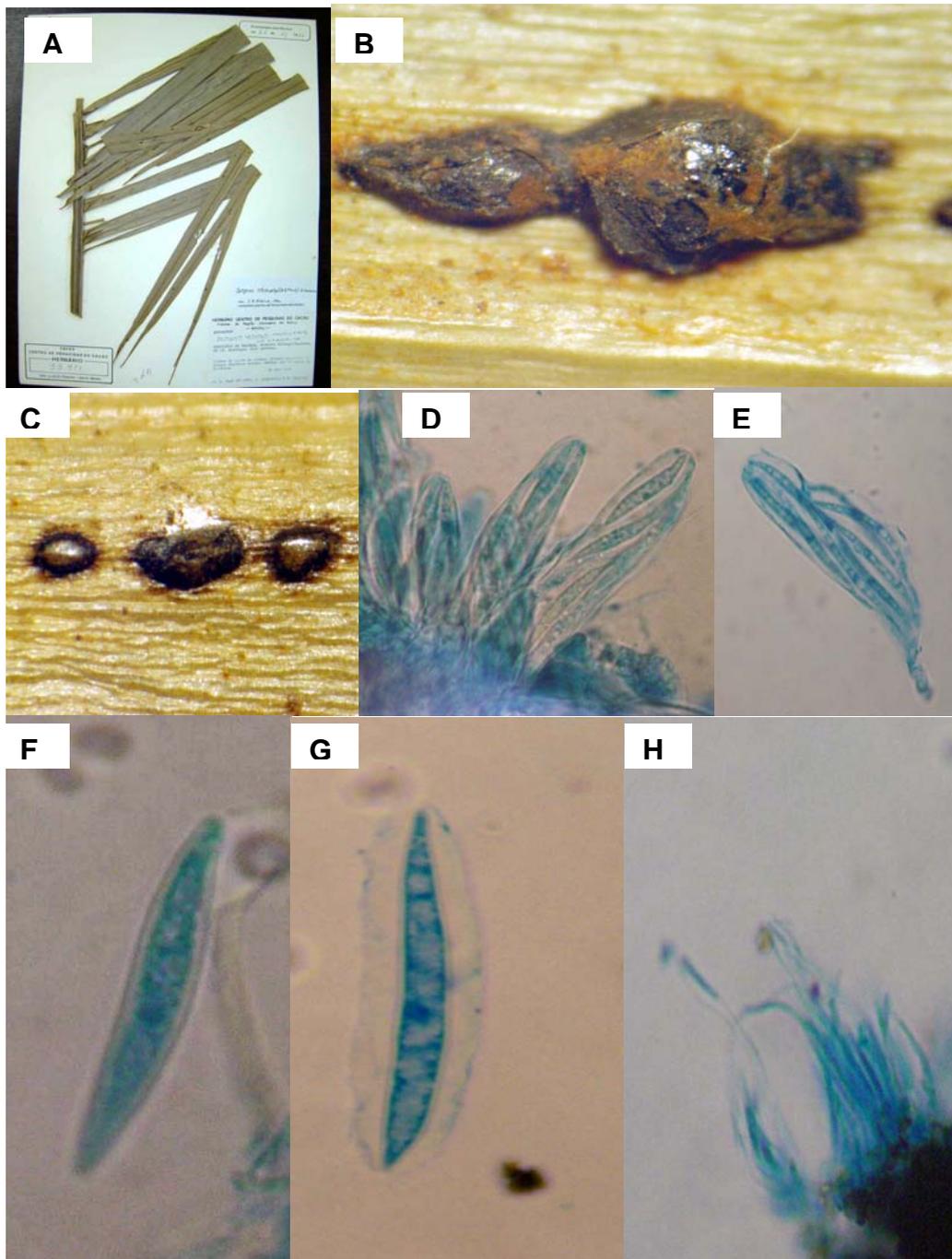


FIG. 19 – *Camarotella dianesii* Vitória & Bezerra spec. nov. sobre *Syagrus schizophylla*: A. Exsicata n°38317; B. Estroma ascífero; C. Estromas picnidiais; D-E. Ascospores; F. Ascospore; G. Ascospore com bainha mucosa. H. Picnidíóforos.

