

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA FLORESTAL

**ETIOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DA SÍNDROME DA MORTE
DESCENDENTE EM CUPUAÇUZEIRO (*Theobroma grandiflorum*) NO
SUDOESTE DA AMAZÔNIA.**

ROGER DANIEL RECCO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

RIO BRANCO-AC, BRASIL
JANEIRO DE 2026

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA FLORESTAL

**ETIOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DA SÍNDROME DA MORTE
DESCENDENTE EM CUPUAÇUZEIRO (*Theobroma grandiflorum*) NO
SUDOESTE DA AMAZÔNIA.**

ROGER DANIEL RECCO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal da Universidade Federal do Acre, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

I. Orientador: Prof. Dr. Nei Sebastião Braga Gomes

II. Co-orientador: Dr. Rivaldalve Coelho Gonçalves

RIO BRANCO-AC, BRASIL

JANEIRO DE 2026



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
Pró-reitora de Pesquisa e Pós-Graduação/
Centro de Ciências Biológicas e da Natureza
Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal-PPG/Ciflor

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE DISCENTE ROGER DANIEL RECCO, DO PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO, STRICTO SENSU, EM CIÊNCIA FLORESTAL, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE.

Às sete horas e trinta minutos do dia trinta do mês de janeiro de 2026, realizou-se de forma online por meio da Plataforma Google Meet, a Defesa de Dissertação, intitulada: **“Etiologia e distribuição espacial da síndrome da morte descendente em cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) no sudoeste da Amazônia”**, de autoria do mestrando **Roger Daniel Recco**, discente do Programa de Pós - graduação em Ciência Florestal, da Universidade Federal do Acre - UFAC, em nível de Mestrado. Na ocasião, a Banca Examinadora foi constituída pelos membros: **Prof. Dr. Nei Sebastião Braga Gomes (Presidente - Orientador - CCBN - UFAC)**, **Pesq. Dr. Celso Garcia Auer (Membro externo - Embrapa Florestas)**, **Prof. Dr. Lucas Graciolli Savian (Membro externo - UFSM - RS)**. Logo após a exposição oral, houve arguição pelos Examinadores e, ao final da arguição, reaberta a sessão pública, o discente foi considerado APROVADO pela Banca Examinadora. E ao final, foi lavrada a presente Ata, que será assinada pelos avaliadores.

Documento assinado digitalmente
 **NEI SEBASTIAO BRAGA GOMES**
Data: 30/01/2026 13:13:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Nei Sebastião Braga Gomes
(Presidente - Orientador - CCBN - UFAC)

Documento assinado digitalmente
 **CELSO GARCIA AUER**
Data: 30/01/2026 14:49:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Pesq. Dr. Celso Garcia Auer
(Membro externo - Embrapa Florestas)

Documento assinado digitalmente
 **LUCAS GRACIOLLI SAVIAN**
Data: 30/01/2026 15:20:19-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Lucas Graciolli Savian
(Membro externo - UFSM - RS)

- R295e Recco, Roger Daniel, 1973 -
Etiologia e distribuição espacial da Síndrome da Morte descendente em cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) no sudoeste da Amazônia / Roger Daniel Recco; orientador: Prof. Dr. Nei Sebastião Braga Gomes, coorientador: Dr. Rivaldalve Coelho Gonçalves. – 2026.
97 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-graduação em Ciência Florestal. Rio Branco, 2026.
Inclui referências bibliográficas.
1. Sistemas agroflorestais. 2. Cupuaçu – Doenças e pragas I. Gomes, Nei Sebastião Braga (orientador). II. Gonçalves, Rivaldalve Coelho (coorientador). III. Título.

CDD: 634

Bibliotecária: Alanna Santos Figueiredo – CRB 11º/1003.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

RECCO, R. D. (1973). Etiologia e distribuição espacial da síndrome da morte descendente em cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) no sudoeste da Amazônia. Dissertação de Mestrado em Ciência Florestal. Programa de Pós-graduação em Ciência Florestal, Universidade Federal do Acre, Rio Branco-AC, 100 p. (Inclui ilustrações, apêndices e referências bibliográficas).

CESSÃO DE DIREITOS

AUTOR: Roger Daniel Recco

GRAU: Mestre

Concedo à Universidade Federal do Acre - UFAC permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestá-las somente para propósitos acadêmicos e científicos. Reservo outros direitos de publicação, de forma que nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem minha autorização por escrito.

Roger Daniel Recco

Endereço eletrônico: reccoroger@gmail.com

Dedico este trabalho a Deus e à minha família, que me dão forças e coragem para atingir os meus objetivos e, a todos (as) que, de diferentes formas e maneiras, me ajudaram e torceram por mim.

Agradecimentos

Acima de tudo, agradeço a Deus pela vida, pela força e pela fé que me sustentaram nos momentos de maior desafio, permitindo-me alcançar este objetivo.

Aos meus familiares e amigos, pelo incentivo e paciência durante o período de dedicação à dissertação.

À minha esposa, Déborah, por sua paciência, compreensão e pelo apoio incondicional que se manifestou em cada sacrifício, incentivo e motivação para cruzar a linha de chegada desta.

Aos meus orientadores, o Prof. Dr. Nei Sebastião Braga Gomes e o Pesquisador Dr. Rivaldo Coelho Gonçalves, pelo inestimável apoio científico e acompanhamento dedicado. Sua confiança e a oportunidade concedida para a realização deste trabalho foram cruciais para esta conquista."

Expresso minha imensa gratidão ao Pós-Doutor Lucas Gracioli Savian por compartilhar seu vasto conhecimento e por dedicar tempo à revisão crítica de partes deste manuscrito, contribuindo significativamente para sua concretização.

Aos colegas da SEAGRI, Marcos Rocha, Josicley Azevedo e Suhelen Alves, pelo suporte técnico profissional com os estudos deste mestrado.

Ao Eduardo Maia, acadêmico de Engenharia Florestal e bolsista PIBIC, cujo esforço foi incansável. Seu domínio das técnicas laboratoriais e o zelo com que executou as análises contribuíram diretamente para a qualidade e a confiabilidade dos resultados apresentados nesta dissertação."

Manifesto minha sincera gratidão ao Projeto RECA, na pessoa de seu representante, Hamilton Condack. Meu agradecimento se estende a toda a equipe técnica e aos estagiários (as) envolvidos (as). Um agradecimento especial às famílias dos (as) produtores (as) rurais participantes desta pesquisa: Sergio Lopes, Marcelo Santana, Janielle e Alex Berkembrock, Hamilton Condack, Vilmar Biavatti e Gilberto Berger, cuja generosidade e disposição em compartilhar suas experiências foram a matéria-prima essencial para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal do Acre (UFAC), pelo apoio e cessão do Laboratório de Fitopatologia para a realização de parte da pesquisa e, especialmente ao Curso de Pós-graduação em Ciência Florestal (CIFLOR), pela oportunidade.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa-Acre), Unidade CPAF-AC, por disponibilizar sua estrutura física e humana para o desenvolvimento deste estudo.

À Secretaria de Estado da Agricultura (SEAGRI), em nome do Secretário José Luís Schaffer, por entender a importância da pesquisa e formação de capital humano, pelo apoio logístico, estrutural, técnico e financeiro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo.

Aos colegas da segunda turma do mestrado CIFLOR/2023, pelos momentos de aprendizado que compartilhamos juntos.

A todos (as) que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001"

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADEF - Análise da Dinâmica e Estrutura de Focos
BDA - Batata-dextrose-água
BSC – Biological Species Concept
 β -tubulina - Betatubulina
CAL - Calmodulina
CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CIFLOR – Ciências Florestais
CVC - Clorose variegada dos citros
CPAF-Acre - Centro de Pesquisa Agroflorestal do Acre
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESC – Evolutionary Species Concept
I – Incidência
ICF - Índice de Compactação do Foco
d.NTPS - Desoxinucleotídeos Trifosfatos
ID - Índice de dispersão
IFF - Índice de Forma de Foco
ITS - Internal Transcribed Spacer
LSU - Large Subunit
MSC – Morphological Species Concept
NCBI - National Center of Biotechnological Information
NF - Número de Focos
NFU - Números de Focos Unitários
NPF - Número de Plantas por Foco
PCR - Polymerase Chain Reaction
PIBIC - Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica
PSC – Phylogenetic Species Concept
rDNA – DNA Recombinante
RECA – Reflorestamento Consorciado Adensado
RNA - Ácido Ribonucleico
RNA Ribossômico
RPB2 - Subunidade da RNA Polimerase II
SAF – Sistema Agroflorestal
SEAGRI/AC – Secretaria de Estado da Agricultura do Acre
SMD – Síndrome da Morte Descendente
TEF1- α - Translation-elongation factor EF-1 α
UFAC – Universidade Federal do Acre
UFP – Unidade Produtiva Familiar

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Área de estudo no distrito de Nova Califórnia, município de Porto Velho, Rondônia.

Figura 02. Fotografias das áreas com Sistemas Agroflorestais contendo cupuaçu, onde foram coletadas as amostras.

Figura 03. Planta de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*): doente (A), cancro em tronco e galho (B, D), podridão nas raízes (C) e amarelecimento e necrose em folhas (E).

Figura 04. Fragmentos de planta de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*): (A) disposição dos fragmentos nas placas de Petri e repetições e isolado purificado (B).

Figura 05. Teste de patogenicidade: Preparo do inóculo em palito e disco (A), inoculação com disco no caule da planta (demonstração sem inserção em V invertido) (B), mudas de cupuaçu com 12 meses (C), câmara úmida em planta inoculada (D) e inoculação com palito em folha de cupuaçu (E).

Figura 06. Mapas da distribuição espacial de plantas doentes nas áreas de estudo.

Figura 07. Mapas da Distribuição Espacial dos Focos (NFU e NFNU).

Figura 08. Dendrograma filogenético baseado na região ITS, construído a partir das sequências obtidas neste estudo. Uma sequência de *Saccharomyces pastorianus* foi utilizada como outgroup.

Figura 09. Dendrograma filogenético baseado no método *Neighbour-Joining* utilizando sequências das regiões β -tubulina e RPB2, obtido a partir de 1.000 réplicas de *bootstrap*. Os números nos ramos representam os valores de *bootstrap* variando de 0 a 1, em que valores próximos de 1 indicam forte suporte estatístico para os agrupamentos. *Neodeightonia phoenicum* foi utilizada como outgroup.

Figura 10. Dendrograma filogenético baseado no método *Neighbour-Joining* a partir de sequências da região *calmodulina* de isolados de *Lasiodiplodia*, com base em 1.000 réplicas de *bootstrap*. Os valores nos nós representam o suporte de *bootstrap* (0–1), sendo valores próximos de 1 indicativo de forte suporte estatístico para os agrupamentos. Uma sequência de *Macrophomina phaseolina* foi utilizada como outgroup.

Figura 11. Dendrograma filogenético baseado no método *Neighbour-Joining* a partir de sequências concatenadas da região *calmodulina* (*cmdA*) β -tubulina e RPB2 de isolados de *Fusarium* spp., com base em 1.000 réplicas de *bootstrap*. Os valores nos representam o suporte de *bootstrap* (0–1), sendo valores próximos de 1 indicativo de forte suporte estatístico para os agrupamentos. Uma sequência de *Fusarium oxysporum* foi utilizada como outgroup.

Figura 12. Reverso das colônias de isolados com as mensurações efetuadas para (1) *Colletotrichum* sp., (2) *Diaporthe* sp., (3) *Dwiroopa* sp., (4) *Fusarium* sp., (5) *Lasiodiplodia* sp., (6) *Nectria* sp., (7) *Neopestalotiopsis* sp., (8) *Neurospora* sp., (9) *Nigrospora* sp. e (10) *Calonectria* sp.

Figura 13. Verso e Reverso das colônias de isolados aos 11 dias de crescimento (1) *Colletotrichum* sp , (2) *Diaporthe* sp, (3) *Dwiroopa* sp, (4) *Fusarium* sp, (5) *Lasiodiplodia* sp, (6) *Nectria* sp (7) *Neopestalotiopsis* sp, (8) *Neurospora* sp. (9) *Nigrospora* sp. e (10) *Calonectria* sp.

Figura 14. Reisolamento do gênero *Calonectria* sp.: A, F) necrose presente na folha de 12 plantas aos 30 dias; B) reisolado da folha aos 30 dias; C) folhas saudias; D) reisolado do cancro; E) cancro aos 60 dias; F) Patógeno inoculado na folha e caule.

Figura 15. Reisolamento do gênero *Lasiodiplodia* sp.: A) cancos presentes no caule das 16 plantas aos 75 dias e lesões escurecidas no lenho; B, F, G) lesão interna ocasionada pelo patógeno aos 75 dias; C, D) reisolado (verso e reverso) de *Lasiodiplodia* sp. inoculado nas plantas aos 75 dias E) isolado (verso e reverso) de *Lasiodiplodia* sp. inoculado nas plantas saudias.

Figura 16. Reisolamento do gênero *Fusarium* sp.: A) cancos presentes no caule das 16 plantas aos 60 dias e lesões escurecidas no lenho; B) lesão central interna ocasionada pelo patógeno aos 75 dias em toda a extensão do caule; C) apodrecimento do colo das plantas aos 75 dias D) lesão interna e podridão das raízes; E) cancro a 23 cm do colo e lesão a 10 cm da inoculação; F) isolado inoculado na planta sadia; G) reisolamento do cancro, lesão interna e podridão do colo e raízes e H) laminas com hifas e microconídios observados dos reisolados.

Figura 17. Planta Testemunha: A) 16 plantas aos 75 dias; B) cicatrização da inoculação; C) lenho interno sadio; D) corte sadio no local da cicatrização; E) folhas, lenho e raízes saudias das 16 plantas aos 75 dias.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01. Gráfico representa os valores de frequência (%) por área estudada para o padrão espacial da doença nas linhas de plantio para o teste Run.

Gráfico 02. Gráfico representa os valores de frequência (%) por área estudada para o padrão espacial da doença nas linhas de plantio para o teste Doublet.

Gráfico 03. Média de Runs e Doublets observados e esperados.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Codificação e localização das áreas de estudo por Unidade Produtiva Familiar.

Tabela 02. Plantas doentes por linha na área de estudo.

Tabela 03. Gradil da população amostral de plantas saudias, doentes e ausentes, por linha e área de estudo.

Tabela 04. Grid experimental do teste para 11 tratamentos em DBC.

Tabela 05. Incidência de plantas doentes encontradas nas seis áreas de estudo.

Tabela 06. Valores do ID e padrão de distribuição espacial.

Tabela 07. Dinâmica e Estrutura de Focos (Áreas de I a VI).

Tabela 08. Orientação espacial e direcionamento do crescimento dos focos.

Tabela 09. Padrão Espacial da Doença pela Análise de Run.

Tabela 10. Padrão Espacial da Doença pela Análise de Doublet.

Tabela 11. Velocidade de Crescimento para 10 gêneros de isolados associados a patogenicidade da SMD (PAT: Patógeno).

Tabela 12. Resultados do Teste de Patogenicidade para os 10 gêneros inoculados.

RESUMO

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) é uma árvore frutífera tropical nativa da Amazônia. A presença de doenças em pomares de cupuaçu que causam danos à produção e prejuízos socioeconômicos tem afetado significativamente a vida dos (as) produtores (as) rurais. Estudar a etiologia e a distribuição espacial da Síndrome da Morte Descendente (SMD) é relevante para a adoção de medidas de controle efetiva no manejo integrado de doenças. A hipótese de que plantas de cupuaçu com SMD em plantios de cupuaçu, no Projeto RECA, podem ou não estar infectadas com fungos fitopatogênicos e que, a distribuição espacial é agregada, foram testadas neste trabalho. A incidência e distribuição espacial da SMD foram estudadas a partir de dados coletados diretamente planta a planta em uma população de 1630 indivíduos. O padrão espacial da doença nas linhas das parcelas foi estudado com a análise de Run e de Doublet e, nas parcelas inteiras pelo método de quadrat, com o cálculo do Índice de Dispersão (ID) e Análise da Dinâmica e Estrutura de Foco (ADEF), utilizados para testar a hipótese de padrão espacial aleatório. Os fungos isolados em meio de cultura foram selecionados por morfologia e aqueles provenientes de 30 plantas doentes nas seis áreas amostradas foram identificados pela caracterização das sequências de rDNA incluindo as regiões ITS1 - 5.8S, β -tubulina, RPB2 e Calmodulina. A incidência da doença da SMD variou entre as áreas estudadas e a média foi de 49%. O padrão espacial predominante nas parcelas foi o agregado, com variabilidade nos parâmetros da ADEF. Em linhas, a distribuição espacial foi ao acaso. Os fungos fitopatogênicos associados a SMD foram identificados em 10 gêneros diferentes, sendo que, *Calonectria* sp, *Fusarium* sp e *Lasioidiplodia* sp, induziram cancos e lesões escuras nos tecidos lenhosos.

Palavras-chave: Avaliação de doenças. Sistemas Agroflorestais. Seca dos ramos. Identificação de fungos. Região Amazônica.

ABSTRACT

Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) is a tropical fruit tree native to the Amazon. The presence of diseases in cupuaçu orchards, causing damage to production and socioeconomic losses, has significantly affected the lives of rural producers. Studying the etiology and spatial distribution of Dieback Syndrome (DSS) is relevant for the adoption of effective control measures in integrated disease management. The hypothesis that cupuaçu plants with DSS in cupuaçu plantations in the RECA Project may or may not be infected with phytopathogenic fungi, and that the spatial distribution is aggregated, was tested in this work. The incidence and spatial distribution of DSS were studied from data collected directly plant by plant in a population of 1630 individuals. The spatial pattern of the disease in the plot rows was studied using Run and Doublet analysis, and in the entire plots using the quadrat method, with the calculation of the Dispersion Index (DI) and Focus Dynamics and Structure Analysis (FDES), used to test the hypothesis of a random spatial pattern. Fungi isolated in culture medium were selected by morphology, and those from 30 diseased plants in the six sampled areas were identified by characterization of rDNA sequences, including the ITS1 - 5.8S, β -tubulin, RPB2, and Calmodulin regions. The incidence of DSS disease varied among the studied areas, with an average of 49%. The predominant spatial pattern in the plots was aggregated, with variability in FDES parameters. In rows, the spatial distribution was random. Phytopathogenic fungi associated with SMD were identified in 10 different genera, with *Calonectria* sp., *Fusarium* sp., and *Lasiodiplodia* sp. inducing cankers and dark lesions in woody tissues. Further research is needed to identify these fungi at the species level, evaluate their pathogenicity in plants subject to abiotic diseases, develop control methods for DSS, and conduct large-scale surveys.