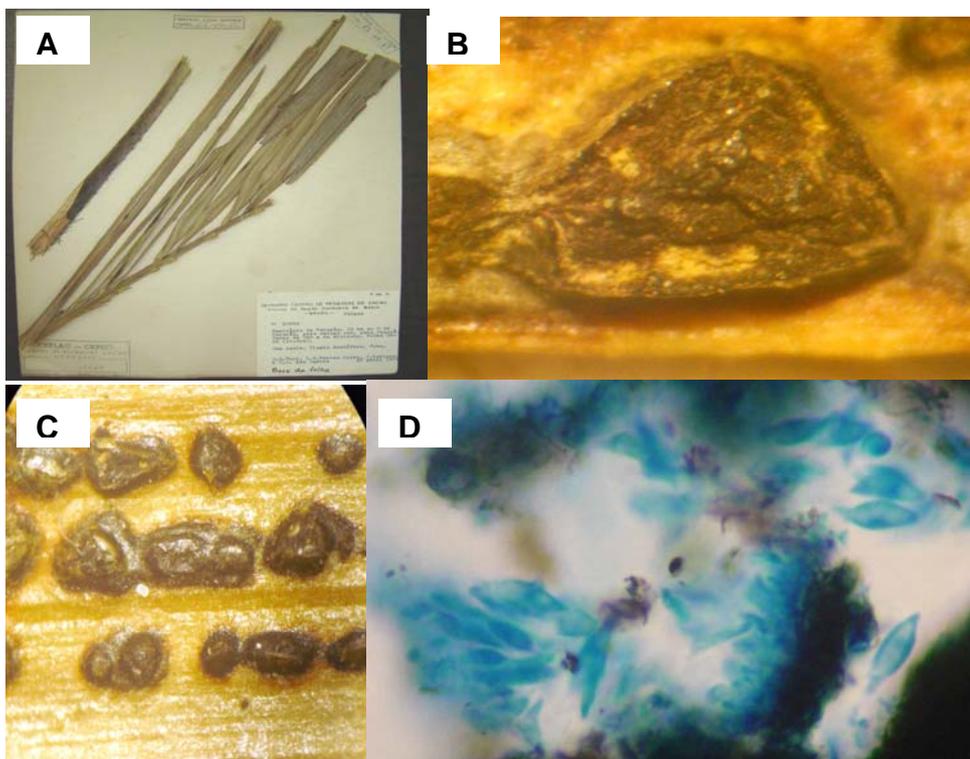


FIG. 20 – *Camarotella* cf. *torrendiella* sobre *Syagrus vagans*: A. Exsicata n°14439; B. Estroma peritecial; C. Estromas picnidiais; D. Ascósporos.

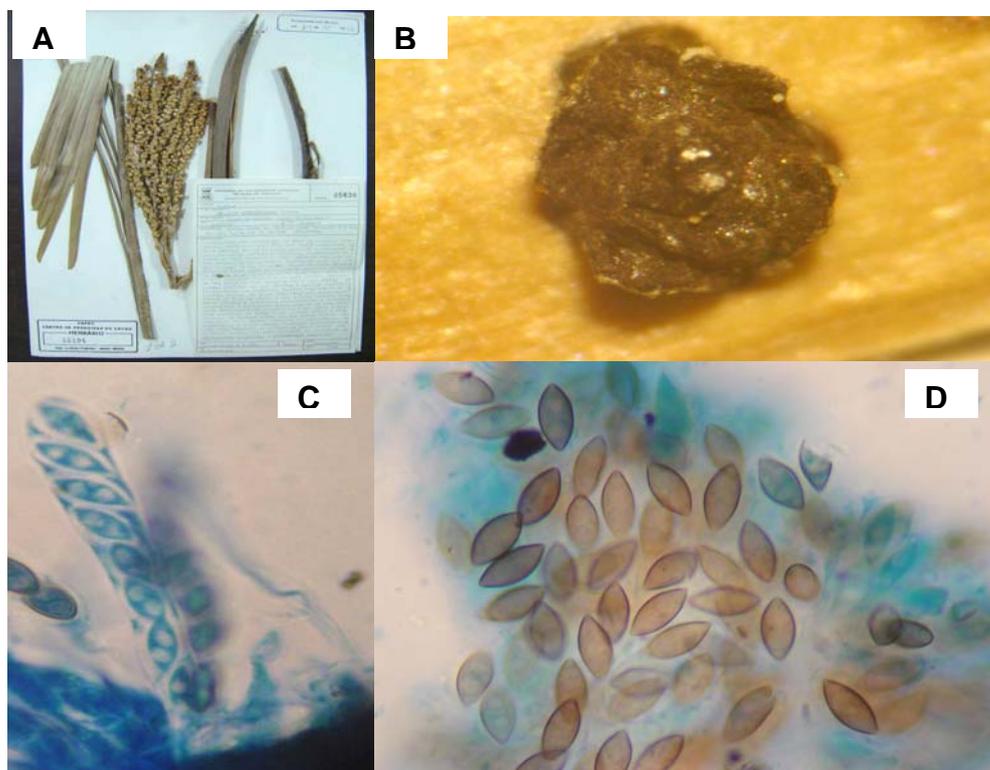


FIG. 21 – *Camarotella* cf. *torrendiella* sobre *Syagrus werdermannii*. A. Exsicata n°55194; B. Estroma peritecial; C. Asco e paráfise; D. Ascósporos.

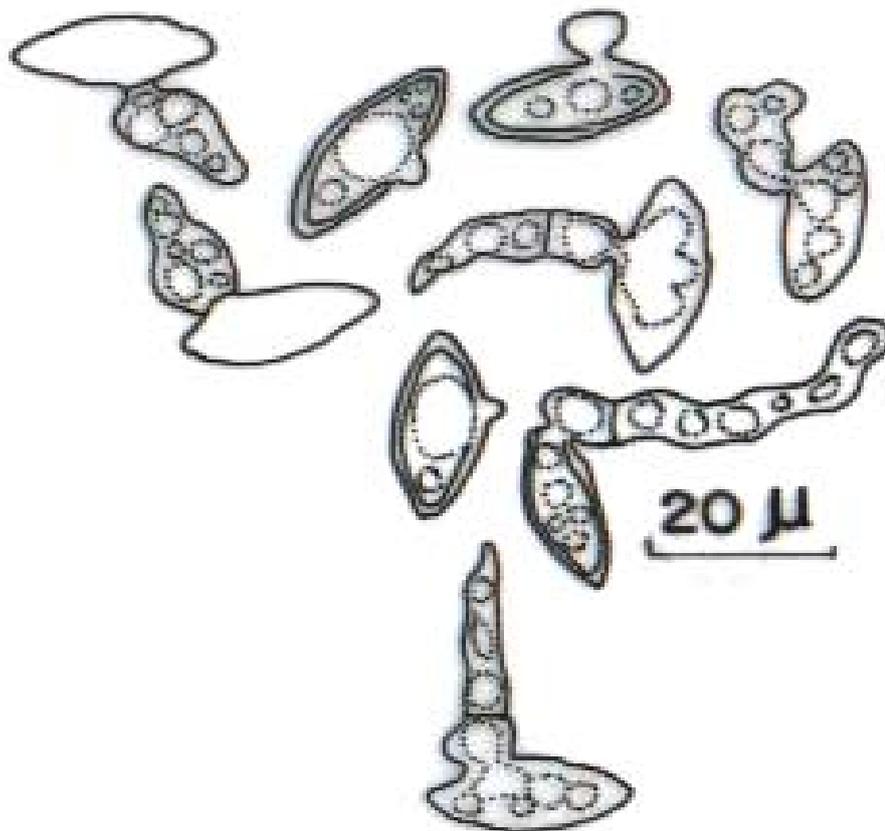


FIG. 22 – Desenho: Bezerra, J.L. Germinação dos ascósporos.

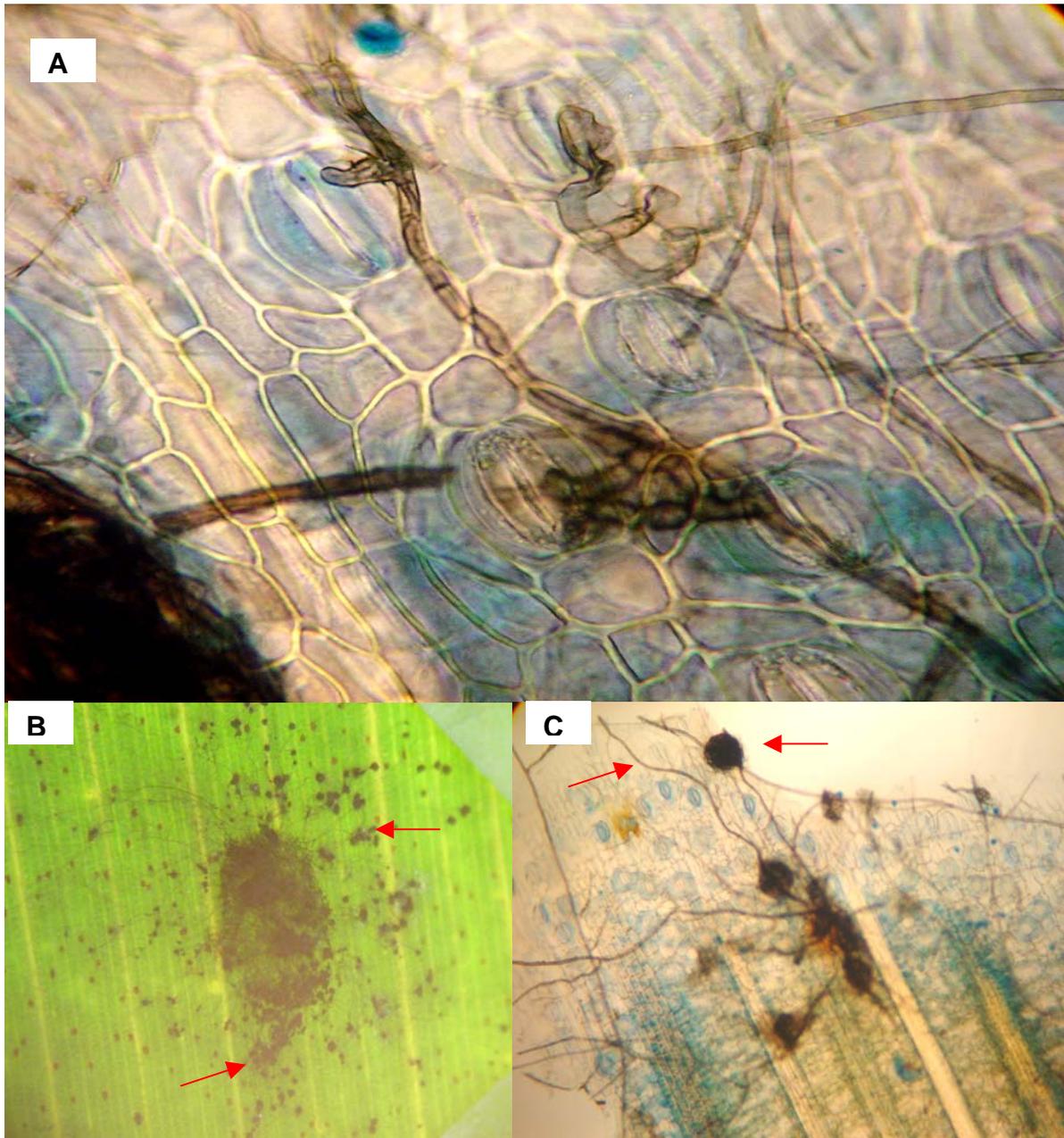


FIG. 23 – Modo de infecção de *C. torrendiella* em folíolos de coqueiro. A. Penetração de hifas através dos estômatos; B. Superfície do folíolo mostrando os pontos de infecção (setas); C. Formação de hifas e primórdios estromáticos (setas).