Key words: Disease assessment. Agroforestry systems. Branch dieback. Fungal identification. Amazon region.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

Introdução.....	1
Revisão de Literatura.....	2
Materiais e Métodos.....	11
Área de Estudo.....	11
Sintomatologia e Coleta de Dados.....	15
Resultados e Discussão.....	31
Considerações Finais.....	66
Conclusões.....	70
Referências Bibliográficas.....	71

1. Introdução

O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd. Spreng.) K. Schumann) é uma árvore frutífera da família Malvaceae, originária do sul e sudeste da Amazônia, sendo que no Brasil, ocorre principalmente nos estados do Pará, Amazonas, Rondônia e Acre (Santos, 2019). A produção de cupuaçu no Brasil foi de 21.240 toneladas em 13.504 hectares plantados (IBGE, 2017). A Bahia é o maior produtor, seguido por Amazonas, Pará, Rondônia, Amapá, Mato Grosso, Roraima, Goiás, Pernambuco, Tocantins, Acre, Maranhão e Rio de Janeiro (Costa *et al.*, 2022 e IBGE, 2017).

A produção de frutos de cupuaçu em pomares e quintais na Amazônia brasileira é uma atividade importante para a economia regional, principalmente para a agricultura familiar. Os frutos são amplamente utilizados pela população na Amazônia brasileira na fabricação de diversos produtos alimentícios consumidos localmente (Silva, 2020) e a manteiga para cosméticos, normalmente é exportada para a indústria fora da Amazônia.

Na Amazônia, há diferentes biotipos de cupuaçu, como o cupuaçuzeiro-de-fruto-redondo e o cupuaçuzeiro-mamorana, com variações em peso e espessura da casca (Gondim *et al.*, 2001 e Salgado, 2010). A facilidade de colheita do fruto caído naturalmente no chão associado ao processo de domesticação dessa planta, possibilitou sua adaptação a diversas regiões e populações brasileiras, incluindo áreas da Região Mata Atlântica.

A expansão de cultivo e as pesquisas permitiram os avanços em técnicas de manejo e aumento de produção com consequente abertura de mercado no Brasil e no exterior (Da Silva e Pierre, 2015). Os usos dos produtos do cupuaçu, aliado à facilidade de manejo das árvores, levaram muitas famílias a substituírem cultivos tradicionais de monocultura de grãos, a exemplo de arroz, feijão e milho, pelas árvores de cupuaçu (Pugliese, 2010) inclusive em sistemas agroflorestais, benéficos para a agricultura familiar, oferecendo vantagens econômicas e ambientais (Armando *et al.*, 2002). Isso reflete a importância dessa cultura na região amazônica, onde o cultivo do cupuaçu representa sustentabilidade ambiental com rentabilidade econômica significativa, gerando emprego e renda no segmento da fruticultura (Da Silva e Pierre, 2021).

Os sistemas agroflorestais são modelos tecnológicos benéficos para a agricultura familiar, oferecendo vantagens econômicas e ambientais (Armando *et al.*, 2002). A parametrização dos sistemas agroflorestais em termos de arranjo espacial das plantas componentes, espaçamentos, espécies e temporalidade tem permitido a caracterização e codificação de tecnologias para estudos comparativos (Oliveira *et al.*, 2016).

Contudo, a elevada intensidade de doenças observadas em sistemas agroflorestais com cupuaçu e a falta de medidas efetivas de controle, determinam a ocorrência de dano à produção e prejuízos socioeconômicos e ambientais. Uma vez que, a desistência da atividade econômica baseada em SAF vem acompanhada da implantação de pastos para pecuária bovina de corte de baixo rendimento. No Brasil, o cupuaçuzeiro é atacado pelas doenças vassoura-de-bruxa, morte-progressiva, podridão-vermelha, murcha-de-ceratocystis ou mal-do-facão, mancha-de-phomopsis, antracnose, mancha-de-cylindrocladium, podridão-das-raízes, queima-do-fio, podridão-interna-dos-frutos (Souza, *et al.*, 2014 e Gondim, *et al.*, 2001).

Nas últimas décadas, produtores (as) do Projeto Econômico, Consorciado e Adensado (RECA) têm observado, em seus SAFs, o grande número de plantas de cupuaçuzeiro doentes, com lesões típicas de fungos no caule, seca de ponteiros e folhas amarelas e necrosadas. Essas plantas apresentam sintomas de doenças que causam declínio, o que requer estudo aprofundado para identificar precisamente se há doenças bióticas e quais doenças estão ocorrendo nestas plantas.

Devido ao estágio de conhecimento sobre o problema, optou-se por considerar as plantas sintomáticas como portadoras de uma síndrome da morte descendente (SMD), levantando-se a hipótese da ocorrência de fungos fitopatogênicos associados ao problema, com padrão de distribuição espacial agregado e variabilidade na ADEF. O objetivo geral da pesquisa foi estudar a etiologia e a distribuição espacial da síndrome da morte descendente nos plantios de cupuaçuzeiro (*T. grandiflorum*) em Sistemas Agroflorestais no Sudoeste da Amazônia.

Os objetivos específicos foram a) Identificar os fungos associados a síndrome da morte descendente em plantas de cupuaçuzeiro nos pomares em campo; b) Avaliar a patogenicidade de fungos associados à síndrome da morte descendente em plantas de cupuaçu; c) Avaliar a incidência da síndrome da morte descendente em plantas de cupuaçu; d) Avaliar o padrão espacial de plantas de cupuaçu com síndrome da morte descendente; e) Analisar a dinâmica e a estrutura de focos da doença em plantas de cupuaçu com síndrome da morte descendente.

2. Revisão de literatura:

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. Spreng.) K. Schumann) é uma árvore frutífera da família Malvaceae, originária do sul e sudeste da Amazônia, sendo que no Brasil, ocorre principalmente nos estados da Bahia, Pará, Amazonas, Rondônia e Acre (Santos, 2019).

A árvore pode atingir 20 m de altura e 45 cm de diâmetro a altura do peito, com caule ereto e sistema radicular pivotante com concentração de raízes laterais ou secundárias nos primeiros 20 a 25 cm de profundidade do solo (Costa, 2002 e Souza *et al.*, 2007). O crescimento

vertical da planta é por prolongamento do ramo ortotrópico central seguido de lançamento de ramos plagiotrópicos inclinados e em roseta com distância de até 150 cm entre elas. As folhas são verdes e brilhantes, com comprimento de 25 a 30 cm e largura de 10 a 15 cm (López, 2015).

O florescimento ocorre aos dois a três anos após o plantio realizado com mudas por sementes em idade aproximada de oito meses (Schrammel e Ribeiro, 2014). O fruto do cupuaçu é classificado como fruto simples carnosos, do tipo baga e indeiscente. Os frutos variam em morfologia podendo ter forma elíptica ou arredondada de acordo com o genótipo e, a espessura da casca varia de 0,6 a 1 cm com frutos de até 4 quilos (Silva, 2020). Os frutos são persistentes e caem das árvores quando estão maduros (Mota *et al.*, 2013), o que facilita a colheita por permitir o ajuntamento rápido e o transporte.

As aplicações do cupuaçu, aliadas à facilidade de manejo em climas tropicais, levaram muitas famílias a substituírem cultivos tradicionais, como arroz, feijão e milho, pelas árvores de cupuaçu (Pugliese, 2010) e por plantios em sistemas agroflorestais, dos quais são benéficos para a agricultura familiar, oferecendo vantagens econômicas e ambientais (Armando *et al.*, 2002). Isso reflete a importância da agricultura familiar na região amazônica, onde o cultivo do cupuaçu representa uma atividade econômica significativa, gerando emprego e renda no segmento da fruticultura (Silva e Pierre, 2021).

Os sistemas agroflorestais com pomares de cupuaçuzeiro e aqueles que não mais possuem plantas consorciadas são extremamente relevantes para famílias que dependem do uso da terra em pequena escala como meio de sobrevivência com dignidade. No entanto, o produtor enfrenta diversos obstáculos devido à falta de medidas eficazes de controle de doenças do cupuaçuzeiro e artrópodes fitófagos sem, no entanto, haver estudos que confirmem cada agente biológico como uma praga primária ou secundária ou não praga.

No Brasil, várias doenças são registradas, incluindo a vassoura-de-bruxa, morte-progressiva, podridão-vermelha, murcha-de-ceratocystis ou mal-do-facão, mancha-de-phomopsis, antracnose (Souza *et al.*, 2014 e Gondim *et al.*, 2001), queima do fio e podridão de *Lasiodiplodia* nos frutos (Bastos, 2002). O termo, morte progressiva é definido como a “redução drástica da população de uma espécie quando seus números ultrapassam a capacidade de suporte” (Gasparotto *et al.*, 2010). A doença morte-progressiva causada por *Lasiodiplodia theobromae* seria mais bem apropriadamente nominada pelo termo morte-descendente-progressiva ou objetivamente, morte-descendente devido ao sintoma die-back (Gabriel, 1993 e Oliveira, 2014).

Os insetos relatados no cupuaçu e coloquialmente denominados pragas são a broca-dos-ramos do cupuaçu (*Magulacra nigripennata* Dognin), a broca-do-broto ou broca-da-

ponteira do cupuaçu (Coleoptera: *Curculionidae*), a lagarta-do-cupuaçu, *Macrosoma tipulata* Hüber, a broca-do-fruto *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940 (Coleoptera: *Curculionidae*) (Teixeira e Veld, 1997; Adaime *et al.*, 2020; Lorico *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2021; Oliveira *et al.*, 2006 e Sousa *et al.*, 2022). No entanto, até o momento não há estudos conclusivos que estabeleçam o nível populacional que caracteriza cada espécie como uma praga tecnicamente.

Nos casos de doenças do cupuaçu, a ausência de protocolos e infraestrutura operacionais que viabilizem a diagnose precisa, além da possível ocorrência de doenças ainda não relatadas constitui-se em grande obstáculo à sustentabilidade dos sistemas de produção. Deste modo, a epidemiologia de doenças de plantas constitui-se na disciplina fundamental como ponto de partida para os estudos que se fazem necessários. A epidemiologia é o estudo da causa, da ocorrência, da intensidade, da origem e do comportamento de expansão, diminuição ou estabilização de uma doença de planta no espaço e no tempo dentro de uma população de plantas (Oliva *et al.*, 2013).

A avaliação de doenças de plantas pode ser qualitativa ou quantitativa, sendo que a quantidade, referida como intensidade pode ser medida pela incidência ou pela severidade (Campbell e Madden, 1990). A severidade é a porcentagem de área ou volume de tecido com sintomas, quantificada por cálculo da razão entre quantidade de tecido doente e quantidade total de área ou volume do órgão avaliado multiplicado por 100 ou ainda com uma escala de notas. A avaliação qualitativa de doenças em plantas, conforme proposto por Campbell e Madden (1990), expande o conceito de dano para além da aparência física, englobando prejuízos no valor de mercado, reduções nos teores de constituintes desejados e alterações na digestibilidade ou composição química dos produtos colhidos. A incidência é o número de unidades (folhas, raízes, ramos, frutos) de plantas doentes relativo ao total de unidades avaliadas, sendo expressa como proporção ou porcentagem se a planta inteira é a unidade avaliada (Kranz, 1988).

Em uma epidemia, a incidência é utilizada para a classificação epidemiológica da doença e inferir sobre o número de gerações, a disseminação do patógeno, o início e a propagação da doença em qualquer ecossistema (Bowen, 2016).

A epidemia é o aumento da doença numa população de unidades de plantas, lentamente ou rapidamente, estando em plantas no viveiro, campo agrícola, pomar, floresta, SAF, pasto, jardim, frutos, sementes, produtos armazenados, etc. Um surto epidêmico, mesmo que a partir de uma endemia, é a ocorrência de grande número de indivíduos com grande intensidade numa determinada área geográfica em determinado tempo, podendo ser classificado como uma

epidemia cíclica se ocorre periodicamente (Bergamin Filho, 1995). A transição de endemia para epidemia está ligada à evolução da doença e aos estágios do ciclo do patógeno (Gomes, 2019; Bergamin Filho e Amorim, 1996).

O padrão espacial de uma doença também pode ser estudado com dados de incidência e, neste texto, os termos, padrão espacial e padrão espacial de inóculo se referem a doença e ao patógeno respectivamente. O padrão espacial está relacionado à etiologia, à ação de vetores e agentes transportadores de inóculo na disseminação do patógeno (Laranjeira *et al.*, 1998, Tumura, 2011), aos mecanismos de sobrevivência do inóculo (Davis; Brown, 1996) e a propagação de doença.

As doenças de causa biótica, principalmente aquelas encontradas em hospedeiros perenes, exibem padrões definidos de aparecimento e de crescimento de focos. Geralmente, nestes casos, há agregação de plantas dos indivíduos a partir de altas incidências (Gottwald *et al.*, 1993 e Laranjeira, 1997).

A análise de padrão espacial de doença permite inferir sobre a distância relativa da fonte de inóculo até o hospedeiro e, sobre a base genética dos hospedeiros, entre outros fatores relevantes para uma epidemia (Barnes *et al.*, 2005).

O padrão pontual, a média e a variância de uma amostra podem ser usados para calcular índices de dispersão, indicando se a distribuição das plantas doentes é aleatória ou agregada (Davis e Brown, 1996). Um padrão aleatório sugere que a probabilidade de infecção é uniforme entre as plantas, sem influência da distância até a fonte de inóculo (Tumura; Pierri e Furtado, 2012).

Algumas doenças de causa biótica, principalmente aquelas encontradas em plantas perenes estabelecidas em arranjos estruturados, exibem padrões definidos de aparecimento e de crescimento de focos. Geralmente, nestes casos, há agregação de plantas doentes a partir de altas incidências (Gottwald *et al.*, 1993 e Laranjeira, 1997).

Na análise do padrão espacial, de pontos representando plantas doentes, a média e a variância da incidência em uma amostra populacional foram usados para calcular índices de dispersão, os quais indicam a existência de agregação ou aleatoriedade, bem como, quantifica o grau de agregação de plantas doentes (Davis e Brown, 1996). Um desses índices, é o índice de agregação de Lloyd, (IAL) apropriado para dados de contagem e padrão espacial de inóculo, permitindo concluir que o grau de agregação de inóculo do patógeno pode estar em uma das seguintes classes; agregado (se $IAL > 1$), aleatório (se $IAL = 1$) ou regular (se $IAL < 1$) (Xiao *et al.*, 1997).

Um padrão espacial aleatório é aquele em que a probabilidade de deposição do inóculo e infecção nos órgãos suscetíveis das plantas hospedeiras é a mesma, sem influência da distância até a fonte de inóculo, que pode estar inclusive na própria planta ou até fora da população em estudo (Tumura; Pierri e Furtado, 2012). A distância da fonte de inóculo até os hospedeiros é relevante, no entanto, para estudos de gradiente de deposição de esporos e gradiente de doenças. Por outro lado, um padrão espacial agregado é uma evidência do modo de dispersão do patógeno, o qual é de curta distância neste caso.

O índice de dispersão (ID) como um procedimento analítico para avaliar o padrão espacial de doença em uma população de plantas (Tumura, 2015) deve ser calculado pela razão entre a variância observada (V_{obs}) e a variância teórica esperada (V_{bin}), sendo essa última igual a média, se a distribuição estatística esperada for de Poisson.: deste modo, os padrões espaciais podem ser classificados em regular, $ID < 1$, aleatório, $ID = 1$, e agregado, $ID > 1$ (Campbell; Madden, 1990; Bergamin Filho *et al.*, 2004).

O ID dado pela razão: V_{obs}/V_{bin} foi aplicado por Laranjeira *et al.* (2004) para analisar a dinâmica espacial da clorose variegada dos citros (CVC) em São Paulo e, Ferreira, Pereira e Abreu (2009) relata o uso da razão variância/média para o estudo da distribuição espacial da mancha manteigosa do cafeeiro em parcelas lineares de cinco plantas consecutivas. É amplamente utilizado para analisar a dispersão espacial de doenças. Estudos como o de Muirhead *et al.* (2018) aplicaram o ID para avaliar como doenças infecciosas se espalham em diferentes regiões geográficas, revelando padrões importantes de propagação.

Comparações entre o ID e outros índices, como o coeficiente de variação, foram feitas para determinar a adequação em diferentes contextos de dados. Por exemplo, o estudo de Li e Zheng (2020) comparou esses métodos para a análise de dados de doenças infecciosas e descobriu que o ID oferece uma visão mais detalhada da dispersão. (Almeida *et al.*, 2022a) exploraram o uso do ID em estudos de doenças tropicais no Brasil, oferecendo insights sobre como a dispersão pode influenciar as políticas de sanidade vegetal para essas doenças específicas.

A Análise de Dinâmica e Estrutura de Focos (ADEF) é utilizada para o estudo dos focos de doença em uma população de plantas quanto à forma do foco, a área do foco, tipo de foco, número, número de plantas por foco e compacidade (Nelson, 1996). É uma técnica simples, não simplista, de aplicação rápida e prática que pode inclusive integrar estudos complexos como aquele destinado a entender as mudanças nos padrões espaciais das plantas com cancro cítrico na presença ou ausência da larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella* Stainon) (Bergamin

et al., 2001). As variáveis estudadas durante a ADEF podem ser utilizadas juntamente com outras técnicas para melhor entender o patossistema, o que é importante no caso de doenças de etiologia desconhecida, como a síndrome da morte dos citros (Jesus Junior e Bassanezi, 2004).

O foco, unitário ou de grupo, é o sítio de concentração de plantas doentes ou lesões discretas, podendo ser a fonte primária de infecção ou coincidindo com a área favorável ao estabelecimento e tendendo a influenciar o padrão posterior de transmissão da doença (Nelson, 1996). A ADEF permite entender a dispersão de inóculo e correlacionar a incidência de doenças com outros fatores (Tumura, 2015), a exemplo da distância de hospedeiros alternativos, direção e velocidade do vento.

Essa técnica é amplamente utilizada para caracterizar processos ecológicos, como reprodução, dispersão e sobrevivência de patógenos e fornece informações quantitativas com dados de incidência da doença, que mostram como a doença se desenvolve no espaço e no tempo e, qual a possível etiologia (Jesus Junior e Bassanezi, 2004). Laranjeira *et al.* (2004) utilizaram ADEF para estudar a dinâmica espacial da clorose variegada dos citros (CVC) em São Paulo, revelando padrões espaciais que ajudaram a entender a epidemiologia da doença e a desenvolver estratégias de manejo mais eficazes.

Da mesma forma, Ferreira, Pereira e Abreu (2009) aplicaram a ADEF para investigar o arranjo espacial da mancha manteigosa do cafeeiro, contribuindo para a compreensão da distribuição das infecções e para a otimização das práticas de controle. Também, tem sido aplicada em estudos de doenças como a murcha-de-ceratocystis em *Khaya senegalensis* e eucalipto, e ferrugem do eucalipto (Jesus Junior e Bassanezi, 2004; Laranjeira *et al.*, 2004; Bergamin Filho *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2009; Benso *et al.*, 2021; Tumura *et al.*, 2012 e Masson, 2009). Também, tem sido aplicada em estudos de doenças como a murcha de Ceratocystis em *Khaya senegalensis* e eucalipto, e ferrugem do eucalipto (Benso *et al.*, 2021; Masson, 2009 e Tumura *et al.*, 2012).

No estudo do padrão espacial de plantas doentes nas linhas ou nas colunas de plantio, destacam-se as análises de sequência ordinárias (ASO) denominadas testes de Run e teste de Doublet. Um Run é uma sequência de um ou mais símbolos idênticos, os quais são seguidos ou precedidos por símbolos diferentes ou por nenhum símbolo, representando a sucessão de urna ou mais plantas doentes ou sadias. Através desta análise, compara-se o número de Runs observados (R) com o número de Runs esperados (E), sob a hipótese H0: as plantas doentes estão distribuídas aleatoriamente da área (Bergamin Filho *et al.*, 2004).

O Teste de Run, desenvolvido por Fisher e Tippett em 1928, é um método que avalia a aleatoriedade de uma sequência binária, observando a ocorrência de corridas ou "Runs", que

são sequências contínuas de valores iguais. A premissa básica do teste é que, sob a hipótese de aleatoriedade, o número de Runs observado deve seguir uma distribuição específica. Assim, esses métodos foram desenvolvidos para calcular o número esperado de Runs e determinar se as observações desviam significativamente desse valor esperado, indicando possíveis padrões não aleatórios.

Montgomery (2017) destaca a importância desse teste em controle de qualidade e análise de processos, em que a detecção de padrões não aleatórios pode sinalizar problemas na produção ou falhas no experimento. Assim como o teste de Run, o teste de Doublet analisa o padrão espacial de doença em linhas ou colunas de plantio. Porém, nesta análise, o número de Doublets, isto é, duas plantas doentes adjacentes são utilizadas como critério de decisão na atribuição do valor numérico 1 e para a contabilização do valor total de D na linha. Neste teste, a hipótese de nulidade H_0 é aceita quando a sequência ordenada de plantas doentes é aleatória, ou seja, testa-se a hipótese de que o padrão espacial é do tipo aleatório ou ao acaso, a partir de um conjunto de símbolos que representam estas plantas.

A teoria do Teste de Doublet é baseada na ideia de que a frequência de pares consecutivos pode revelar dependências ou padrões que não são evidentes com o Teste de Run. Walpole, Myers e Myers (2012) exploram essa metodologia, destacando sua aplicação em análises onde a dependência entre pares de valores é de interesse particular, como na análise de eventos e séries temporais.

Chatfield (2016) oferece uma visão abrangente sobre como o Teste de Doublet complementa o Teste de Run, fornecendo uma perspectiva mais detalhada sobre a dependência entre pares de dados. Esse enfoque é particularmente útil em análises complexas onde a simples contagem de Runs não é suficiente para capturar todos os aspectos da aleatoriedade ou padrões presentes.

A frequência do número de plantas doentes no aglomerado de linha ou de coluna pode ser calculada e analisada quanto à razão de chance de efeito de fatores abióticos e ou bióticos, sendo que, a visualização dos aglomerados em mapa do sistema de posicionamento global (GPS) requer coleta do dado de localização precisa de todas as plantas. A sobreposição de mapa pedológico ou de relevo por exemplo pode encontrar correlação entre doença e meio ambiente físico.

A caracterização morfológica dos fungos é essencial para estudar sua diversidade e taxonomia. Diversos periódicos destacam a importância da morfologia na identificação e classificação dos fungos, fornecendo informações sobre esporos, hifas e corpos de frutificação.

Essas características são fundamentais para diferenciar espécies e entender suas relações filogenéticas (Melo *et al.*, 2018).

Korf e Fisher (2013) destacam que, apesar do avanço das técnicas moleculares, a análise morfológica tradicional ainda é essencial para identificar fungos. Características visíveis, como cor, textura e forma dos esporos e estruturas reprodutivas, continuam fornecendo informações valiosas sobre a identidade das espécies.

Autores discutem como a variação morfológica entre populações de uma mesma espécie pode fornecer pistas sobre a adaptação ecológica e a diversidade dentro de um habitat específico. Essa abordagem morfológica é essencial para a compreensão das estratégias de sobrevivência e interação ecológica dos fungos (White *et al.*, 2012).

A relevância da morfologia na taxonomia fúngica e a precisão na descrição das características morfológicas são cruciais para a construção de chaves de identificação confiáveis para a delimitação de novas espécies. A morfologia permite não apenas a identificação de espécies conhecidas, mas também a descoberta de novas entidades taxonômicas (Bandoni, 2007).

As sequências de DNA e outros marcadores genéticos de DNA são importantes para a identificação de fungos e classificação porque são independentes de isolamento em cultura pura e de variabilidade fisiológica (Elder e Turner, 1995). Devido à alta variabilidade intraespecífica de alguns marcadores genéticos de DNA, que impedem a separação monofilética e monoespecífica, dentro da biodiversidade fúngica, estudos com diferentes sequências de DNA foram realizados para a seleção de sequências conservadas e marcadoras de espécie (Schoch *et al.*, 2021). Deste modo, buscou-se a assinatura de sequência para o nível taxonômico espécie, como um conceito de ferramenta de estudo, definida como uma evidência evolucionária proveniente de caracteres sinapomórficos de nucleotídeos.

A abordagem mais amplamente aceita e utilizada no mundo para a identificação de um espécime é o uso de marcador genético de DNA genômico, denominado DNA barcode, que consiste na análise da sequência única da região ITS, que compreende as regiões não codificantes ITS1 e ITS2 e o gene 5.8S, ITS1-5.8S-ITS2, sem os primers, utilizando método estatístico que calcula a verossimilhança da sequência desconhecida com outras sequências de táxon conhecido.

A técnica consiste em obter isolados de fungos em cultura pura e extrair o DNA fúngico total para amplificação da sequência de DNA barcode via reação em cadeia da polimerase (PCR) (Miller *et al.*, 1988). A amplificação do DNA alvo é realizada com primers específicos para genes conservados evolutivamente, como os genes nucleares de RNAs ribossômicos

(rDNA), precisamente da região Internal Transcribed Spacer (ITS) White *et al.* (1990) estabelecida como barcode de 500 a 800 pb por Schoch *et al.* (2012). A região ITS é composta por duas sub-regiões variáveis, ITS1 e ITS2, e um gene conservado, 5.8S, tendo de um lado o gene 18S e do outro o gene 28S (White *et al.*, 1990; Schoch *et al.*, 2012), onde os primers anelam. A região ITS contendo a sequência completa de ITS1-5.8S-ITS2 de rDNA de culturas puras de fungos é amplificada com primers ITS1F, ITS1, ou ITS5 mais o ITS4, contudo, os primers SR6R e LR1 (Vilgalis e Hester, 1990) também são empregados (Mellor *et al.*, 2000) resultando em sequência de 550 a 600pb.

O DNA com qualidade apropriada é sequenciado, e as sequências são analisadas estatisticamente juntamente com aquelas disponíveis em base de dados, como BOLD (<https://boldsystems.org/>), (Hilbert, 2003), ISHAM (<https://its.mycologylab.org/>) (Irinzi *et al.* 2015), NCBI RefSeq (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/targetloci/>) (Goldfarb *et al.*, 2025), UNITE (Koljalg *et al.*, 2013), para identificar o espécime de interesse (Benson *et al.*, 2015). As análises estatísticas do *dataset* organizado para cada espécime com o algoritmo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), por exemplo, permite assinalar a espécie desde que a sequência atenda aos parâmetros de cobertura maior ou igual a 80% e similaridade maior ou igual a 97% a 100% (menores e-value), dependendo do táxon em estudo. A asserção dedutiva da espécie é assinalada devido a inferência de alta homologia entre as sequências do táxon estatisticamente melhor posicionado e o espécime de interesse.

À luz dos conhecimentos atuais, a abordagem única de DNA barcode da região ITS (ITS1-5.8-ITS2) ou qualquer sequência parcial desta região deve contar com a prudente cautela de notação (EH), espécie hipotética.

A caracterização da região ITS do espécime para a identificação por filogenia, utilizando o mesmo *dataset* de sequências de DNA, requer alinhamento e análise filogenética com apresentação do cladograma Swofford (2003) no qual, a espécie será a mesma presente no clado de distância genética zero. A técnica de marcador genético DNA barcode de ITS possibilita a identificação precisa de algumas espécies de fungos (Rosa e Paiva, 2009) para as quais tenha havido uma definição taxonômica finalizada, mas a complexidade do fenômeno biológico vida artificialmente organizado em níveis taxonômicos obriga a expansão do conceito para o uso de 2 ou mais genes para definir a espécie filogenética para além da espécie biológica.

Amostras amplificadas são sequenciadas, e as sequências obtidas comparadas com aquelas em bancos de dados, como GenBank, para confirmar a identidade do patógeno (Benson *et al.*, 2015). As análises filogenéticas, baseadas nas sequências conduzidas para construir árvores filogenéticas e comparar com outras cepas e espécies relacionadas, conforme as

metodologias de Swofford (2003). A inoculação de microrganismos ou entidades bioquímicas em plantas visa o estabelecimento artificial de interação entre o possível agente causal de doença e seu provável hospedeiro, com o objetivo de confirmar a patogenicidade e, ou a virulência (Rezende, 2011).

De acordo com Siviero *et al* (2002), esses métodos de inoculação artificial devem ser práticos, seguros e estáveis e correlacionar com as infecções naturais no campo. Métodos de avaliação de doenças devem, também, ser voltados prioritariamente a plantas jovens a fim de contribuir para agilizar o processo de seleção de material.

A inoculação de um patógeno em uma planta consiste em passos importantes a serem seguidos, tais como: obtenção e preparo do inoculo, deposição do inóculo sobre a superfície do hospedeiro, incubação, colonização dos tecidos pelo patógeno e expressão dos sintomas e sinais. A avaliação de doenças pode ser realizada em plantas com infecções naturais ou naquelas inoculadas experimentalmente em campo ou em ambiente controlado (Rezende, 2011).

O Método da inserção sob casca foi idealizado por Grimm e Hutchison (1973) para uso em infecções de plantas adultas, sendo, posteriormente, adaptado para as de plantas jovens (Afek e Szejnberg, 1990). Consiste em introduzir um disco de meio de cultura infestado com o patógeno sob a casca da planta, sem destacar o tecido vegetal. A avaliação pode ser feita a partir de duas semanas da inoculação através da medida da área ou do comprimento das lesões (Siviero *et al.*, 2000).

3. Material e Métodos

3.1 Área de estudo

A pesquisa foi realizada no Projeto RECA, localizado no Distrito de Nova Califórnia, município de Porto Velho, estado de Rondônia (Figura 01), próximo à divisa dos estados do Acre, Amazonas e Rondônia contando com suporte logístico da Cooperativa de Produtores do Reca, localizada à margem da Rodovia BR-364, sentido Rio Branco - Porto Velho, com aproximadamente 150 km de distância do município de Rio Branco, AC e 350 km de Porto Velho, RO.

A região é conhecida como Ponta do Abunã, constituindo-se de um polígono de 541.335 ha, composto por parte do território dos municípios de Acrelândia, AC, Porto Velho, RO, e Lábrea, AM, fazendo fronteira natural com a Bolívia, no eixo do Rio Abunã. O Projeto RECA foi criado em 1984, a partir de um assentamento do Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (Incrá-RO) tendo significativo apoio da Igreja Católica

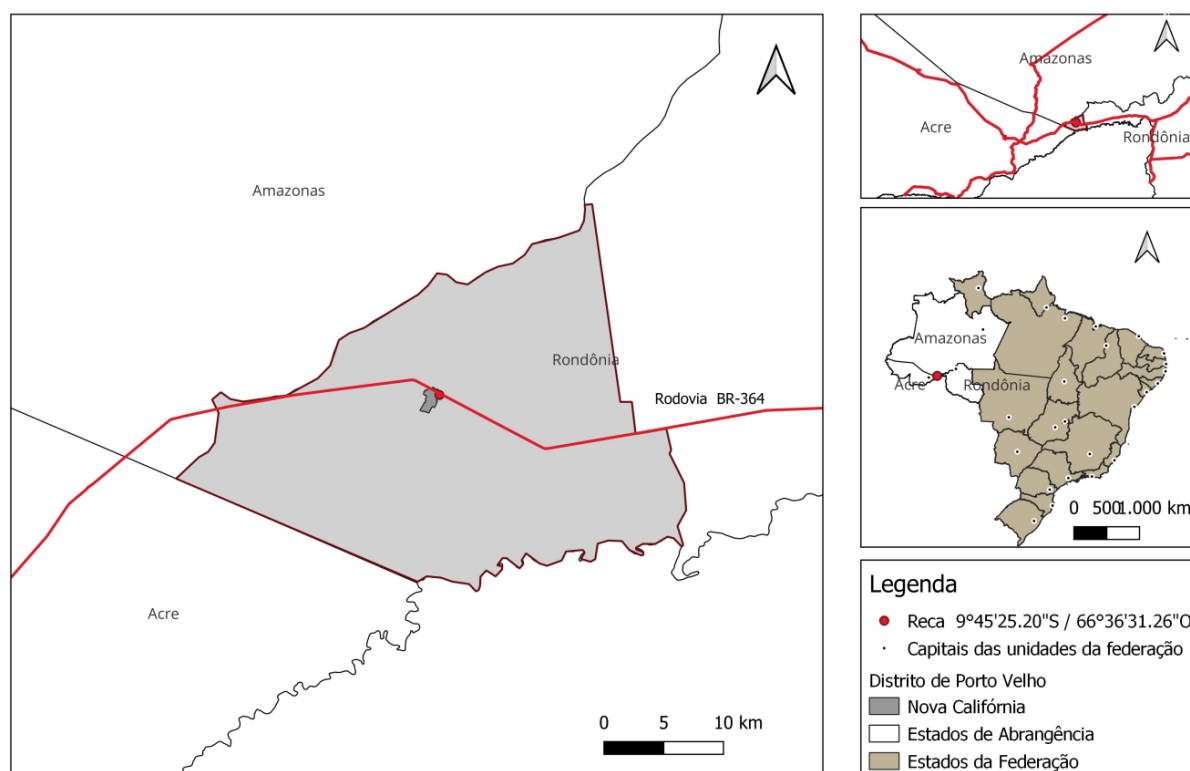


Figura 01. Área de estudo no distrito de Nova Califórnia, município de Porto Velho, Rondônia.

Em 1988, as lideranças rurais de Nova Califórnia iniciaram a elaboração de um projeto de reflorestamento, que teve como base o consórcio de culturas perenes regionais como cupuaçuzeiro (*T. grandiflorum*), pupunha (*Bactris gasipaes*) e castanha-da-amazônia (*Bertholletia excelsa*). Outras espécies de frutíferas e essências florestais presentes em SAFs da região são o açaí solteiro (*Euterpe precatoria*), bacaba (*Orbignya phalerata*), citros (*Citrus spp.*), banana (*Musa spp.*), café (*Coffea arabica*), rambotã (*Nephelium lappaceum*), mangostão (*Garcinia mangostana*), abacate (*Persea americana*), manga (*Mangifera indica*), jabuticaba (*Plinia cauliflora*) e coco (*Cocos nucifera*), copaíba (*Copaifera langsdorffii*), seringueira (*Hevea brasiliensis*), cumaru de cheiro (*Dipteryx odorata*), andiroba (*Carapa guianensis*), dentre outras. Atualmente, o projeto RECA conta com 300 famílias, organizadas em 12 grupos que juntas somam mais de 1.000 ha de Sistemas Agroflorestais-SAFs na Região Ponta do Abunã (RECA, 2025).

As 06 (seis) áreas de estudo (Tabela 01) estão inseridas em propriedades rurais que correspondem às Unidades Produtivas Familiares (UPF) de produtores (as) rurais associados (as) ou sócios (as) do RECA, distribuídas a uma distância de 01 a 20 km da Sede da institucional.

Tabela 01. Codificação e localização das áreas de estudo por Unidade Produtiva Familiar.

Área de Estudo	Endereço	Coordenadas Geográficas (UTM)
01	BR 364, Km 1072, Ramal Pioneiros, km 01, Ramal Baixa Verde, km 17, Vila Nova Califórnia, Rondônia.	Latitude -9,872304 Longitude -66,598953
02	BR 364, Km 1072, Ramal Pioneiros, km 04, Vila Nova Califórnia, Rondônia.	Latitude -9,786944 Longitude -66,631744
03	BR 364, Km 1072, Ramal Pioneiros, km 01, Ramal Baixa Verde, km 20, Vila Nova Califórnia, Rondônia.	Latitude -9,871660 Longitude -66,58016
04	BR 364, Km 1072, Ramal Pioneiros, km 01, Ramal Baixa Verde, km 19, Vila Nova Califórnia, Rondônia.	Latitude -9,879799 Longitude -66,597533
05	Br 364, km 1071, Vila Nova Califórnia, Rondônia.	Latitude -9,753745 Longitude -66,606018
06	BR 364, km 1070, Chacareiros, Vila Nova Califórnia, Rondônia.	Latitude -9,750481 Longitude -66,609214

Os critérios para a seleção das áreas incluíram: a) famílias pertencentes aos diferentes grupos de agricultores (as) associados e cooperados (as) que trabalham com a cultura do cupuaçu, b) a composição dos diferentes arranjos agroflorestais com a presença de cupuaçu, c) inclusão de regiões com maior percentual de plantios de cupuaçu em SAFs, d) SAF's com cupuaçu em diferentes tipos de solos (fator abiótico não aportado na pesquisa) e a presença de plantas de cupuaçu doentes com síndrome da morte descendente.

O tamanho das áreas de estudo ou parcela variou de 1 a 2 hectares, dependendo dos arranjos agroflorestais adotados e pelo espaçamento utilizado no plantio da cultura principal, o cupuaçu (*T. grandiflorum*). Foram observados três padrões de espaçamento para o cupuaçu dentro das áreas, descrito como espaçamento entre linhas x espaçamento entre plantas: e número de plantas por hectare no plantio; 1) (8 m x 6 m): 208 plantas por hectare, 2) (8 m x 4

m): 312 plantas por hectare e 3) (6 m x 6 m): 277 plantas por hectare. As plantas das áreas tinham idade variável de 15 a 20 anos, e em fase reprodutiva.

Os SAFs das seis áreas (Figura 02) apresentam estrutura botânica diversificada com vários componentes agroflorestais consorciados com o cupuaçuzeiro. Enquanto as áreas I, II, III e VI apresentaram a maior riqueza, com seis espécies consorciadas, a área IV registrou uma diversidade intermediária de três espécies consorciadas. Por fim, a área V apresenta uma composição com menos de três espécies consorciadas além do cupuaçu.

Quanto ao padrão climático regional com base na tipologia de Köppen, adaptada por Martorano *et al.* (1993, 2017), confirma que na região há uma área com moderada estação seca e ocorrência de precipitação média mensal inferior a 60 mm pertencente à tipologia Am₃. As áreas de estudo estão regidas por duas tipologias climáticas Am₄ e Aw₄ reforçando que o volume de chuva anual varia entre 1500 e 2000 mm (Amaral, 2023) com curta estação seca.

O volume de chuva anual é mais elevado ao norte, que pertence ao estado do Amazonas, com valores variando entre 2.001 e 2.100 mm, seguido de áreas no Amazonas, Rondônia e parte norte do estado do Acre, com valores médios entre 1.901 mm e 2.000 mm. Com relação ao regime de chuva mensal, verifica-se que janeiro, fevereiro, março e dezembro são os meses com maior pluviosidade. No período de junho a setembro, as chuvas mensais ficam abaixo de 100 mm, e entre junho e agosto, o volume de chuva não ultrapassa 60 mm.