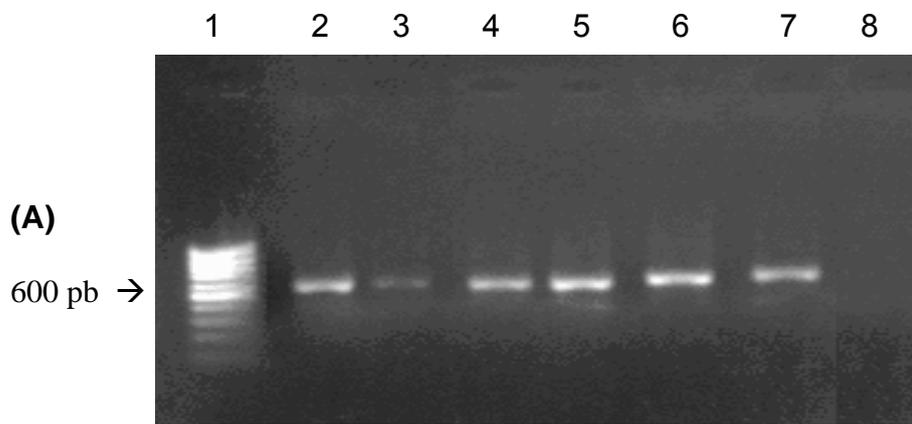


FIG 24 A. Isolados das espécies de *Camarotella* amplificados por NESTED PCR, utilizando primers ITS5/ITS4: Canaleta 1, ladder DNA 100 pb (Invitrogen-ladder); Canaleta 2, *C. torrendiella* de *Syagrus botryophora*; Canaleta 3, *C. torrendiella* de *Bactris* sp.; Canaletas 4-5, *C. torrendiella* de coqueiro; Canaleta 6, *C. acrocomiae* de coqueiro; Canaleta 7, *C. cf. torrendiella* de *Bactris ferruginea*; Canaleta 8, reação controle. Resolução foi em gel de agarose a 1,5% e o DNA visualizado com brometo de etídio.

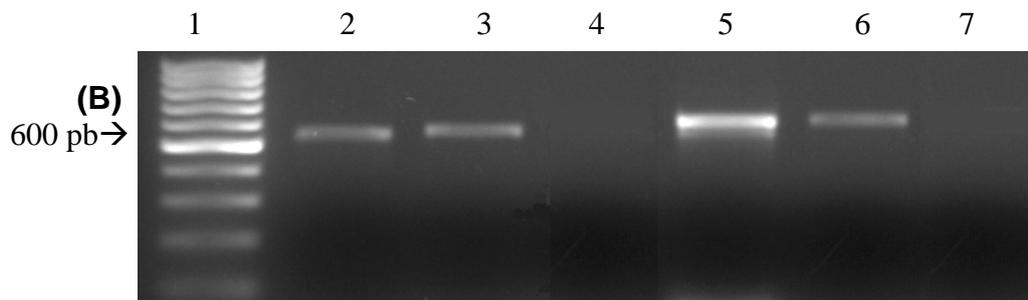


FIG. 24 B. Isolados das espécies de *Camarotella* amplificados por NESTED PCR, utilizando primers NS1/NS2 (Canaletas 2-4) e NS3/NS4 (Canaletas 5-7). Canaleta 1, ladder DNA 100 pb (Invitrogen-ladder); Canaleta 2, *C. torrendiella* de coqueiro; Canaleta 3, *C. acrocomiae* de coqueiro; Canaleta 4, reação controle; Canaleta 5, *C. torrendiella* de coqueiro; canaleta 6, *C. acrocomiae* de coqueiro; Canaleta 7, reação controle. Resolução foi em gel de agarose a 1,5% e o DNA visualizado com brometo de etídio.

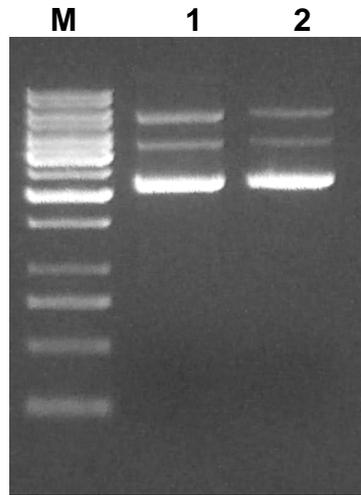


FIG. 25 – Mini-prep. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e fotografado sob luz UV: Visualização de plasmídeo extraído. 1. *Camarotella torrendiella* de coqueiro, 2. *C. acrocomiae* de coqueiro. M= marcador 100 pb (Ladder).