A temperatura média anual varia de 26 a 27 °C, as máximas entre 31,5 e 32 °C e as mínimas de 20,5 a 21,5 °C com considerável amplitude térmica diária. A dinâmica térmica mensal demonstra que os meses mais quentes são setembro, outubro e novembro, período em que as temperaturas médias ficam em torno de 27 °C, e em junho e julho, climaticamente, os valores ficam bem próximos aos 25 °C.

A unidade morfoestrutural dominante é a Depressão do Endimari-Abunã e a geologia compreende em sua maioria a Formação Solimões e o Detrito Laterítico Pleistocênico, que ocorrem em uma área aplainada, com interflúvios tabulares, associada a pequenas elevações dominadas pelo horizonte concrecionário do perfil laterítico. Os solos predominantes na região de Nova Califórnia, estão nas classes Argissolo vermelho, Argissolo vermelho-amarelo, Plintossolo háplico, Plintossolo argilúvico, Latossolo vermelho-amarelo e Neossolo fúlvico (Amaral *et al.*, 2023).

No que se refere à vegetação, de acordo com a classificação feita por Brasil (1976), ocorrem na área duas tipologias florestais: Floresta Ombrófila Densa e Floresta Ombrófila Aberta, sendo a segunda predominante com 63% da região.



Figura 02. Fotografias das áreas com Sistemas Agroflorestais contendo cupuaçu, onde foram coletadas as amostras.

3.2 Sintomatologia e Coleta de dados

A pesquisa foi estruturada em uma abordagem de campo e laboratório, estendendo-se de fevereiro a dezembro de 2025 e, executada em seis unidades produtivas familiares (UPFs) selecionadas. A coleta de dados foi dividida em três etapas: inicialmente, a Distribuição Espacial focou no levantamento e mapeamento binária da ocorrência da doença nas áreas de estudo; em seguida, a caracterização dos isolados, que envolveu a coleta, isolamento, purificação e identificação morfológica e molecular dos microrganismos associados aos sintomas no laboratório; por fim, o teste de patogenicidade, baseado nos Postulados de Koch,

que foi conduzido para confirmar a etiologia da doença através da inoculação controlada em plantas sadias e o reisolamento do agente causal, garantindo a validade científica das descobertas.

3.2.1 Sintomatologia

Para a identificação correta das árvores doentes no campo, visando a coleta de dados, foi realizada uma caracterização dos sintomas de doença por observação direta em plantas com diferentes anormalidades estruturais em diferentes órgãos da parte aérea e da raiz. Uma lista de sintomas foi elaborada para padronização e orientação:

- 1 Ramos doentes com murcha ou cancro em setores específicos da copa.
- 2 Galhos doentes com murcha ou cancro em setores específicos da copa.
- 3 Todos os galhos doentes com lesão longilínea e ou anelar na copa da árvore.
- 4 Todos os galhos doentes sem lesão na copa da árvore.
- 5 Todas as folhas verdes murchas, secam rápido sem amarelar.
- 6 Ramos na árvore com folhas verdes murchas.
- 7 Ramos na árvore com folhas amarelas pendentes não murchas.
- 8 Ramos na árvore com folhas murchas amarelas/marrons mortas.
- 9 Ramos na árvore mortos com folhas amarelas e ou marrons mortas e murchas.
- 10 Ramos na árvore mortos com folhas amarelas e, ou marrons mortos e secos.
- 11 Ramos na árvore mortos, desfolhados com a seca de ponteiros.
- 12 Desfolha anormal com folhas mortas caídas no chão sob a copa.
- 13 Todos os galhos mortos com ramos mortos desfolhados.
- 14 Tronco morto na parte superior com lesão anelar na casca.
- 15 Tronco morto na parte superior com lesão anelar no lenho.
- 16 Raízes com podridão em raízes finas, médias ou grossas.

Deste modo, os seguintes sintomas foram observados e selecionados para definir a síndrome da morte descendente: amarelecimento, murcha, desfolha, necrose foliar, necrose de casca, necrose de lenho, cancro, seca dos ponteiros e seca com morte da planta.

3.2.1.1 Coleta de dados incidência

A coleta de dados de incidência da SMD nos pomares foi realizada em agosto de 2025 nas seis unidades produtivas familiares (UPFs) selecionadas ao acaso. Das três etapas,

inicialmente, a Distribuição Espacial focou no levantamento e mapeamento binários da ocorrência da doença nas áreas de estudo

3.2.1.1.1 Distribuição Espacial

Os dados para avaliação da distribuição espacial contaram com uma população amostral total de 1.630 plantas. O número total de plantas doentes encontradas variou entre as áreas estudadas, sendo: 69 na Área I, 110 na Área II, 142 na Área III, 152 na Área IV, 111 na Área V e 204 na Área VI, totalizando 798 plantas doentes (Tabela 02).

Esses valores foram empregados nas análises subsequentes de distribuição espacial, na proporção cabível a cada análise, constituindo a base quantitativa para os cálculos de Incidência (I), Índice de Dispersão (ID), Análise da Dinâmica e Estrutura de Focos e os testes de Doublet e Run.

Tabela 02. Plantas doentes por linha na área de estudo.

Linha	Área I	Área II	Área III	Área IV	Área V	Área VI
1	6	14	8	7	8	20
2	4	12	14	9	8	17
3	5	7	15	11	6	16
4	7	5	11	13	5	15
5	7	7	15	18	9	22
6	8	8	12	16	7	19
7	3	11	14	7	5	23
8	3	9	7	14	12	15
9	2	12	12	16	11	16
10	8	9	12	14	13	18
11	3	7	12	14	13	19
12	13	9	10	13	14	14

Tabela 03. Gradil da população amostral de plantas sadias, doentes e ausentes, por linha e área de estudo.

Plantas	Área I	Área II	Área III	Área IV	Área V	Área VI
Sadias “0”	224	124	147	110	166	61
Doentes “1”	69	110	142	152	111	214
Ausentes “2”	07	66	11	38	23	25
Total Mensurado	300	300	300	300	300	300
Total “0” e “1”	293	234	289	262	277	275

3.2.2 Coleta de amostras

A coleta de material vegetativo para isolamento, purificação e identificação morfológica e molecular dos microrganismos associados aos sintomas ocorreu no período de fevereiro a abril de 2025, nas seis áreas do estudo. As amostras foram retiradas das raízes, do tronco, ramos, galhos, folhas e frutos de árvores com a síndrome da morte decrescente, cancro, exsudações, podridão, crestamento, nanismo, murcha, amarelecimento (clorose), necrose, enrolamento de folha (Figura 03), em face à atividade operacional a seguir:

- 1 Localizar a planta identificada com SMD
- 2 Visualizar a parte aérea e escolher os ramos para amostragem.
- 3 Cortar o ramo e tirar uma porção contendo tecido sadio e doente.
- 4 Colocar a amostra no saco de papel pardo já identificado.
- 5 Colocar a amostra em saco zip lock ou simples e fechar bem.
- 6 Colocar em caixa de isopor com garrafas de álcool gel congelado.
- 7 Flambar as ferramentas na lamparina
- 8 Realizar procedimento semelhante nas raízes doentes.
- 9 Localizar a segunda árvore e proceder nova coleta até a árvore 10.
- 10 Transportar até o Laboratório e armazenar em geladeira ligada, $T=5^{\circ}\text{C}$.
- 11 Proceder o isolamento o mais breve possível.



Figura 03. Planta de cupuaçuzeiro (*T. grandiflorum*): doente (A), cancro em tronco e galho (B,D). podridão nas raízes (C) e amarelecimento e necrose em folhas (E).

Em cada área, com população amostral entre 234 a 293 plantas (Tabela 03), as coletas foram realizadas em cinco plantas sintomáticas distintas dessa população por área amostral, totalizando 30 unidades amostradas, das quais estão mapeadas nos mapas de distribuição espacial do estudo. As amostras coletadas foram armazenadas em sacos de papel pardo e sacos plásticos, identificados e levados ao laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal do Acre/UFAC para o procedimento de isolamento e purificação dos isolados.

3.2.2.1 Isolamento e purificação

O isolamento e purificação dos fungos foram realizados de forma indireta, conforme adaptado por Alfenas *et al.* (2007) e separados em parte aérea e raiz. No laboratório, os materiais coletados em campo foram acondicionados em geladeiras a uma temperatura de 5° C até o isolamento total. Cada fragmento do material vegetal coletado foi cortado com bisturi em pedaços com 20 a 35 mm² e passou pelo processo de desinfestação para a eliminação de fragmentos que possam ser contaminantes no processo de isolamento. As etapas consistiram: a) imersão em álcool 70% por 60'; (b) transferidos para hipoclorito de Sódio (NaClO em 1.250 ppm) misturado a 50% de água destilada e esterilizada por 60'. (c) para remoção do excesso de NaClO, os fragmentos foram imersos em água destilada e esterilizada por 30' repetido por duas vezes) e, por fim, os fragmentos foram secos em papel filtro esterilizado (d). Para as raízes, a lavagem aconteceu em água corrente e antecedeu as etapas do processo de assepsia, com o uso de escova e esponja, para a retirada do solo. Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo vertical.

Em câmara de fluxo, alocou-se 5 fragmentos para cada parte do material vegetal coletado em cinco placas de Petri com 20 ml de meio BDA e antibiótico (estreptomicina), totalizando 25 fragmentos, por parte de material vegetativo coletado e por cada planta (Figura 04).

As placas e o meio de cultura foram esterilizados por 20 min. a 1 atm e 120 °C, vedadas e tampados com algodão e papel alumínio, respectivamente. As placas foram armazenadas em câmara BOD à temperatura de 25° C, pelo período de sete a dez dias. Em crescimento, as colônias foram periodicamente verificadas, analisadas e repicadas para uma nova placa de Petri com o mesmo meio de cultura até obter-se a purificação. Assim que purificados, cada isolado foi transferido para três tubos de ensaio com 5 mL de BDA e antibiótico, inclinado em um ângulo de 45°, tampados e armazenados em geladeira (Gonçalves, Alfenas, Mafía; 2007).

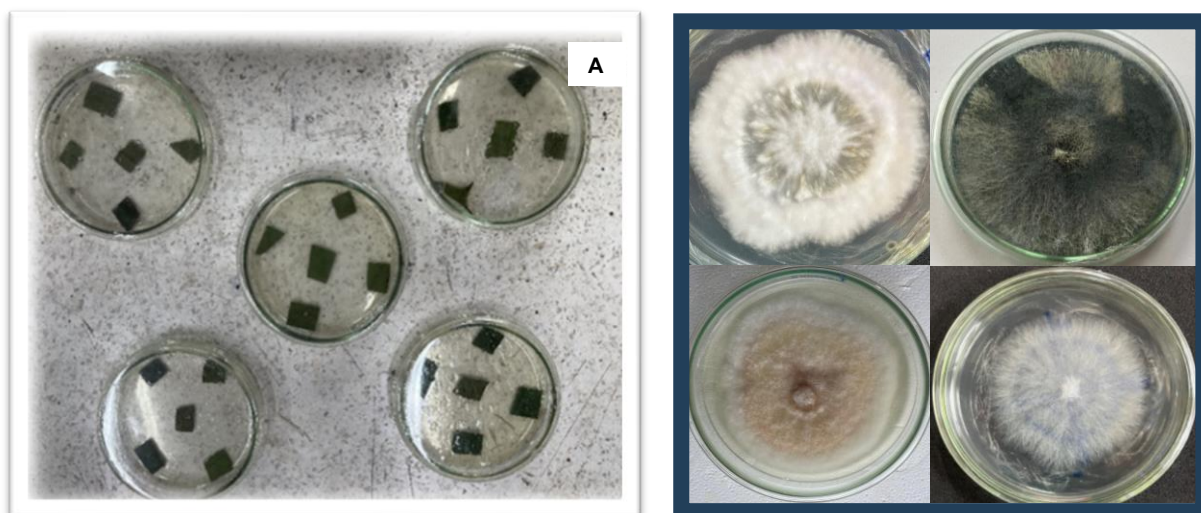


Figura 04. Fragmentos de planta de cupuaçu (*T. grandiflorum*): (A) disposição dos fragmentos nas placas de Petri e repetições e isolado purificado (B).

3.2.3 Caracterização dos Isolados

3.2.3.1 Identificação Molecular

3.2.3.1.1 Isolamento Monospórico

Os fragmentos de cada um dos 64 isolados foram repicados, pelo método de repicagem por ponta de hifas, para uma placa de Petri com meio BDA e outra com Ágar, sendo adicionado na parte superior do meio, papel filtro, acícula de pinus (*Pinus taeda* L.) e cravo (*Dianthus caryophyllus*) esterilizados, para induzir a esporulação. As placas foram incubadas em câmara BOD à temperatura de 25° C por sete a dez dias. Em seguida, cada espécime foi purificado pelo método de isolamento monospórico, de modo a eliminar o efeito mosaico genético dos procedimentos anteriores.

Os fragmentos de micélio contendo conídios de culturas puras foram transferidos, em uma câmara de fluxo laminar vertical, para tubos Eppendorf de 1,5 mL, contendo 500 µL de água destilada estéril. Os tubos foram agitados manualmente para a obtenção de uma suspensão de conídios e essa suspensão inicial foi diluída até se obter uma quantidade de cerca de 20-30 esporos/gota, contados em lâmina em microscópio de luz comum. Posteriormente, uma alíquota de 100 µL dessa suspensão foi transferida para placas de Petri, contendo meio ágar-água 2% e o volume foi espalhado sobre os meios de cultura, com o auxílio de uma alça de Drigalski. Após cerca de 6 a 12 h, conídios germinados separadamente foram transferidos isoladamente para placa de Petri com meio BDA, estabelecendo o isolamento monospórico para cada isolado, após cultivo em BOD a 25°C.

Para as placas que não tiveram a produção de conídios, mesmo com a extensão do período de germinação ao trigésimo dia e utilização de papel filtro, pinus e cravo, a purificação foi realizada por ponta de hifa retirada das bordas das placas. Isso consistiu em repicar essas

hifas novamente para placas para com meio ágar-ágar e deixar crescer o suficiente para recortar ponta da hifa germinada e repicar para tubos Eppendorf de 2,5 mL, contendo meio com BDA, antibiótico e inclinação em 45°. Os isolados monospóricos foram acondicionados de forma semelhante e encaminhados ao Laboratório de Análise Molecular do Instituto Biológico de São Paulo.

3.2.3.1.2 Extração de DNA, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento de DNA

Para a extração de DNA total, porções de micélio retirados de colônias em cultura pura dos isolados fúngicos selecionados e transferidas para tubos Eppendorf estéreis e novos, contendo tampão de extração de DNA e seguindo método CTAB, conforme descrito por Doyle e Doyle (1991). O DNA de cada isolado foi submetido à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificar as sequências do gene nrDNA 18S, Espaçador Interno Transcrito (ITS1), gene da calmodulina (*cmdA*), da β -tubulina, e da segunda maior subunidade da RNA polimerase II (RPB2). Para as amplificações, foram utilizados os primers SR6, para nrDNA, SR6R para ITS1-5.8S, CAL-228F/CAL 737R para o gene da calmodulina, Bt2a/Bt2b para para os fragmentos TUB2 e TUB2B do gene da β -tubulina e RPB2-5F2/RPB2-7cR para o gene RPB2.

As reações de PCR foram conduzidas seguindo protocolos padronizados para cada marcador. Os produtos amplificados foram posteriormente submetidos ao sequenciamento, e os fragmentos obtidos foram analisados quanto à qualidade. O Instituto Biológico de São Paulo, realizou, para os 64 isolados, conforme protocolos e métodos internos, as três fases principais interligadas e que antecedem os resultados da análise molecular:

3.2.3.1.3 Análises de sequências e identificação molecular

Cada sequência de DNA de cada isolado fúngico, em arquivo ab1, foi analisada e editada no programa BioEdit v. 7.2.5.0 (Hall, 1999) para correção de dúvidas sobre cada base nitrogenada, o qual foi exportado com salvamento na extensão de formato texto.seq e FASTA. Cada arquivo FASTA foi carregado por “upload”, na plataforma do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) na funcionalidade BLAST para nucleotídeos, parametrizada quanto a base de dados “core nt” e otimização para busca de sequências de altíssima similaridade. Adicionalmente, cada arquivo com a sequência de ITS1-5.8S foi carregado na plataforma UNITE (<http://unite.ut.ee>) parametrizada para as bases de dados “UNITE (fungi) exceto sequências HTS” e “INSD fungi”, e os códigos da espécie

identificada mais as sequências de maior similaridade foi anotado para inclusão na caracterização de múltiplas sequências.

Espécimes com sequências de DNA barcode que apresentaram cobertura de alinhamento maior ou igual a 80% e similaridade maior ou igual a 97 a 100% de sequências a algum táxon, foram assinalados na espécie de maior similaridade. A identificação e presença de fungos fitopatogênicos como causa da SMD ocorreu em nível de gênero. Para a região ITS, as análises de similaridade foram realizadas prioritariamente no banco de dados UNITE, uma base especializada em sequências fúngicas da região ITS, com curadoria taxonômica, o que permitiu maior eficiência na identificação em nível de gênero e maior confiabilidade taxonômica para esse marcador amplamente utilizado como barcode molecular de fungos.

Com base nessa identificação inicial, as análises das regiões RPB2, β -tubulina e calmodulina foram direcionadas aos grupos de isolados associados a gêneros com reconhecido potencial fitopatogênico, visando o refinamento da resolução filogenética e a melhor caracterização taxonômica desses táxons. Para essas regiões gênicas, as comparações de similaridade foram realizadas por meio da Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local (BLAST), disponível no National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Em todos os casos, foram selecionadas sequências de referência com maior cobertura e maiores valores de similaridade, priorizando-se isolados de referência depositados em bancos internacionais. O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado utilizando o algoritmo MAFFT, em sua versão online, considerando os parâmetros padrão. As análises filogenéticas foram conduzidas pelo método de Neighbour-Joining, com 1.000 repetições de bootstrap, utilizando o programa MEGA, versão 11. A árvore filogenética foi editada no Itol (*Interactive Tree Of Life*)

3.2.3.2 Caracterização Morfológica

Diante da identificação molecular dos isolados, realizou-se a caracterização morfológica macroscópica com ênfase na Velocidade de Crescimento (VC) para os 10 (dez) gêneros de isolados associados à patogenicidade e reconhecidos na literatura. A velocidade ou taxa de crescimento micelial (*in vitro*) é um parâmetro fenotípico importante que se correlaciona frequentemente com a agressividade (capacidade de um patógeno causar doença) e, por vezes, com a virulência (grau de doença causado) de fungos fitopatogênicos. Isolados que exibem um maior Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) tendem a ser mais agressivos (Kuramae-Izioka *et al.*, 1997), pois a rápida colonização e estabelecimento do fungo *in vivo*

(dentro do hospedeiro) permitem um maior dano tecidual em um menor período de tempo, sobrepondo-se às defesas da planta (Croll e Laine, 2016).

Os isolados foram repicados de forma asséptica, dos tubos de ensaio para o centro das placas de Petri com 9 mm. Nestas, depositou-se pedaços de micélio medindo 4 mm de diâmetro, meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar) e antibiótico, favorecendo o crescimento das estruturas vegetativas e reprodutivas necessárias à identificação (Barnett e Hunter, 1998; Leslie & Summerell, 2006). Foram incubados em câmara BOD sob condições controladas de temperatura, umidade e fotoperíodo, evitando variações ambientais que influenciam significativamente a taxa de crescimento (Dhingra e Sinclair, 1995).

No reverso das placas, a medição do diâmetro da colônia foi realizada diariamente, durante 12 dias (incluso o dia “0”), em dois ângulos perpendiculares (90°), denominadas D1 e D2, utilizando paquímetro digital.

O VC final correspondeu à média de cada diâmetro entre as duas medidas (D1 e D2). O crescimento médio radial foi calculado pelas fórmulas: $D_m = D1 + D2/2$. Ainda, de forma a observar estruturas fúngicas (hifas e esporos) destes mesmos isolados, foi realizada a caracterização micromorfológica, utilizando o método de microculturas, em que, para cada isolado, uma placa de Petri com algodão umedecido e com água destilada esterilizada, recebeu uma lâmina de microscopia sobre o aparato de polipropileno, para a lâmina não tocar o fundo da placa. Sobre a lâmina foi colocado um bloco aproximado de 5 mm x 5mm de meio BDA com fragmentos de cada isolado e, em seguida, uma lamínula estéril foi colocada sobre o bloco de meio.

As placas foram incubadas à temperatura de 25° C e fotoperíodo de 24 h no escuro, por até 7 dias. As lamínulas foram retiradas e colocadas em uma nova lâmina com líquido de montagem azul-de-algodão, para a observação, sob aumento variando de 10 a 20x/40x, no microscópio Olympus CX40RF100 E-400.

3.3 Teste de Patogenicidade

O teste de patogenicidade foi implantado em nível de campo, na área experimental do Projeto RECA, em um viveiro com 35 m² e luminosidade de 50%. Os 10 isolados (ISO) e a testemunha (T) foram inoculados em 176 mudas de cupuaçuzeiro jovens (12 meses) e bem nutridas (cultivadas em substrato na proporção de 2 terra: 1 composto orgânico + 2 kg de fosfato natural + 3kg de cinza + 1,5 kg de calcário, 0,5 kg de pó de rocha/100 terra + biofertilizante + calda bordaleza) e com diâmetro variando de 8,3 a 11,8 mm a 10 cm acima do colo (Reca,

2025), em um Delineamento em Blocos Casualizados (DBC 4 x 4) sendo quatro blocos, com quatro repetições e 16 plantas por tratamento (Figura 05).

A aplicação do DBC proporcionou o controle da heterogeneidade do ambiente no viveiro, agrupando as unidades similares em diferentes espaços e variações quanto ao recebimento de luminosidade, irrigação, tratos culturais e umidade, isolando os efeitos que poderiam interferir nos resultados dos tratamentos e garantido que cada um fosse testado de forma balanceada. As plantas foram separadas a uma distância de 50 cm entre blocos, 30 cm entre repetições e 20 cm entre elas.

Tabela 04. Grid experimental do teste para 11 tratamentos em DBC

B1	ISO8	ISO5	ISO1	ISO7	ISO2	ISO9	ISO10	ISO6	ISO3	T11	ISO4
B2	ISO9	T11	ISO6	ISO5	ISO4	ISO8	ISO2	ISO7	ISO3	ISO1	ISO10
B3	ISO3	ISO10	ISO7	T11	ISO6	ISO8	ISO9	ISO4	ISO5	ISO2	ISO1
B4	ISO10	ISO4	ISO9	ISO8	T11	ISO2	ISO1	ISO7	ISO5	ISO6	ISO3

Os arquivos em eletroferogramas, obtidos no sequenciamento do DNA, foram editados e conferidos manualmente no software BioEdit e também exportados individualmente para o Programa BLAST® 2.17.0, selecionando os isolados com maior percentual de similaridade e identidade. Os 10 isolados inoculados, resultaram das análises e sequências moleculares, que revelou a presença de dez possíveis gêneros fúngicos com potencial patogênico. Entre eles, destacaram-se *Colletotrichum* sp., *Diaporthe* sp., *Dwiroopa* sp., *Fusarium* sp., *Lasiodiplodia* sp., *Nectria* sp., *Neopestalotiopsis* sp., *Neurospora* sp., *Nigrospora* sp. e *Calonectria* sp.

No teste, foram utilizados dois métodos de inoculação: a) Método da inserção de inóculo no caule, que consistiu em depositar o inóculo do fungo patogênico no caule, sob a casca, na forma de disco de meio de cultura colonizado (Grimm e Hutchison 1973; Afek e Szejnberg, 1990). O procedimento operacional padrão adotado para esse método foi cortar os discos de meio de cultura BDA contendo micélio do fungo crescido por sete dias, utilizando furador de rolha de 5 mm. Em seguida, fez-se um corte em V invertido com bisturi por 1 a 2 cm de comprimento na casca de todas as plantas de cada parcela, a 10 cm da superfície do solo, sem removê-la.

Colocou-se o disco de BDA colonizado com o fungo sob a casca utilizando uma pinça e uma ponteira descartável P100 (parte do disco com micélio virada para a planta). A câmara úmida foi feita com algodão hidrófilo autoclavado, água de torneira destilada e autoclavada e, vedada com parafilm, amarrando-a com fita plástica.

O método do palito consistiu na inserção de palitos de madeira colonizados pelos mesmos fungos potenciais. O procedimento operacional padrão adotado foi cortar palitos de

pinus, de formato cilíndrico, com 1 cm de comprimento e colocar para ferver com duas trocas de água, a fim de eliminar a resina, agentes tóxicos e inibidores fúngicos.

Depois foi preparado meio com batata dextrose e os palitos encharcados até a ponta. Foram alocados em placa de Petri, tampado com algodão e papel alumínio foram autoclavados por 20 min. a 1 atm 120 °C e repetido o processo dois dias depois.

Colocou-se os palitos na borda das colônias dos isolados crescidos por sete dias em BDA com estreptomicina (100mg/L) para o fungo colonizar a madeira. Foi inserido um palito colonizado em uma folha próxima ao ápice de cada planta e coberta com um saco plástico para formação da câmara úmida.

A avaliação da incidência de sintomas visíveis de clorose, necrose, cancro e murcha ou morte das plantas foi realizada aos 7, 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a inoculação. As alterações internas do tipo descoloração vascular e lesão no lenho, aos 60 e 75 dias. A câmara úmida aplicada na folha e no caule foi retirada aos 15 dias após a inoculação.

O resultado final do teste baseou-se na presença de sintomas externos ou internos nas plantas inoculadas, associado à coleta de amostras das plantas sintomáticas para reisolamento e aferição da presença do patógeno, cumprindo assim, o Postulado de Koch.



Figura 05. Teste de patogenicidade: Preparo do inóculo em palito e disco (A), inoculação com disco no caule da planta (demonstração sem inserção em V invertido) (B), mudas de cupuaçu com 12 meses (C), câmara úmida em planta inoculada (D) e inoculação com palito em folha de cupuaçu (E).

3.4 Avaliação da Distribuição Espacial

Os cálculos da Incidência (I), Índice de Dispersão (ID), estrutura de foco (ADEF) e análises em linhas (Run e Doublet) foram feitos através do Microsoft Excel® 2014, a partir das fórmulas previamente selecionadas para cada método de avaliação. Para a avaliação da distribuição espacial das doenças, a coleta de dados foi realizada em uma única etapa, abrangendo seis áreas distintas de estudo, durante o mês de agosto de 2025, período que compreende o verão amazônico, caracterizado por condições climáticas favoráveis à observação, manifestação externa e acentuada dos sintomas das doenças.

A escolha por uma única data de avaliação deve-se ao objetivo do trabalho, que constituiu em compreender o padrão quanto a distribuição espacial da doença em campo, considerando a estrutura dos Sistemas Agroflorestais (SAFs) associada a cultura do cupuaçuzeiro (*T. grandiflorum*).

Em cada área de estudo foram demarcadas 12 linhas de plantio, com até 25 plantas por linha, totalizando um gradil de 300 plantas presentes e ausentes por área avaliada. Os dados binários (“0” ou “1”) foram registrados linha por linha, numerando-se cada planta sadia ou doente, respectivamente, conforme a disposição no campo, o que permitiu a construção dos 06 (seis) Mapas de Distribuição Espacial e posteriormente a análise de incidência e dos padrões de distribuição e dispersão espacial.

As informações foram registradas em planilhas de campo e posteriormente digitalizadas em software de planilha eletrônica (Microsoft Excel®) para tabulação e organização dos dados. A proporção de sintomas observados visualmente nas plantas doentes, baseou-se em escala diagramática, a exemplo da adaptada de Borges *et al.* (2019), composta por níveis de severidade e na escala específica para cultura do cupuaçuzeiro, adaptadas de Laranjeira *et al.* (2005) e Oliveira *et al.* (2017).

No estudo, observou-se apenas a parte aérea da planta, caracterizando-a como doente, aquelas com sintomas acima de 25%. As avaliações foram realizadas *in loco*, por seis observadores (as) treinados (as), incluindo o (a) produtor (a) rural e condições de luminosidade semelhantes, evitando variações subjetivas.

Contabilizou-se como árvores doentes, as que apresentaram os sintomas típicos da doença como: ponteiros e plantas mortas, folhas murchas e secas, coloração amarelada, exsudações, cancrios, desfolhamento, hipertrofia, suas combinações, dentre outros. Os seis avaliadores foram previamente instruídos e treinados, bem como, responsáveis por fazer a asserção das notas a cada planta, enquanto outro era responsável por anotar os valores atribuídos em uma planilha.

Desta forma, a incidência da doença em cada área foi calculada a partir da fórmula: $I = D/T$ (T para número total de árvores na parcela e D para número total de árvores doentes), expressa em porcentagem.

Para o Índice de Dispersão por distribuição binomial, cada área de estudo foi dividida em quadrats com agrupamento de dois tamanhos, sendo um de quatro plantas (2 plantas x 2 plantas) com 72 quadrats e o outro de seis plantas (3 plantas x 2 plantas) e 48 quadrats, computando-se dentro de cada tamanho de quadrat, o número de plantas doentes. A partir das contagens, calculou-se, utilizando o Programa Excel®, a variância observada V_{obs} e a variância binomial V_{bin} , estimada entre quadrats de diferentes tamanhos em cada área ou simplesmente Índice de Dispersão (Laranjeira, 1997 e Bergamin Filho *et al.*, 2004). Esse método também está fundamentado nos trabalhos clássicos de Elliot (1977, 1983) e Krebs (1989, 1999), que consolidaram sua aplicação em estudos ecológicos básicos e aplicados.

Ainda, o fundamento teórico deste índice baseou-se na distribuição de Poisson, que representa o modelo de referência para padrões aleatórios. Em uma distribuição Poisson, a variância é igual à média; portanto, $ID = 1$, considera-se que o padrão espacial é aleatório e não se rejeita H_0 . Segundo Campbell e Madden (1990) e Bergamin Filho *et al.* (2004), quando $ID < 1$ indica padrão espacial regular, $ID = 1$ padrão espacial aleatório ou ao acaso e $ID > 1$ padrão espacial agregado. Valores de índice de dispersão maiores que 1 indicam que a variância excede o esperado sob Poisson, caracterizando agregação; enquanto valores menores que 1 sugerem uniformidade, padrão típico de populações vegetais com espaçamento regular ou com forte competição interespecífica e intraespecífica. A hipótese H_0 de padrão espacial ao acaso ou aleatório com probabilidade ou incidência média constante foi testada pela aplicação do teste do qui-quadrado ($\chi^2_{tab5\%}$ (Elliot, 1983): $0,5 [1,645 + (2 (N-1) - 1)0,5]^2$). Se $\chi^2_{obs} > \chi^2_{tab}$: Rejeita-se o ajuste da distribuição (Elliot, 1983).

Segundo Laranjeira (1997), o termo “foco” refere-se a uma área delimitada onde ocorre o agrupamento de plantas afetadas, podendo representar tanto fontes primárias de infecção quanto zonas com condições favoráveis ao estabelecimento e disseminação da doença. Tais focos exercem influência direta sobre o padrão de propagação subsequente, uma vez que delimitam regiões com maior potencial de transmissão e avanço da epidemia dentro da área cultivada. Neste estudo, a ADEF baseou-se na população amostral total apresentada nos mapas de distribuição espacial da doença, utilizando-os para delimitação e quantificação dos focos. Considerou-se foco, todo agrupamento de plantas com sintomas que apresentam proximidade imediata em qualquer dessas direções (Adjacência ortogonal (4-direções) e Adjacência total (8-direções)), caracterizando a contiguidade epidemiológica dentro da malha de plantio.

Com base nessa definição, foram avaliados os parâmetros estruturais quanto ao número de focos unitários (NFU); número de focos não unitários (NFNU), o número total de focos (NFT); o número de plantas por foco não unitário (NPFNU), o número médio de plantas por foco (NMPF); o índice de forma dos focos (IFF), índice de compactação dos focos (ICF), índice de forma de focos não unitários (IFFNU) e o índice de compactação de focos não unitários (ICFNU), cujo resultados apresentados na Tabela 07.

De acordo com Tumura (2011), valores de IFF = 1,0 indicam focos isodiamétricos, ou seja, com distribuição equilibrada entre linhas e colunas. Valores superiores a 1,0 sugerem focos mais alongados na direção entre as linhas de plantio, enquanto valores inferiores a 1,0 indicam alongamento ao longo da própria linha de plantio. Para o índice de compactação (ICF), valores próximos de 1,0 refletem alta agregação e compactação dos focos, revelando a proximidade entre as plantas afetadas dentro do mesmo agrupamento e os menos compactos, valores menores (Nelson, 1996).

Cada foco foi caracterizado pelas dimensões de sua extensão, considerando o número máximo de linhas (lf) e colunas (lc) ocupadas. A partir desses valores, estimou-se os índices segundo as fórmulas propostas por Silva *et al.* (2016). A estrutura foi quantificada pelo índice médio de forma de focos (IFF) e pelo índice médio de compactação de focos (ICF), através das equações:

- $IFF = [\sum(lf_i / lc_i)]/NF$ em que: valores de IFF = 1,0 indicam focos isodiamétricos; valores de IFF > 1,0 indicam focos com maior comprimento na direção entre as linhas de plantio; valores de IFF < 1,0 indicam focos com maior comprimento na direção da linha de plantio.
- $ICF = [\sum(NPF_i / lc_i * lf_i)]/NF$ em que: valores de ICF próximos a 1,0 indicam focos mais compactos, isto é, maior agregação e proximidade entre todas as plantas pertencentes ao foco (TUMURA, 2011).

Todos os cálculos foram realizados no ambiente Microsoft Office Excel®, permitindo a tabulação e análise quantitativa dos resultados. De acordo com Tumura (2011), valores de IFF = 1,0 indicam focos isodiamétricos, ou seja, com distribuição equilibrada entre linhas e colunas. Valores superiores a 1,0 sugerem focos mais alongados na direção entre as linhas de plantio, enquanto valores inferiores a 1,0 indicam alongamento ao longo da própria linha de plantio. Para o índice de compactação (ICF), valores próximos de 1,0 refletem alta agregação

e compactação dos focos, revelando a proximidade entre as plantas afetadas dentro do mesmo agrupamento e os menos compactos, valores menores (Nelson, 1996).

Dessa forma, a combinação entre IFF e ICF permite interpretar tanto o formato geométrico quanto o grau de coalescência dos focos, fornecendo uma representação detalhada da estrutura espacial da doença e sua dinâmica evolutiva dentro do sistema de cultivo.

Quanto aos padrões espaciais da doença, estes foram estudados nas linhas de plantio através do teste de Run e teste de Doublet, conforme proposto por Bergamin *et al.*, (2004). Os dados de plantas doentes e sadias nas linhas de plantio foram coletados ordenadamente, representando cada planta e atribuindo-se o sinal de (1) para plantas doentes e (0) para plantas sadias. As análises foram realizadas, de forma separada em cada uma das 12 linhas de plantio delimitadas por área e em todas as seis áreas estudadas, totalizando 72 linhas e 1.630 plantas entre sadias e doentes, das quais compuseram os seis mapas de distribuição espacial.

Segundo Elliott (1977), um dos primeiros autores a aplicar o teste de Runs em estudos ecológicos, definiu que em Run é qualquer sequência contínua de valores iguais (“1” = doente e “0” = sadio) e possibilita inferir o processo gerador da distribuição, comparando o número observado de Runs com o número esperado sob completa aleatoriedade. Com isso, após identificar o número de plantas doentes (1) e sadias (0), calculou-se o número esperado de Runs pela fórmula em linha: $E(R) = 1 + 2m(N-m)/N$.

Na sequência, determinou-se a variância do número esperado de Runs: $S^2(R) = 2m(N-m)[2m(N-m) - N] / [N^2(N-1)]$ e os valores standardizados com base na distribuição normal: $[R + 0,5 - E(R)] / S(R)$. A decisão do teste estatístico para o padrão espacial encontrado seguiu as regras: H_0 (Padrão espacial aleatório ou ao acaso) e H_1 (Padrão espacial agregado). Se, $ZR < -1,64$ ($P=0,05$) rejeita-se H_0 e aceita-se H_1 a 5% de significância. Quando $ZR \geq -1,64$ ($P=0,05$) aceitou-se H_0 e rejeitou-se H_1 a 5% de significância. Onde R: número de Runs; m: número de plantas doentes; N: número de plantas na linha; s(R) desvio padrão (Bergamin Filho *et al.*, 2004).

Em sua formulação clássica, o número esperado de Doublets no trabalho foi calculado por $E(D) = m(m-1)/N$. A base de dados para realização do teste foi a mesma aplicada no teste de Run. Os dados de plantas doentes e sadias nas linhas de plantio foram coletados ordenadamente representando cada planta e atribuindo-se o sinal de (1) para plantas doentes e (0) para plantas sadias. Cada *Doublet* foi formado por um par de plantas doentes adjacentes e contabilizado com o valor 1. O número total de *Doublets*, entendido como o número observado D, foi obtido pelo somatório dos números individuais de *Doublets*. O número

esperado de *Doublets* $E(D)$ e a variância $S^2(D)$ associada foram calculados. Para obter-se um valor padronizado, criou-se a variável Z_D , com base na distribuição normal e para cada par de valores D e $E(D)$, calculou-se um valor Z_0 com a fórmula. A análise foi realizada utilizando as seguintes fórmulas: $E(D) = m(m-1) / N$; $s^2(D) = [m(m-1)[N(N-1) + (2N(m-2) + N(m-2)(m-3) - (N-1)m(m-1))] / N^2(N-1)]$ e $ZD = [(D + 0,5 - E(D)) / s(D)]$, onde: D : número de *Doublet* ; m : número de plantas doentes; N : número de plantas na linha; $s(D)$ desvio padrão (Bergamin Filho *et al.*, 2004).