3.6 DISCUSSÃO

As lixas do coqueiro e outras palmeiras estão distribuídas, atualmente, em 12 estados brasileiros (J. L. Bezerra, dados não publicados). Entre as palmeiras nativas os gêneros *Acrocomia*, *Astrocaryum*, *Attalea*, *Bactris*, *Butia* e *Syagrus* parecem ser mais suscetíveis, haja vista a grande variedade de espécies encontradas com sintomas de lixas. Neste trabalho foi observado que dos gêneros citados, o *Syagrus* destaca-se como sendo o hospedeiro nativo mais comum de *C. torrendiella*.

Segundo Warwick (2003), as lixas pequena e grande são exclusivas de cada espécie de palmeira, não sendo encontrada nenhuma espécie colonizada pelas duas lixas. Contudo, a espécie *C. torrendiella*, aparentemente, é mais polífaga que *C. acrocomiae* e ambas as espécies podem parasitar o mesmo hospedeiro (*C. nucifera* e *A. funifera*). Este fato demonstra a pouca especificidade destes patógenos com relação ao hospedeiro.

As palmeiras nativas da América do Sul são hospedeiras nativas das espécies de *Camarotella* as quais infectaram o coqueiro após sua introdução no continente. A ausência de lixas nos coqueirais da Ásia e da África corrobora essa hipótese. Existiam dúvidas quanto à contaminação do coqueiro, pois até então não se sabia se a maioria das palmeiras nativas suscetíveis às lixas era do litoral ou do interior. Foi constatado, neste trabalho, que a espécie *C. torrendiella* é mais disseminada no país, apresentando maior gama de hospedeiros alternativos. A disseminação da lixa pequena para o coqueiro parece ter ocorrido no litoral, uma vez que muitas palmeiras nativas têm essa doença.

Na lixa-pequena, nos tecidos afetados, são formados inicialmente picnostromas (espermogônios) irregulares, que contêm picnidiósporos (espermácios) filiformes, hialinos, que não reproduzem a doença (Kimati et al., 2005). Na lixa-grande, também há formação de picnostromas que se assemelham aos da lixa-pequena.

As espécies *C. torrendiella* e *C. acrocomiae* são biotróficas e o crescimento em meio artificial é controverso, embora Oliveira et. al, (2004) tenham registrado seu cultivo *in vitro*, utilizando meio líquido completo. É possível

a obtenção de massa miceliogênica a partir da metodologia empregada por Oliveira e colaboradores, no entanto, não ficou provado que o micélio formado correspondia ao micélio de *P. torrendiella* ou *S. acrocomiae*. Neste trabalho, os testes das culturas axênicas foram todos negativos.

No campo, nota-se que os patógenos possuem grande facilidade de disseminação, pois normalmente não são encontrados nos coqueirais casos isolados de incidência da doença. Segundo Rezende & Moura (1995), sob condições artificiais, os estromas de *Camarotella torrendiella* de coqueiro desenvolvem-se somente quatro meses após as inoculações com ascósporos, indicando que este pode ser o período de incubação do fungo. Os testes de inoculação realizados nesse trabalho, além de confirmarem a hipótese de que apenas os ascósporos são infectivos, também revelam que o patógeno infecta o folíolo através de apressórios ligados aos estômatos e coloniza os tecidos epidérmicos da face abaxial dos folíolos, estromatizando-os, chegando também aos tecidos subjacentes.

Durante 143 anos (1856–1999), os patógenos causadores de lixas foram classificados e reclassificados continuamente, indicando a necessidade de revisar sua taxionomia o que hoje pode ser feito com o auxílio da biologia molecular.

Subileau et al. (1993) consideraram *Catacauma torrendiella* Bat. uma espécie distinta de *Dothidea acrocomiae* Mont. e *Auerswaldia rimosa* Speg., transferindo a espécie para o gênero *Phyllachora*, já que *Catacauma* é considerado um gênero sinônimo. Subileau e colaboradores consideraram que os dois espécimes listados na descrição de *Auerswaldia rimosa* (Balansa 3965 e 4068) pertenciam a espécies diferentes. O espécime nº 3965 foi escolhido para representar o tipo de *A. rimosa*, porque os ascósporos eram de cor marrom, enquanto que o espécime nº 4068 foi considerado indistinguível de *Catacauma torrendiella* com ascósporos hialinos mesmo no ascoma maduro. Eles então trataram o espécime Balansa 3965 como lectotipo de *Auerswaldia rimosa* e colocaram este binômio dentro da sinonímia *Dothidea acrocomiae*. A lectotipificação deles sobre *Auerswaldia rimosa* foi incorreta já que nenhum espécime individual de exsicata foi citado. Hyde & Cannon (1999) lectotipificaram corretamente o nome acima e não estão convencidos que as duas coleções de

Balansa representam espécies distintas, pois, segundo eles, outras características são mais ou menos idênticas. Outras coleções examinadas (exemplo, o material tipo de *Dothidea acrocomiae* e IMI 327694) também têm ascósporos hialinos e pode ser que os ascósporos escureçam quando maduros. Bezerra (dados não publicados) reexaminou o material tipo de *Auerswaldia rimosa* concordando com o ponto de vista de Subileau et al. (1993) e também o espécime IMI 327694 que é um típico *C. torrendiella*.