Para a conclusão do teste estatístico, foram consideradas as seguintes regras: H_0 = Padrão espacial de plantas doentes aleatório (ao acaso) e H_1 = Padrão espacial de plantas doentes agregado. Quando $Z_D > 1,64$ ($P=0,05$) rejeitou-se H_0 , considerando padrão agregado e aceitou-se H_1 a 95% quando $ZD = < 1,64$ ($P=0,05$) para padrão ao acaso. A existência de padrão espacial de plantas doentes agregado indica que há a dispersão do patógeno e propagação da doença, planta a planta.

4.0 Resultados e Discussão

4.1. Incidência da Doença (I)

A incidência de doenças em plantas de cupuaçu (*T. grandiflorum*) representa um dos principais desafios fitossanitários na produção dessa espécie amazônica, amplamente cultivada para a obtenção de polpa e sementes. Para Souza *et al*, 2007, o interesse do estudo no padrão espacial está na localização das plantas doentes, que são os eventos observados, em determinada área, talhão, pomar ou povoamento florestal. A Incidência (I) foi calculada pela relação entre o número de plantas doentes e o número total de plantas avaliadas nas áreas estudadas, conforme apresentado na Tabela 05.

Tabela 05. Incidência de plantas doentes encontradas nas seis áreas de estudo.

Área	Total de Plantas	Plantas Doentes	Incidência (%)
1	281	64	22,77 % (baixa)
2	224	106	47,32 % (média)
3	278	138	49,64 % (média)
4	251	144	57,37 % (alta)
5	265	110	41,50 % (média)
6	263	204	77,56 % (alta)
Média geral	—	—	49,36 %

Os resultados revelam que a incidência apresentou percentuais diferentes entre as áreas analisadas, com média geral de 49,36%, indicando heterogeneidade espacial na distribuição do patógeno dentro dos Sistemas Agroflorestais (SAFs) estudados. A Área I apresentou baixa incidência (22,77%), indicando nível inicial da doença. As Áreas II e III apresentaram níveis moderados de incidência (47,32% e 49,64%), sugerindo que a doença já se encontra em fase de expansão, com provável presença de focos secundários. A Área VI exibiu alta incidência (57,37%), caracterizando um padrão mais intenso, apontando que mais da metade das plantas avaliadas apresentaram sintomas, indicando elevada pressão de inóculo. A Área V também mostrou incidência intermediária (41,50%), o que pode representar uma área de transição entre zonas menos e mais afetadas.

Por fim, a Área VI se destacou com incidência crítica (77,56%), configurando um cenário de epidemia local. A elevada densidade de plantas doentes indica forte agregação da

doença, podendo estar associada a fatores abióticos, arranjo agroflorestal ou proximidade entre plantas suscetíveis. Porém, os testes e as análises estatísticas subsequentes confirmarão as agregações em seus diferentes níveis ou a presença de aleatoriedade ou distribuição de Poisson.

A Figura 06 apresenta os mapas de distribuição espacial das plantas doentes em cada área estudada, tornando possível e de imediato, visualizar as áreas de maior e menor incidência, como a Área VI, com seus 77,56% e a Área I com 22,77% de plantas doentes.

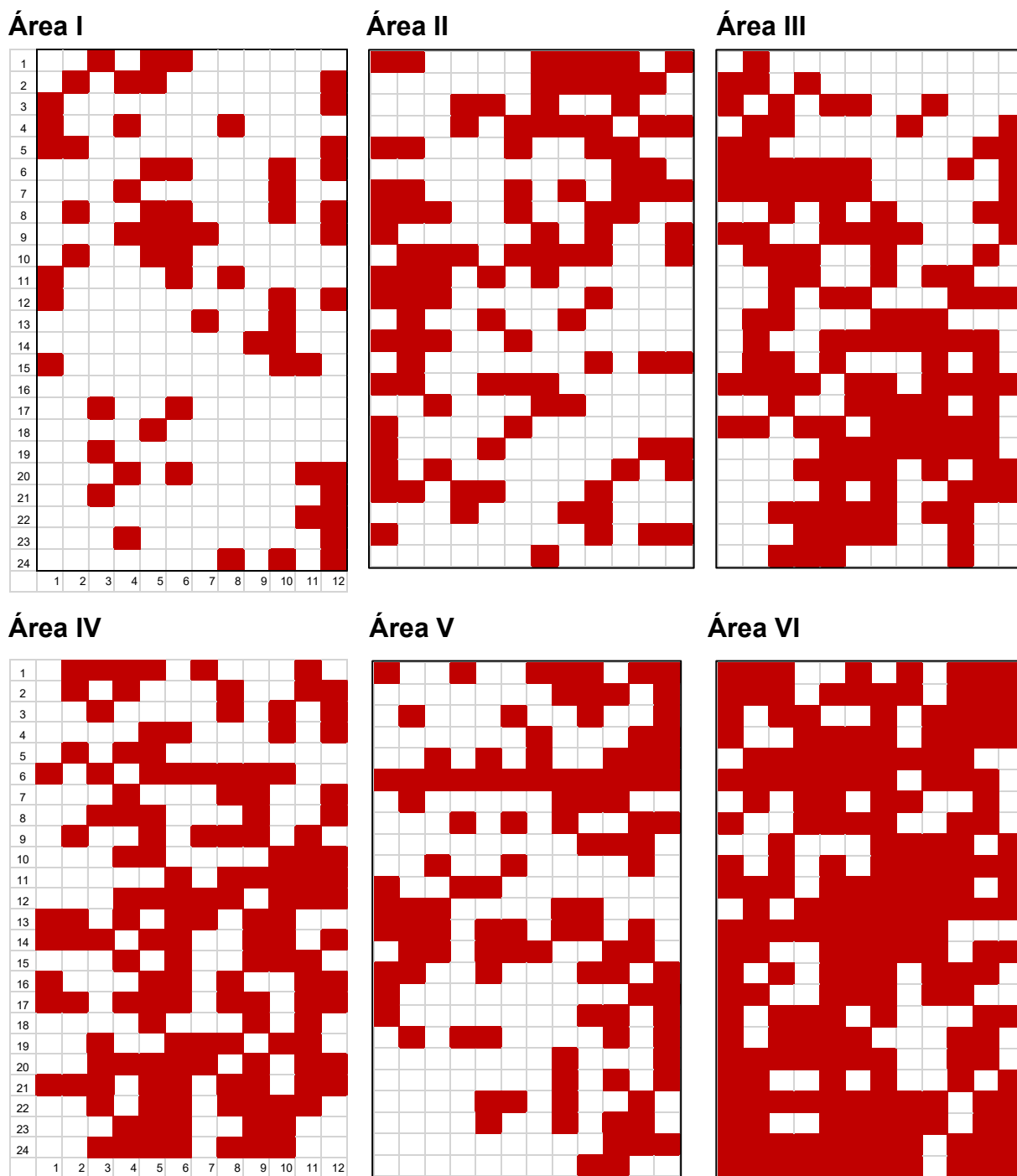


Figura 06. Mapas da distribuição espacial de plantas doentes nas áreas de estudo.

4.2. Índice de Dispersão (ID) por Distribuição Binomial

Os resultados apresentados na Tabela 06 demonstram que o ID para os quadrats 2 x 2 e 3 x 2 confirmam um padrão de distribuição espacial agregado para as Áreas I, II, III, VI e V e um padrão levemente uniforme a aleatória para a Área VI no quadrat 2 x 2 e levemente agregada no quadrat 3 x 2.

Tabela 06. Valores do ID e padrão de distribuição espacial.

Área	I (%)		Índice de dispersão (I.D.)		χ^2 calculado		Padrão de distribuição espacial	
	QUADRAT		QUADRAT		QUADRAT		QUADRAT	
	2x2	3x2	2x2	3x2	2x2	3x2	2x2	3x2
1	22,78	22,78	1,41	1,49	99,87	69,86	Padrão agregado	Padrão agregado
2	47,32	47,32	1,29	1,57	91,68	73,70	Padrão agregado	Padrão agregado
3	49,64	49,64	1,54	2,03	95,51	109,47	Padrão agregado	Padrão agregado
4	57,37	57,37	1,37	1,73	97,71	81,37	Padrão agregado	Padrão agregado
5	41,51	41,51	1,51	1,82	106,98	85,37	Padrão agregado	Padrão agregado
6	77,57	77,57	0,92	1,02	65,58	48,02	Padrão aleatório	Padrão aleatório

(I) Incidência

A Área VI apresentou o maior valor de incidência, acompanhado de índices de dispersão próximos a 1 (I.D. = 0,92 no quadrat 2×2 e 1,02 no quadrat 3×2), sugerindo que, diferentemente das demais áreas, a doença encontra-se em um padrão mais aleatório ou tendendo à regularidade. Esse comportamento pode estar associado à saturação do sistema, quando a proporção de plantas doentes é muito alta, o padrão espacial tende a perder agregação, como descrito por Vale *et al.* (2004).

Nas demais áreas, os valores de I.D. entre 1,29 e 1,54 no quadrat 2×2, e entre 1,49 e 2,03 no quadrat 3×2, indicam agregação de focos, sendo mais evidente na Área III para o quadrat 3×2 (I.D. = 2,03). Essa área também apresentou o terceiro maior valor de I% (49,64%), sugerindo que a expansão dos focos já formados ainda está em curso, com possível coalescência parcial entre estes. A literatura mostra que I.D. maiores em quadrats maiores (como 3×2)

indicam que os focos possuem tamanhos relativamente amplos, abrangendo mais de uma unidade amostral (Laranjeira, 1997; Elliott, 1983).

Com isso, os valores de ID das áreas I, II, III, IV e V foram significativamente superior a 1, o que indica que a doença apresenta um padrão espacial agregado, rejeitando-se H_0 , enquanto que a área VI apresentou valores de ID bem próximos a 1, aceitando-se H_0 e a distribuição de Poisson, mesmo sendo levemente inferior no quadrat 2 x 2 e também levemente superior no quadrat 3 x 2. Pelo teste do χ^2 calculado, observou-se que nessa mesma área, padrão espacial da doença é aleatório, pois foi a única área em que $\chi^2_{tab5\%}$ foi maior que o χ^2_{obs} .

A aplicação do teste estatístico qui-quadrado, $ID = (n-1) S^2/\bar{x}$, onde n é o número de quadrats, sob a hipótese nula de aleatoriedade espacial, permitiu testar formalmente se o padrão observado diferia de uma Poisson. Trabalhos clássicos como os de Pielou (1977) e Southwood e Henderson (2000) detalham amplamente este teste e sua interpretação, reforçando sua validade e limitações metodológicas. A hipótese nula no estudo foi a de que o padrão espacial observado era aleatório e a hipótese alternativa foi de padrão espacial agregado.

De modo geral, a avaliação da intensidade da doença (I%) e dos padrões espaciais, obtidos pelos índices de dispersão (I.D.) e valores de qui-quadrado calculado (χ^2), permitiram uma compreensão detalhada da dinâmica epidemiológica nas seis áreas avaliadas. Com isso, observou-se que todas as áreas, exceto a Área VI no quadrat 2x2, apresentaram valores de I.D. superiores a 1, indicando padrão espacial agregado. Esse achado é consistente com a literatura, que aponta que doenças de etiologia fúngica em culturas perenes frequentemente demonstram agregação devido a fatores como microclima, fonte de inóculo localizada e dispersão limitada (Campbell e Madden, 1990; Madden *et al.*, 2007).

Ao mesmo tempo, a intensidade da doença (I%), que variou de 22,78% (Área I) a 77,57% (Área VI), demonstrou que a epidemia se encontra em diferentes estágios entre as áreas. Os valores de χ^2 reforçam as interpretações. Em praticamente todas as áreas, o χ^2 permanecendo acima do valor crítico esperado para aleatoriedade indica não independência entre as plantas doentes, reforçando o padrão agregado. Isso é particularmente marcado na Área V ($\chi^2 = 106,98$ no quadrat 2x2), sugerindo focos bem definidos e estruturados. O comportamento da Área III no quadrat 3x2 ($\chi^2 = 109,47$) também é sintomático de alta agregação e possível presença de micro epicentros de inóculo. Um ponto importante a ser destacado é a consistência entre quadrats de diferentes tamanhos. Em epidemias com focos bem estabelecidos, espera-se que quadrats maiores apresentem I.D. mais altos devido à incorporação de porções inteiras de focos, ao passo que quadrats menores podem fragmentar essas unidades e suavizar a agregação (Ferreira *et al.*, 2009).

Essa tendência é observada nas Áreas II, III, IV e V, reforçando a hipótese de focos estruturados, cuja origem pode estar ligada à dispersão splash-borne (gota d'água), comum em doenças de cupuaçuzeiro causadas por fungos como *Calonectria* e *Moniliophthora*. A Área 1 apresentou menor I (22,78%), porém com I.D. >1, mostrando que, apesar da baixa incidência, o inóculo inicial está se comportando de forma agregada, típico de epidemias em estágio inicial quando os focos emergem próximos às fontes primárias (Campbell & Madden, 1990). Esse padrão é relevante, pois indica que intervenções precoces nessa área podem ser especialmente eficientes para retardar o crescimento epidêmico.

Dessa forma, os resultados revelam três cenários distintos entre as áreas: a) Áreas de alta incidência e baixa agregação (Área VI), pois refletem epidemias em estágio avançado, com saturação e distribuição mais homogênea; b) Áreas de incidência intermediária e alta agregação (Áreas III, IV e V), das quais indicam focos bem desenvolvidos, ainda possivelmente expandindo; e c) Áreas de baixa incidência porém agregadas (Áreas I e II), que sugerem fase inicial da epidemia, com distribuição de focos ainda bem delimitada. Em conjunto, os índices mostram que a maior parte das áreas apresenta padrão espacial agregado, típico de epidemias de doenças foliares, de solo e estruturais em fruteiras amazônicas, e que intervenções por área devem considerar a fase epidemiológica distinta de cada ambiente, reforçando a importância de análises espaciais em programas de manejo.

Segundo Southwood e Henderson (2000), a agregação é particularmente intensificada quando organismos dependem de recursos distribuídos de forma irregular, ou quando a dispersão de propágulos ocorre predominantemente a curta distância, como é comum para muitas espécies arbóreas e arbustivas tropicais. Pielou (1977), Krebs (1999) e Campbell e Madden (1990), sustentam que mesmo com alta incidência da doença, no caso observado na Área VI, a distribuição poderia ser aleatória se a doença estivesse espalhada ao acaso pelo talhão, como em processos de contaminação difusa, vetores amplamente móveis ou múltiplas fontes primárias espalhadas. Ao mesmo tempo, a aleatoriedade depende da independência entre eventos, não da frequência absoluta. A incidência alta não impede aleatoriedade, apenas reduz contraste visual e padrões epidemiológicos aleatórios podem ocorrer em infecções primárias homogêneas.

4.3. Análise da Dinâmica e Estrutura de Focos (ADEF)

Foram avaliados os parâmetros estruturais quanto ao número de focos unitários; número de focos não unitários, o número total de focos; o número de plantas por foco não unitário, o número médio de plantas por foco; o índice de forma dos focos, índice de compactação dos

focos, índice de forma de focos não unitários e o índice de compactação de focos não unitários, cujo resultados apresentados na Tabela 07.

Tabela 07. Dinâmica e Estrutura de Focos (Áreas de I a VI).

ADEF	NFU	NFNU	NFT	NPF	NMPF	IFF	ICF	IFFNU	ICFNU
Área I	10	13	23	59	4,54	0,831	0,836	0,855	0,692
Área II	4	12	16	106	8,83	1,169	0,699	1,225	0,598
Área III	2	0	2	142	71	0,74	0,483	0,74	0,483
Área IV	0	5	5	152	30,4	0,979	0,753	0,979	0,753
Área V	5	6	11	106	17,6	0,789	0,705	0,948	0,627
Área VI	0	1	1	214	214	0,48	0,713	0,48	0,713

NFU: número de focos unitários. NFNU: número de focos não unitários. NFT: número total de focos. NPFNU: número de plantas por foco não unitário. NMPF: número médio de plantas por foco. IFF: índice de forma dos focos. ICF: índice de compactação dos focos. IFFNU: índice de forma de focos não unitários. ICFNU: índice de compactação de focos não unitários (ICFNU).

As seis áreas avaliadas revelaram padrões espaciais distintos da doença, refletindo diferentes processos de dispersão, progressão e formação de focos. A Área I demonstrou um padrão composto por focos pequenos e relativamente fragmentados, com NFT = 23 e NMPF = 4,54 plantas por foco, sendo 10 unitários e 13 não unitários, totalizando 59 plantas afetadas. A presença de dez focos unitários sugere um processo de infecção distribuído, possivelmente associado à dispersão moderada em curta distância. Os índices IFF (0,831) e ICF (0,836) indicam focos de forma intermediária e compactação mediana, alinhando-se ao que Madden *et al.* (2007) descrevem como “padrões de baixa alongação e moderada agregação” e também descrito por Vale *et al.* (2004).

Na Área II, embora haja apenas 16 focos, o número total de plantas afetadas é elevado (NPF = 106). O tamanho médio dos focos (NMPF = 8,83) indica maior expansão interna e menor fragmentação. O índice de forma IFF (1,169) aponta alongação dos focos ou focos alongados entre linhas, resultado que pode refletir dispersão mais dirigida ou assimétrica, possivelmente associada a ventos, topografia ou manejo. Esse padrão é semelhante ao descrito por Bergamin Filho e Amorim (2011). Madden *et al.* (2007) destacam que focos alongados são característicos de epidemias sujeitas a forças externas de transporte do inóculo. A compactação reduzida (ICF = 0,699) reforça esse padrão.

A Área III configurou um cenário epidemiológico altamente peculiar, com apenas dois focos (NFT = 2), ambos extremamente extensos (NPF = 142), resultando o tamanho médio de

(NMPF = 71). É o 2º maior entre as áreas, exceto pela Área VI. Segundo Amorim *et al.* (2011), “grandes focos contínuos indicam forte agregação espacial, sugerindo transmissão planta-a-planta ou progressão contígua da infecção” e para Amorim, Rezende e Bergamin Filho (2011), grandes focos únicos são típicos de epidemias avançadas com fronteiras bem definidas e progressão radial. O índice IFF de 0,740 confirma alongamento na própria fila e o ICF = 0,483, evidenciando compactação e agregação interna e estrutura coesa do foco. Esse tipo de padrão é típico de epidemias avançadas, em que a doença já se estabeleceu e progride por contiguidade.

Na Área IV, o arranjo epidemiológico mostrou NFT = 5 e NPF = 152, com NMPF = 30,4. Os valores intermediários de IFF (0,979) e ICF (0,753) caracterizam focos bem formados, isodiamétricos, bem estabelecidos, de alta agregação, mas menos extensos que os da Área III. Essa configuração sugere estágios intermediários da epidemia, conforme proposto por Vale *et al.* (2004), em que “focos médios e compactos representam áreas em expansão, porém ainda delimitadas”.

A Área V exibiu 11 focos e um total de 106 plantas doentes, com NMPF = 17,60. Os valores de IFF (0,789) e ICF (0,705) indicam focos com estrutura relativamente equilibrada, situando-se entre compactação e fragmentação. Esse cenário é semelhante ao descrito em estudos de distribuição espacial de doenças em agroecossistemas heterogêneos (Laranjeira, 1997), nos quais múltiplos focos de tamanhos variados coexistem e revelam um mosaico epidemiológico composto por eventos primários e secundários.

Por fim, a Área VI, apresentou um padrão mais extremo entre todas as áreas: um único foco (NFT = 1) contendo 214 plantas doentes. Esse resultado, com NMPF = 214, caracteriza um foco massivo, contínuo e altamente consolidado. Os índices IFF (0,480) e ICF (0,713) revelam forma relativamente compacta, ainda que, com certa alongação. Essa estrutura epidemiológica é interpretada como um foco avançado em estado de saturação, similar ao que Madden *et al.* (2007) descrevem como “foco de alta coesão”, no qual a doença se dissemina em bloco, sem formação de novos focos periféricos. Tal padrão sugere forte contiguidade e baixa ocorrência de dispersão para longas distâncias, sendo característico de epidemias maduras.

Os resultados da análise revelaram uma relação inversamente proporcional entre a incidência da doença e o número total de focos (NF): nas áreas com a maior incidência (Áreas III, IV, V e VI), o número de focos foi o menor verificado, enquanto a Área I, com a menor incidência, apresentou o maior número de focos. Essa mesma dinâmica foi observada para os focos unitários, onde uma menor incidência ocasionou uma maior quantidade de focos isolados. Essa relação inversa, onde o aumento da incidência leva à diminuição do número de focos, está em concordância com os achados de Jesus Junior e Bassanezi (2004) em estudos sobre a Morte

Súbita dos Citros (MSC), que constataram que o número máximo de focos ocorria em talhões com incidência de 18%, diminuindo progressivamente à medida que a incidência total aumentava, sugerindo a coalescência dos focos dispersos em grandes áreas de agregação; a única exceção observada foi a Área II, que, apesar de uma incidência intermediária, apresentou um número elevado de focos. Diferentes agentes causais levam a diferentes tipos de focos, incidência e coalescência.

Em resumo, os valores de IFF foram menores que 1 nas Áreas I, III, IV, V e IV, ficando apenas a Área II, com 1,169. Indicando que em sua maioria, os focos apresentaram padrão de crescimento ao longo da linha (Alongados). Para a Área II, esse crescimento se deu entre as linhas (Direcional/Linear). A área I, por apresentar fragmentação e focos pequenos, pode ser considerado como um padrão isodiamétrico fragmentado, apesar do $IFF = 0,831$, pois apresenta orientação espacial dispersa, com muitos focos pequenos, fragmentados e distribuídos, direcionamento do crescimento curto, circunscrito, sem elongação definida com forma geométrica isodiamétrica, pois os focos têm baixa extensão e pouca tendência a alongamento. A Área IV, com IFF DE 0,979, se aproxima bastante do crescimento isodiamétrico, correspondendo a focos médios e grandes moderadamente isodiamétricos.

A Área VI representa o extremo máximo do padrão isodiamétrico: um foco único e saturado. Com foco único e massivo poderia se considerar como grande estrutura isodiamétrica de alta coesão, por apresentar orientação espacial com apenas 1 foco de 214 plantas e consolidado, direcionamento do crescimento contíguo e massivo, expansão coesa sem formação de novos focos e forma geométrica isodiamétrica, pela forte compactação e baixa elongação ($IFF = 0,480$).

No entanto, Jesus Junior e Bassanezi (2004) chamam a atenção para a explicação da forma e da compacidade dos focos, devendo esta ser realizada com certa cautela, principalmente em situações com incidências relativamente elevadas, como é o caso da maioria das áreas avaliadas neste trabalho, haja vista que normalmente, quando a incidência de plantas doentes é relativamente alta, com valor acima de 35%, é comum que um foco ocupe todas as linhas ou plantas de uma linha do talhão e que o seu crescimento só ocorra em uma direção por falta de mais linhas ou plantas.

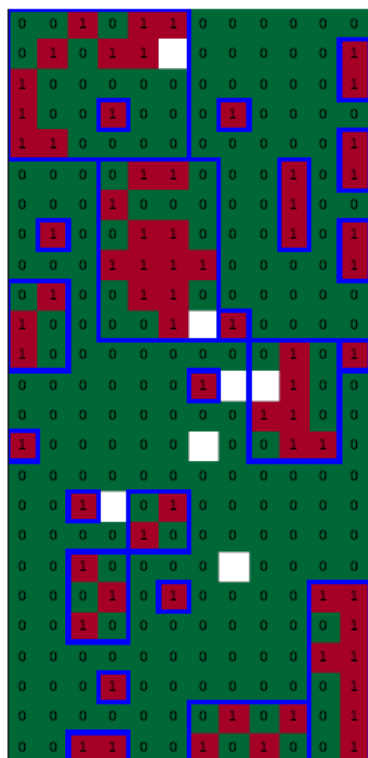
Laranjeira, Amorim e Bergamin, (1998) também verificaram essa influência da forma do talhão em análises de talhões com CVC. Isso corrobora para o resultado de aleatoriedade encontrado na área IV para o Índice de Dispersão com Incidência de 77% e significância de 0,05 no teste Qui-Quadrado. Quanto ao ICF, este variou de 0,483 para a área III a 0,827 para a área I, porém, os índices entre as áreas II, IV, V e VI, ficaram em torno de 0,72, apresentando,

em sua maioria, tendência de serem focos compactos. No entanto, não foi observada a relação quanto a incidência e o ICF entre as seis áreas avaliadas. A orientação espacial e o direcionamento do crescimento dos focos podem ser observados, de forma resumida, na Tabela 08.

Tabela 08. Orientação espacial e direcionamento do crescimento dos focos.

Área	Orientação Espacial dos Focos	Direcionamento do Crescimento	Interpretação Epidemiológica
I	Focos pequenos, distribuídos e fragmentados; padrão bem dividido entre unitários e não unitários. Altamente agregado.	Crescimento curto e circunscrito. Alongado na própria linha.	Indica alta ocorrência de eventos primários; dispersão de curta distância; epidemia em fase inicial ou moderada, com diversos pontos de inoculação
II	Focos alongados, mais extensos e menos compactos. Altamente agregado.	Direcionamento linear nas linhas, possivelmente influenciado por vento, manejo ou gradiente ambiental	Dispersão direcionada; epidemia influenciada por fatores externos; focos poucos, porém com grande capacidade de expansão
III	Focos muito grandes e agregados; estrutura contínua	Crescimento contíguo, radial e coeso, sem fragmentação. Alongado na própria linha.	Epidemia avançada; dispersão planta-a-planta predominante; foco massivo indica progressão consolidada e estável
IV	Focos médios a grandes, moderadamente compactos; agregação bem definida	Expansão contínua e uniforme, com estrutura interna organizada. Alongado na própria linha e aproximação isodiamétrica.	Representa estágio intermediário da epidemia; contiguidade forte, mas ainda com certa organização linear interna
V	Focos irregulares, equilibrando agregação e fragmentação	Crescimento misto: coexistem focos pequenos (iniciais) e focos maiores (estabelecidos). Alongado na própria linha.	Epidemia heterogênea; múltiplas rotas de dispersão; indica tanto novos eventos quanto expansão local
VI	Um único foco gigantesco (214 plantas) altamente compacto.	Crescimento massivo, contínuo e centrado em um único foco; expansão por contiguidade intensa	Situação mais avançada entre todas as áreas; epidemia madura com foco saturado; ausência de novos focos indica baixa dispersão a longa distância

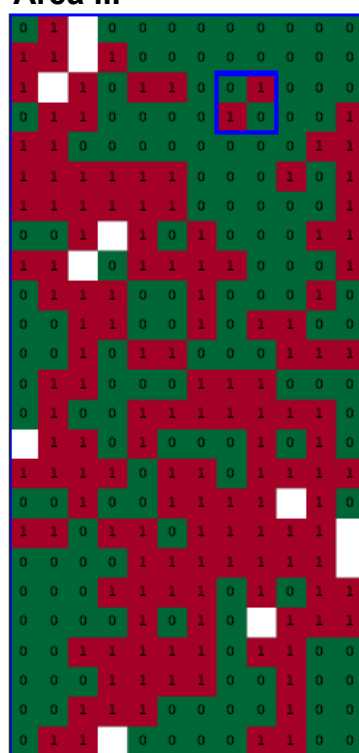
Área I



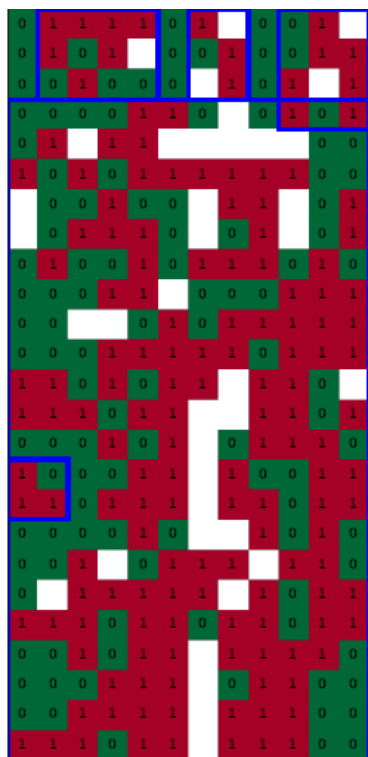
Área II



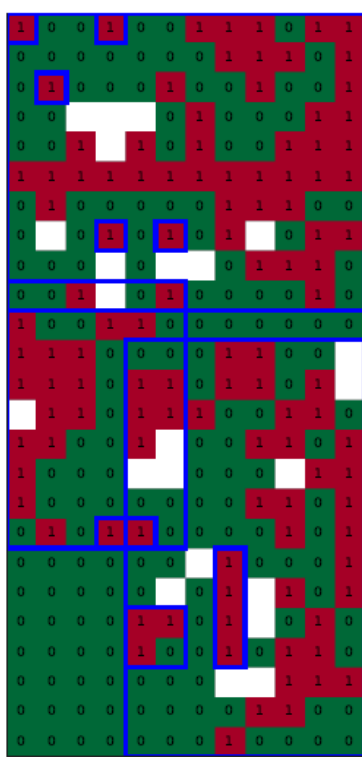
Área III



Área IV



Área V



Área VI

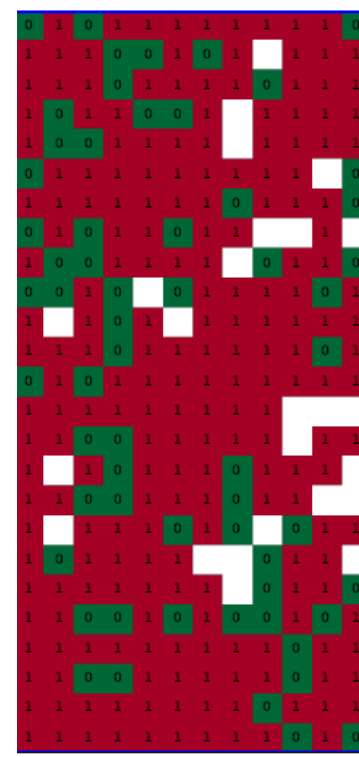


Figura 07. Mapas da Distribuição Espacial dos Focos (NFU e NFNU).

De maneira geral, a análise conjunta indicou três padrões epidemiológicos predominantes: Alta agregação e focos massivos para as Áreas III, IV e VI, com destaque absoluto para a Área VI, cujo único foco indica epidemia plenamente estabelecida. Focos fragmentados e numerosos, associados à formação de novos eventos primários para as áreas I e V e poucos focos, porém alongados e expandidos para a área II, possivelmente influenciada por gradientes ambientais ou fatores de dispersão direcionada.

Em síntese, a análise revisada confirma que a Área VI representa o caso mais avançado da epidemia, enquanto as outras áreas refletem estágios variados de desenvolvimento dos focos. Esses resultados reforçam a importância de métricas espaciais no diagnóstico epidemiológico, conforme defendido por Campbell e Madden (1990) e Vale *et al.* (2004), permitindo inferir mecanismos de infecção, intensidade de progresso e potenciais estratégias de manejo. Ferreira *et al.* (2009), ao estudarem a Mancha Manteigosa, analisaram detalhadamente a dinâmica dos focos, bem como a estrutura e o arranjo espacial da doença, evidenciando que a compreensão da formação e expansão desses focos é essencial para o desenvolvimento de estratégias eficientes de monitoramento e controle.

4.4. Análise de *Run* e de *Doublet*

Na Tabela 09 é possível afirmar que a distribuição espacial ao acaso está presente em todas as áreas estudadas e na maioria das linhas analisadas, sob a não rejeição de H_0 a 95% de probabilidade.

Tabela 09. Padrão Espacial da Doença pela Análise de Run.

Área	Linhas	R	E (R)	S ² (R)	DP	m	N	Z _R	Padrão
I	1	7	10,12	3,09	1,76	6	25	-1,49	Aleatório
	2	9	7,72	1,60	1,27	4	25	1,41	Aleatório
	3	9	9,00	2,33	1,53	5	25	0,33	Aleatório
	4	14	10,92	3,84	1,96	7	24	1,83	Aleatório
	5	8	11,08	3,81	1,95	7	25	-1,32	Aleatório
	6	10	11,67	4,48	2,12	8	24	-0,55	Aleatório
	7	6	6,22	1,00	1,00	3	23	0,28	Aleatório
	8	7	6,22	1,00	1,00	3	23	1,28	Aleatório
	9	4	4,67	0,43	0,65	2	24	-0,26	Aleatório
	10	7	11,88	4,48	2,12	8	25	-2,07	Agregado
	11	7	6,28	0,94	0,97	3	25	1,26	Aleatório
	12	10	13,48	5,97	2,44	13	25	-1,22	Aleatório

II	1	12	11,96	4,96	2,23	14	23	0,24	Aleatório
	2	8	11,91	5,15	2,27	12	22	-1,50	Aleatório
	3	5	9,84	3,85	1,96	7	19	-2,21	Agregado
	4	7	8,22	2,64	1,63	5	18	-0,44	Aleatório
	5	10	8,47	3,45	1,86	7	15	1,09	Aleatório
	6	9	10,90	4,41	2,10	8	21	-0,67	Aleatório
	7	7	9,56	3,80	1,95	11	18	-1,05	Aleatório
	8	10	7,43	2,68	1,64	9	14	1,87	Aleatório
	9	6	8,06	2,67	1,63	12	17	-0,95	Aleatório
	10	7	12,25	5,01	2,24	9	24	-2,12	Agregado
	11	11	9,84	3,85	1,96	7	19	0,84	Aleatório
	12	14	12,25	5,01	2,24	9	24	1,00	Aleatório

III	1	11	11,67	4,48	2,12	8	24	-0,08	Aleatório
	2	9	12,67	5,41	2,33	14	24	-1,36	Aleatório
	3	9	10,55	3,88	1,97	15	22	-0,53	Aleatório
	4	14	12,48	5,47	2,34	11	23	0,86	Aleatório
	5	11	13,00	5,50	2,35	15	25	-0,64	Aleatório
	6	17	13,48	5,97	2,44	12	25	1,65	Aleatório
	7	7	13,32	5,81	2,41	14	25	-2,41	Agregado
	8	9	11,08	3,81	1,95	7	25	-0,81	Aleatório
	9	8	13,00	5,74	2,40	12	24	-1,88	Agregado
	10	10	13,00	5,74	2,40	12	24	-1,04	Aleatório
	11	11	13,48	5,97	2,44	12	25	-0,81	Aleatório
	12	9	12,30	5,29	2,30	10	23	-1,22	Aleatório

IV	1	9	10,74	3,87	1,97	7	23	-0,63	Aleatório
	2	13	12,25	5,01	2,24	9	24	0,56	Aleatório
	3	13	12,48	5,47	2,34	11	23	0,44	Aleatório
	4	16	12,30	5,29	2,30	13	23	1,82	Aleatório
	5	13	10,00	3,13	1,77	18	24	1,98	Aleatório
	6	6	10,74	3,87	1,97	16	23	-2,16	Agregada
	7	6	6,83	2,56	1,60	7	12	-0,21	Aleatório
	8	9	7,22	1,91	1,38	14	18	1,65	Aleatório
	9	8	10,74	3,87	1,97	16	23	-1,14	Aleatório
	10	8	11,18	4,45	2,11	14	22	-1,27	Aleatório
	11	6	12,67	5,41	2,33	14	24	-2,65	Agregada
	12	10	12,30	5,29	2,30	13	23	-0,78	Aleatório

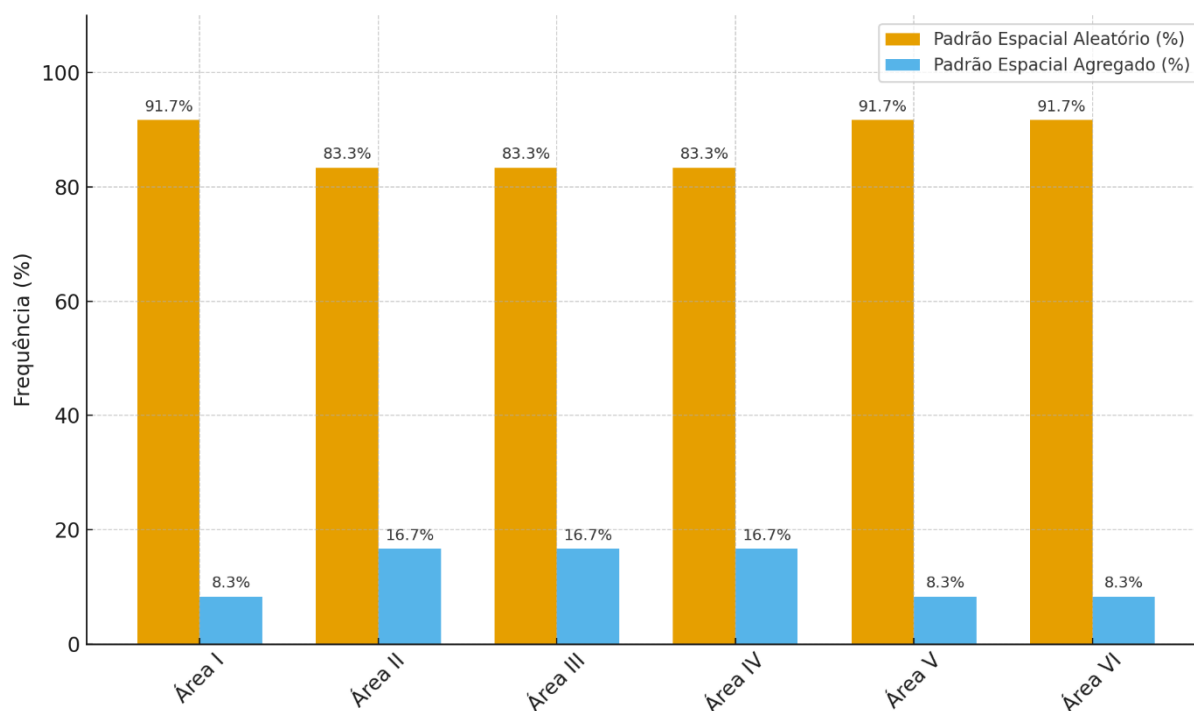
V	1	6	11,67	4,48	2,12	8	24	-2,44	Agregada
	2	9	11,67	4,48	2,12	8	24	-1,02	Aleatória
	3	7	10,00	3,13	1,77	6	24	-1,41	Aleatória
	4	8	8,62	2,52	1,59	5	21	-0,07	Aleatória

	5	11	11,96	4,96	2,23	9	23	-0,21	Aleatória
	6	11	10,33	3,89	1,97	7	21	0,59	Aleatória
	7	6	8,83	2,43	1,56	5	23	-1,49	Aleatória
	8	9	13,00	5,74	2,40	12	24	-1,46	Aleatória
	9	12	11,48	4,96	2,23	11	21	0,46	Aleatória
	10	14	12,92	5,66	2,38	13	24	0,67	Aleatória
	11	12	13,48	5,97	2,44	13	25	-0,40	Aleatória
	12	9	11,96	4,96	2,23	14	23	-1,10	Aleatória

VI	1	10	9,00	2,33	1,53	20	25	0,98	Aleatório
	2	7	8,73	2,48	1,57	17	22	-0,78	Aleatório
	3	16	12,52	5,05	2,25	16	25	1,77	Aleatório
	4	11	13,00	5,50	2,35	15	25	-0,64	Aleatório
	5	5	4,67	0,43	0,65	22	24	1,28	Aleatório
	6	10	8,92	2,38	1,54	19	24	1,03	Aleatório
	7	13	2,92	0,08	0,28	23	24	38,29	Aleatório
	8	5	8,50	2,57	1,60	15	20	-1,87	Agregado
	9	9	9,73	3,21	1,79	16	22	-0,13	Aleatório
	10	6	7,55	1,73	1,31	18	22	-0,80	Aleatório
	11	7	6,18	1,03	1,02	19	22	1,30	Aleatório
	12	7	9,40	3,27	1,81	14	20	-1,05	Aleatório

R: Runs observados. E (R): Runs esperados. S²: Variância. DP: Desvio Padrão. m: plantas doentes na linha. N: Total de plantas na linha. Z_R: Valor standardizado.