A extração de DNA é uma etapa fundamental para a aplicação de métodos moleculares e para tal, a origem do material é relevante (Bianciotto & Bonfante 1992). No caso das espécies *C. torrendiella* e *C. acrocomiae* as estruturas himeniais foram as únicas fontes utilizadas para extração de DNA, uma vez que não foi possível cultivar os patógenos em meio de cultura. Dentre as metodologias de extração de DNA testadas neste trabalho, o método CTAB modificado por Silva et al., (2003) embora funcione, é muito trabalhoso e pouco produtivo. Neste caso, para se obter uma extração de boa qualidade são necessários aproximadamente 40 a 50 frutificações de cada amostra. O método Walsh modificado por Saenz & Taylor (1999) e o método direto 1, adaptado para extrair o DNA a partir de um himênio ascógeno, utilizando o choque térmico, não foram apropriados para extração de DNA desses fitopatógenos, embora o método Walsh funcione para extração de DNA a partir de cleistotécios de *Erysiphales* segundo Saenz & Taylor (1999).

O método direto 2, otimizado para extrair o DNA a partir de um himênio ascógeno com um tampão de lise celular (*Cell Lysis Buffer*), do qual é geralmente empregado para extração de DNA bacteriano, mostrou-se adequado para a extração de *C. torrendiella* e *C. acrocomiae* de coqueiro, *Bactris* sp., *B. ferruginea* e *S. botryophora*, sendo sua utilização simples e prática, sem que houvesse a necessidade de maceração dos himênios do fungo. A baixa toxicidade da metodologia revelou-se bastante segura para o manipulador.

A otimização da metodologia de extração de DNA a partir de um único himênio ascógeno das espécies *C. torrendiella* e *C. acrocomiae* além de proporcionar a obtenção de DNA de boa qualidade e quantidade, também mostrou-se suficiente para o procedimento de clonagem e sequenciamento. Muito

embora com relação ao sequenciamento direto não tenha obtido sucesso, pois isto pode ser atribuído ao fato dos ascósporos sendo sexuais apresentarem, provavelmente, mais de uma cópia de gene, havendo a necessidade de se realizar a clonagem do fragmento.

Para fins de amplificação via PCR é possível utilizar métodos rápidos e simplificados, pois essa técnica requer quantidades mínimas de DNA e este não precisa apresentar alto grau de pureza, podendo ser extraído a partir de amostras de ambientes diversos, como himênios de ascomas (Saenz & Taylor, 1999, Glenn et al. 1988). A reação de NESTED-PCR modificada para amplificar fragmentos dos genes 18S, 5,8S, além das regiões ITS1 e ITS2 das espécies *C. torrendiella* e *C. acrocomiae* mostrou-se bastante apropriada. A reprodutibilidade da técnica foi excelente, podendo ser empregada para amplificação do DNA dessas espécies em coqueiro e em outras palmeiras. Estudos validativos são importantes para confirmar o potencial das ferramentas descritas.

4. CONCLUSÕES GERAIS

1. Uma nova combinação, *Camarotella torrendiella* (Batista) Bezerra & Vitória é proposta para designar o agente etiológico da lixa-pequena do coqueiro.
2. O agente da lixa-pequena do coqueiro, *C. torrendiella*, é diferente a nível de espécie, de *C. acrocomiae* que causa a lixa-grande do coqueiro.
3. *C. torrendiella* e *C. acrocomiae* não demonstram especificidade apenas quanto ao coqueiro.
4. *Attalea funifera* assim como *Cocos nucifera* são suscetíveis a *C. torrendiella* e *C. acrocomiae*.
5. A ocorrência da lixa-pequena do coqueiro no estado do Amazonas é um novo registro para a distribuição geográfica de *C. torrendiella*.
6. As palmeiras nativas *A. funifera*, *Bactris pickelli*, *Bactris* sp., *Syagrus botryophora*, *Syagrus microphylla*, *Syagrus petraea*, *Syagrus vagans*, *Syagrus werdermannii* são consideradas novas hospedeiras para *C. torrendiella*.
7. A espécie *C. torrendiella* tem a maior gama de hospedeiros dentre as espécies estudadas.

8. *C. torrendiella* é capaz de infectar a superfície abaxial dos folíolos do coqueiro penetrando através dos estomas.

9. As metodologias aperfeiçoadas para extração e amplificação de DNA das espécies do gênero *Camarotella* serão úteis no estudo de fungos patogênicos obrigatórios.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, M. S. M., SILVA, V. L., DIANESE, J. C., FERREIRA, M. A. S. V., SANTOS, C. E. N., NETO, E. G., URBEN, A. F., CASTRO, C. Fungos em plantas no Brasil. Brasília: Embrapa-Cenargen, p. 69 – 70, 1998.

v. ARX, J. A. von; MÜLLER, E. Die Gattungen der amerosporen Pyrenomycetem. Beitrage zur Kryptogamentflora der Schweiz, v. 11, n. 1, p. 214, 1954.

BATISTA, A. C. Principais doenças das plantas. Boletim S.A.I.C, Pernambuco, v. 13, n. 4, p. 227, 1946.

BATISTA, A. C. *Catacauma torrendiella* n. sp., agente da verrugose do coqueiro. Boletim S.A.I.C, Pernambuco, v. 15, n. 2, p. 129 – 133, 1948.

BEZERRA, J. L. Taxonomia dos fungos causadores da lixa no coqueiro. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 16, n. 2, p. 36, 1991.

BIANCIOTTO, V.; BONFANTE, P. Quantification of the nuclear DNA content of two arbuscular mycorrhizal fungi. Mycological Research, Cambridge, v. 96, n. 12, p. 1071 – 1076, 1992.

BRUNS, T. D.; VILGALYS, R.; BARNES, S. M.; GONZALES, D.; HIBBETT, D. S.; LANE, D.J.; SIMON, L. STICKEL, S.; SZARO, T. M.; WEISBURG, W. G.; SOGIN, M. L. Evolutionary relationships within the fungi: analysis of nuclear small subunit rRNA sequences. Molecular Phylogenetic Evolution, v.1, p. 231 – 241, 1992.

CANNON, P. F. A revision of *Phyllachora* and some similar genera on the host family Leguminosae. Mycological Papers, n. 163, p. 302, 1991.

GLENN, A. E.; RYKARD, D. M.; BACON, C. W.; HANLIN, R. T. Molecular characterization of *Myriogenospora atramentosa* and its occurrence on some new hosts. Mycological Research, v. 102, n. 4, p. 483 – 490, 1998.

GRAHAM, G. C; MEYERS, P. and HENRY, R. J. A. Simplified method for the preparation of fungal genomic DNA for PCR and RAPD analysis. BioTechniques, n. 16, p. 48 – 50, 1994.

HARNEY, S. K.; EDWARDS, F. S.; ALLEN, M. F. Identification of arbuscular mycorrhizal fungi from *Artemisia californica* using the polymerase chain reaction. Mycologia, v. 89, n. 4, p. 547 – 550, 1997.

HENNINGS, P. Fungi Africae Orientales. III. Engler's Botanisches Jahrbuch, v. 34, p. 39 – 57, 1904.

HENNINGS, P. Fungi austro-americi a P. Dusén collecti. Öfversigt af k. Vetenskapakademiens förhandlingar, v. 2, p. 317 – 320, 1900.

HENNINGS, P. Fungi. In Engler, H., Die Pflanzenwelt Ostafrikas und der Nachbargebiete, p. 30 – 61, 1895.

HÖHNEL, F. VON. Fragmente zur Mykologie (IX. Mitteilung, nr. 407 bis 467). Sitzungsberichte der Akademie der Wissenschaften in Wien Mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse, Abt. I, v. 118, p. 1461 – 1552, 1909.

HOLLIDAY, R. *Ustilago maydis*. In: Handbook of Genetics. Edited by R. C. King, New York: Plenum Press. v. 1, p. 575 – 595, 1974.

HYDE, K. D.; CANNON, P. F. Fungi causing tar spots on palms. Mycological Papers, n. 175, 114 p., 1999.

JOHNSTON, J. R.; BRUNER, S. C. A *Phyllachora* of the royal palm. Mycologia, n. 10, p.43, 1918.

KIMATI, H., AMORIM, L., REZENDE, J. A. M., BERGAMIN FILHO, A. & CAMARGO, L. E. A. Manual de Fitopatologia. Doenças das plantas cultivadas. In: MARIANO, R. L. R. & SILVEIRA, E. B. (Eds.) Doenças do coqueiro (*Cocos nucifera* L.). São Paulo. Ceres, v. 2, p. 271 – 274, 2005.

LORENZI, H. MOREIRA DE SOUZA, H., MEDEIROS COSTA, J. T., COELHO DE CERQUEIRA, L. S., FERREIRA, E. Palmeiras Brasileiras e Exóticas Cultivadas. São Paulo: Instituto plantarum, p. 33 – 416, ilustr., 2004.

MONTAGNE, J. P. F. C., *Sylloge generum specierumque Cryptogamarum*. p. 223, 1856.

MOREIRA, W. A.; WARWICK, D. R. N.; LIMA, M. F.; BARBOSA, F.R. Incidência da podridão seca em coqueiro irrigado no Vale do Sub-médio São Francisco. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 25, p. 349 – 350, 2000.

MOREIRA, W. A.; LEAL, E. C.; LIMA, M. F.; ASSIS, J. S.; TAVARES, S. C. C. H.; MOREIRA, A. N. Monitoramento de doenças na cultura do coqueiro. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 20 p., 2001.

NUCÉ DE LAMOTHE, M. Melhoramento do Coqueiro. Montpellier: Relatório da Missão Realizada nas plantações de Embrapa. IRHO, 1983.

OHLER, J.G. Modern Coconut Management: Palm cultivation and products. FAO. Universiteit Leiden, 1999.

OLIVEIRA, V. C.; LEAL, E. C.; COSTA, J. L. S. Registro do cultivo *in vitro* de *Phyllachora torrendiella* e *Sphaerodothis acrocomiae*, agentes causais das lixas do coqueiro. Fitopatologia. Brasileira, v. 29, n. 5, p. 571, 2004.

OLIVEIRA, D. P.; BEZERRA, J. L.; CARVALHO, A. R. Competição de fungicidas no controle da lixa do coqueiro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 9, p. 521 – 524, 1984.

PETRAK, F. Über Bagnisiopsis und verwandte Gattungen. *Hedwigia*, v. 68, p. 251 – 290, 1928.

PETRAK, F. Mykologische Notizen. XIII. Nos 851-930. *Annales Mycologici*, v. 38, n. 2/4 p. 245, 1940.

PLUNKETT. *Illinois Biological Monographs*, v. 8, n. 3, p. 176, 1923.

RAM, C. Epidemiologia e controle químico da queima-das-folhas (*Botryodiplodia theobromae*) do coqueiro (*Cocos nucifera* L.) em Sergipe. *Fitopatologia Brasileira*, p. 289 – 291, 1990.

REHM. *Hedwigia*, v. 36, p. 379, 1897.

REZENDE, M. L. V. M; MOURA, J. I. L. Epidemiologia e controle da lixa do coqueiro. Informe de pesquisas:CEPLAC, 1995.

RENARD, J. L. Repport mission defense des cultures au Brésil-cocotier, Paris: IRHO, 26 p., 1988.

RYAN, E. C. *American Journal Botanical*, v. 30, n. 10, p. 784–799, 1943. 1943.

SACCARDO, P. A. *Sylloge Fungorum* (Abellini), v. 2, p. 606, 1883.

SAENZ, G. S.; TAYLOR, J. W. Phylogeny of the Erysiphales (powdery mildews) inferred from internal transcribed spacer ribosomal DNA sequences. *Canadian Journal of Botany*, v. 77, p. 150 – 168, 1999.

SANCHEZ, M.; SOUZA, C. A. P.; DIANESE, J. C. Uma nova espécie de *Camatotella* sobre folhas de *Syagrus schysophylla*. *Fitopatologia Brasileira*. Brasília, v. 28 S. p. 224 – 224, 2003.

SHEAR, C. L. *Sphaerodothis*, a new genus of dothidiaceous fungi. *Mycologia*, v. 1, n. 4, p. 162, 1909.

SILVA, D. W.; NETO, E. R.; HANLIN, R. Molecular systematics of the Phyllachorales (Ascomycota, fungi) based on 18S ribosomal DNA sequences. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 46, n. 3 p. 315 – 322, 2003.

SPEGAZZINI, C. L. Fungi Guaranitici. Pugillus [nos 268 - 315]. *Anales de la sociedad científica de Argentina*, v. 19, p. 241 – 265, 1885.

SPEGAZZINI, C. L. Fungi Guaranitici II. *Anales de la sociedad científica de Argentina*, v. 27, p. 38, 1888.

SPEGAZZINI, C. L. Mycetes Argentinenses series IV. *Anales del museo nacional de Buenos Aires*, v. 19, p. 257 – 458, 1909.

STEVENS, F. L. Parasitic fungi from British Guiana and Trinidad. *Illinois Biological Monographs*, v. 8, p. 171 – 242, 1923.

SUBILEAU, C.; RENARD, J. L.; DENNETIERE, B. *Phyllachora torrendiella* (Batista) comb. nov. responsable de la maladie verruqueuse du cocotier. *Mycotaxon*, v. 49, p.175 – 185, 1993.

SUDO, S.; OLIVEIRA, G. H. W.; VITALIS, W.; CAVALCANTE, E. B. Controle biológico de *Catacauma torrendiella* e *Coccostroma palmicola*, agentes da lixa do coqueiro. *Fitopatologia. Brasileira*, v.13, n. 2, p.112, 1988.

THEISSEN, F.; SYDOW, H. Die Dothideales. *Annales Mycologici*, v. 13, n. 3/4, p. 370, 1915.

VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Eds) Controle de Doenças de Plantas: Grandes Culturas. Viçosa, UFV, V. 2, p. 778 – 781, 1997.

WALSH, P. S., METZGER, D. A.; HIGUCHI, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* n. 10, p. 506 – 513, 1991.

WARWICK, D. R. N.; LEAL, E. C. Avaliação de fungos hiperparasitas para o controle biológico das lixas do coqueiro. In: Simpósio de controle biológico, 4., Gramado, RS, 1994. Anais: Sessão de posteres, Pelotas-RS, p. 64, 1994.

WARWICK, D. R. N.; LEAL, E. C.; RAM, C. Doenças do coqueiro. In: FERREIRA, J.M.S.; WARWICK, D.R.N.; SIQUEIRA, L.A. (Ed.). A cultura do coqueiro no Brasil. Brasília: Embrapa-SPI, p.269 – 292, 1997.

WARWICK, D. R. N. & LEAL, E. C. Occurrence of Coconut “lixas” in Brazilian Native Palms in the Northeastern Coastal Plain. *Palms*, v. 44, p. 9 – 13, 2000.

WARWICK, D. R. N. Principais doenças do coqueiro (*Cocos nucifera* L.) no Brasil. Aracajú: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 33 p., 2001.

WARWICK, D. R. N. Retrospectiva de 16 anos de pesquisa de doenças foliares do coqueiro. Aracajú, 29 abr. 2003. Disponível em: <<http://www.cpatc.embrapa.br>>. Acesso em: 27 set. 2006.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A.; Gelfand, D. H.; Sninsky, J. J. and White, T. J. (eds). PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications Academic Press, New York, p. 315 – 322, 1990.