Gráfico 01. Gráfico representa os valores de frequência (%) por área estudada para o padrão espacial da doença nas linhas de plantio para o teste Run.



Ao associar a Tabela 09 e o Gráfico 01 é possível constatar que para todas as áreas e suas respectivas linhas de plantio, a hipótese de padrão espacial aleatório pode ser aceita, visto que $Z_R < -1,64$ e frequência superior a 80%. O padrão espacial agregado apresentou uma frequência abaixo de 17%, neste caso, indicando que há a dispersão do patógeno e propagação da doença, planta a planta.

Em culturas perenes, Gottwald *et al.* (1995) demonstraram que o teste de Runs foi capaz de distinguir padrões agregados associados à dispersão curta de doenças bacterianas em citros, contribuindo para compreender a dinâmica de epidemias como o cancro cítrico. Já em sistemas agroflorestais, Araújo *et al.* (2020) aplicaram o teste de Runs para caracterizar a distribuição da vassoura-de-bruxa em cupuaçuzeiro, concluindo que o padrão fortemente agregado refletia a contiguidade da infecção e a baixa mobilidade do inóculo no ambiente denso e sombreado do SAF.

Quanto ao teste de Doublet, a ferramenta estatística foi utilizada para avaliar o grau de agregação em distribuições espaciais binárias, verificando especificamente a ocorrência de pares adjacentes de plantas doentes em uma sequência linear. Um Doublet foi definido como duas plantas doentes consecutivas (1–1), e sua frequência observada foi comparada com a frequência esperada sob a hipótese de completa aleatoriedade. A base de dados para realização do teste foi a mesma aplicada no teste de Run.

Segundo Campbell e Madden (1990), esse teste complementa o teste de Runs ao focar não na alternância entre estados, mas na formação local de pequenos agrupamentos, o que o torna sensível à detecção de agregação em microescala.

Analisando a Tabela 10 e o Gráfico 02, constatou-se que frequência da aleatoriedade ou distribuição espacial ao acaso é presente, porém com menor intensidade em todas as áreas estudadas, variando de 50 a 100%, sob a não rejeição de H_0 a 95% de probabilidade para as áreas I, IV, V e VI e com $Z_D = < 1.64$.

No entanto, as áreas II e III apresentam 50% de frequência para a distribuição espacial aleatória e agregada, variando $Z_D = < 1.64$ e $Z_D > 1.64$. Outro ponto que chama a atenção é a frequência de 100% para o padrão espacial aleatório da área VI com $Z_D = < 1.64$, cuja área apresenta índice de incidência de 77%, apenas um foco unitário (NFU) de 214 plantas doentes e índice de dispersão aleatório, resultante do teste qui-quadrado.

Tabela 10. Padrão Espacial da Doença pela Análise de Doublet.

Área	Linhas	D	E (D)	S ² (D)	DP	m	N	Z _D	Padrão
I	1	3	1,20	0,760	0,872	6	25	2,64	Agregado
	2	0	0,48	0,370	0,608	4	25	0,03	Aleatório
	3	0	0,80	0,560	0,748	5	25	-0,40	Aleatório
	4	0	1,75	0,970	0,985	7	24	-1,27	Aleatório
	5	3	1,68	0,958	0,979	7	25	1,86	Agregado
	6	3	2,33	1,150	1,072	8	24	1,09	Aleatório
	7	0	0,26	0,217	0,465	3	23	0,51	Aleatório
	8	0	0,26	0,217	0,465	3	23	0,51	Aleatório
	9	0	0,08	0,076	0,276	2	24	1,51	Aleatório
	10	5	2,24	1,142	1,069	8	25	3,05	Agregado
	11	0	0,24	0,202	0,450	3	25	0,58	Aleatório
	12	8	6,24	1,622	1,274	13	25	1,77	Agregado
II	1	7	7,91	1,407	1,186	14	23	-0,35	Aleatório
	2	8	6,00	1,429	1,195	12	22	2,09	Agregado
	3	4	2,21	1,008	1,004	7	19	2,28	Agregado
	4	2	1,11	0,661	0,813	5	18	1,71	Agregado
	5	2	2,80	0,960	0,980	7	15	-0,31	Aleatório
	6	4	2,67	1,156	1,075	8	21	1,71	Agregado
	7	7	6,11	1,118	1,058	11	18	1,31	Aleatório
	8	4	5,14	0,848	0,921	9	14	-0,70	Aleatório
	9	9	7,76	0,856	0,925	12	17	1,88	Agregado
	10	5	3,00	1,304	1,142	9	24	2,19	Agregado
	11	2	2,21	1,008	1,004	7	19	0,29	Aleatório
	12	2	3,00	1,304	1,142	9	24	-0,44	Aleatório
III	1	3	2,33	1,150	1,072	8	24	1,09	Aleatório
	2	9	7,58	1,511	1,229	14	24	1,56	Aleatório
	3	10	9,55	1,157	1,076	15	22	0,89	Aleatório
	4	4	4,78	1,474	1,214	11	23	-0,23	Aleatório
	5	10	8,40	1,540	1,241	15	25	1,69	Agregado
	6	4	5,28	1,602	1,266	12	25	-0,62	Aleatório
	7	11	7,28	1,602	1,266	14	25	3,33	Agregado
	8	3	1,68	0,958	0,979	7	25	1,86	Agregado
	9	8	5,50	1,554	1,247	12	24	2,41	Agregado
	10	7	5,50	1,554	1,247	12	24	1,60	Aleatório
	11	7	5,28	1,602	1,266	12	25	1,75	Agregado
	12	6	3,91	1,407	1,186	10	23	2,18	Agregado
IV	1	2	1,83	0,982	0,991	7	23	0,68	Aleatório
	2	2	3,00	1,304	1,142	9	24	-0,44	Aleatório
	3	4	4,78	1,474	1,214	11	23	-0,23	Aleatório

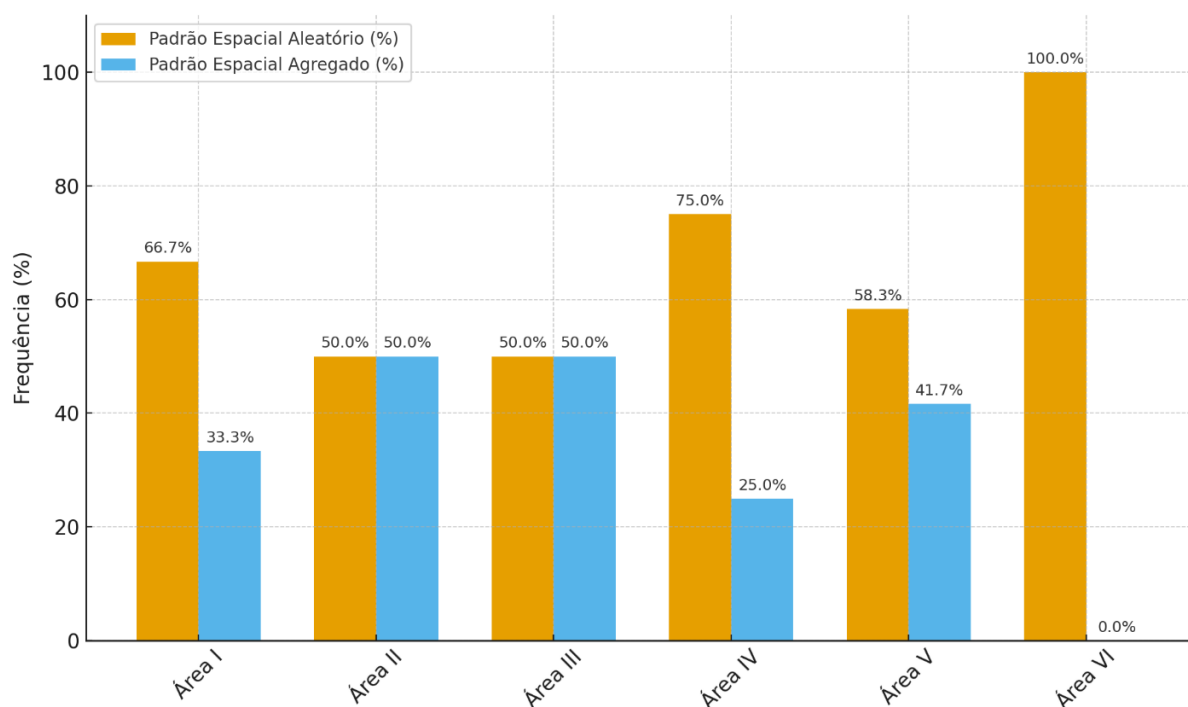
	4	4	6,78	1,474	1,214	13	23	-1,88	Aleatório
	5	11	12,75	0,970	0,985	18	24	-1,27	Aleatório
	6	12	10,43	1,155	1,075	16	23	1,92	Agregado
	7	3	3,50	0,795	0,892	7	12	0,00	Aleatório
	8	6	10,11	0,661	0,813	14	18	-4,44	Aleatório
	9	12	10,43	1,155	1,075	16	23	1,92	Agregado
	10	9	8,27	1,289	1,135	14	22	1,08	Aleatório
	11	11	7,58	1,511	1,229	14	24	3,19	Agregado
	12	7	6,78	1,474	1,214	13	23	0,59	Aleatório

V	1	5	2,33	1,150	1,072	8	24	2,95	Agregado
	2	4	2,33	1,150	1,072	8	24	2,02	Agregado
	3	3	1,25	0,774	0,880	6	24	2,56	Agregado
	4	1	0,95	0,617	0,785	5	21	0,70	Aleatório
	5	4	3,13	1,299	1,140	9	23	1,20	Aleatório
	6	2	2,00	1,000	1,000	7	21	0,50	Aleatório
	7	2	0,87	0,588	0,767	5	23	2,13	Agregado
	8	7	5,50	1,554	1,247	12	24	1,60	Aleatório
	9	5	5,24	1,372	1,171	11	21	0,22	Aleatório
	10	7	6,50	1,554	1,247	13	24	0,80	Aleatório
	11	7	6,24	1,622	1,274	13	25	0,99	Aleatório
	12	10	7,91	1,407	1,186	14	23	2,18	Agregado

VI	1	15	15,20	0,760	0,872	20	25	0,34	Aleatório
	2	12	12,36	0,803	0,896	17	22	0,15	Aleatório
	3	8	9,60	1,440	1,200	16	25	-0,92	Aleatório
	4	9	8,40	1,540	1,241	15	25	0,89	Aleatório
	5	18	19,25	0,209	0,457	22	24	-1,64	Aleatório
	6	13	14,25	0,774	0,880	19	24	-0,85	Aleatório
	7	20	21,08	0,076	0,276	23	24	-2,11	Aleatório
	8	10	10,50	0,829	0,910	15	20	0,00	Aleatório
	9	11	10,91	0,992	0,996	16	22	0,59	Aleatório
	10	13	13,91	0,602	0,776	18	22	-0,53	Aleatório
	11	12	15,55	0,404	0,635	19	22	-4,79	Aleatório
	12	9	9,10	1,006	1,003	14	20	0,40	Aleatório

D: Doublets observados. E (R): Doublets esperados. S²: Variância. DP: Desvio Padrão. m: plantas doentes na linha. N: Total de plantas na linha. Z_D: Valor estandardizado.

Gráfico 02. Gráfico representa os valores de frequência (%) por área estudada para o padrão espacial da doença nas linhas de plantio para o teste Doublet.



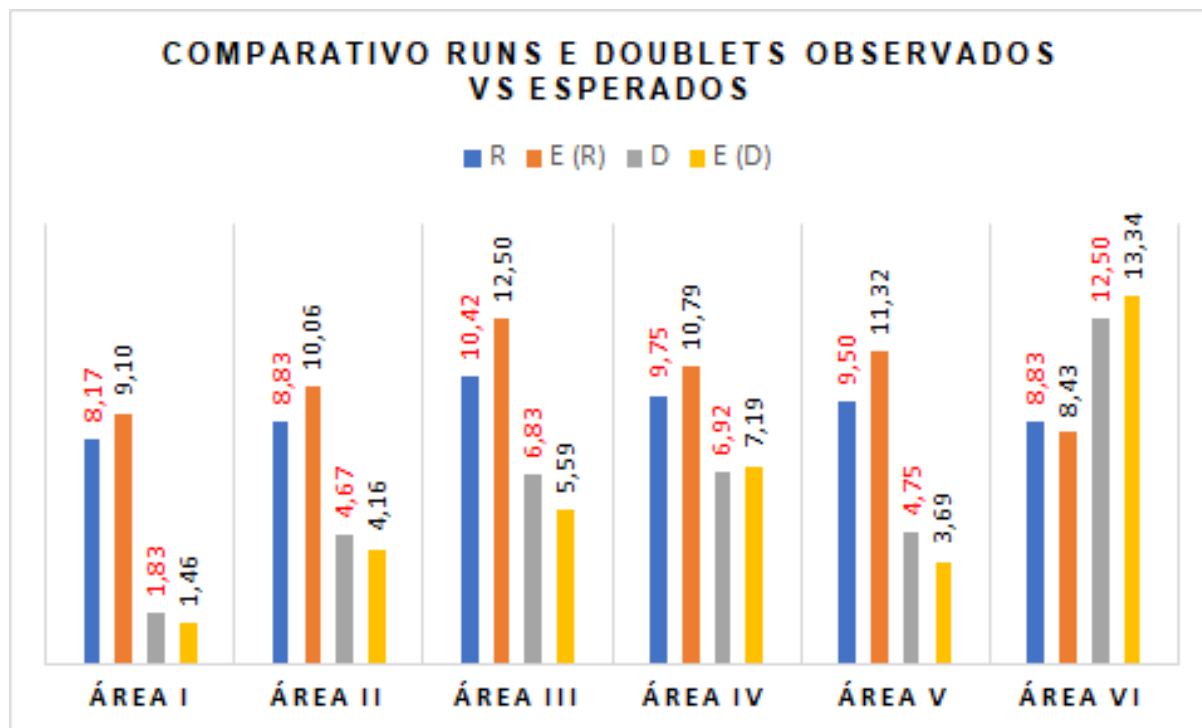
Comparando os resultados das análises de Run e Doublet, foi possível observar a concordância muito forte entre eles para as áreas I, IV, V e VI. Porém, para as áreas II e III, o teste de Run apresentou uma frequência de 83,3% para o padrão espacial aleatório, superior ao teste de Doublet, cuja probabilidade ficou em 50% para ambas as áreas. Para as áreas II e III, verificou-se que o teste de Doublet não esclareceu o padrão espacial da doença nas linhas de plantio. Mas quando associado ao teste de Run foi possível concordar com os padrões espaciais de aleatoriedade.

Nesse sentido, o teste de Runs forneceu uma visão mais ampla de aleatoriedade na disposição, enquanto o de Doublets foi mais sensível à ocorrência de pares consecutivos de sintomas, captando dependência espacial de curto alcance. Já para a área VI, o padrão espacial encontrado foi ao acaso ($Z_D \leq 1.64$), apesar de o número de Runs observados terem sido maior que o esperado (Gráfico 03), o que corrobora com os resultados obtidos para a mesma área quanto ao resultado do índice de dispersão.

Por fim, a integração dessas duas análises fortalece o diagnóstico epidemiológico da doença, conforme relata Bergamin Filho (2004), pois compara-se o número de Runs observados, sob a hipótese de que as plantas doentes estão distribuídas aleatoriamente, enquanto Doublet, tem o objetivo de analisar o padrão espacial em que a hipótese de nulidade

H_0 é aceita quando a sequência ordenada de plantas doentes é aleatória”. Dessa forma, a aplicação conjunta permite detectar diferentes formas de não-aleatoriedade ou pares consecutivos, oferecendo insight sobre possíveis causas de agrupamento, como dispersão primária, secundária ou padrões de manejo que favorecem o foco.

Gráfico 03. Média de Runs e Doublets observados e esperados.



As Áreas IV e VI divergiram entre as demais áreas quanto aos números de Runs e Doublets observados e esperados. As Áreas IV e VI apresentaram 6,92 e 12,50 Doublets observados menores que os esperados 7,19 e 13,34, enquanto a Área VI apresentou 8,83 Runs observados, maior que os esperados 8,84. No entanto, a aleatoriedade prevalece nestas duas áreas.

5.0 Caracterização Morfológica e Identificação Molecular

5.1. Identificação Molecular

A região ITS foi amplificada com sucesso para a maioria dos isolados analisados. Entretanto, para alguns isolados, não foi possível obter sequências confiáveis, em razão da baixa qualidade dos eletrogramas, caracterizada pela presença de elevado nível de ruído. Esse padrão pode estar relacionado à degradação do DNA, à baixa concentração do material genético ou à

presença inibidores da PCR. Ainda assim, a qualidade das sequências obtidas foi suficiente para a identificação taxonômica inicial em nível de gênero, não comprometendo os objetivos gerais desta etapa do estudo.

A partir da identificação preliminar baseada na região ITS, as análises subsequentes concentraram-se em grupos de isolados com maior relevância fitopatológica para o cupuaçuzeiro (*T. grandiflorum*). O dendrograma obtido a partir da região ITS, apresentado na Figura 08, a seguir, evidencia uma organização geral dos isolados em grupos filogenéticos compatíveis com os principais gêneros fúngicos representados na análise. A utilização conjunta de sequências de referência e dos isolados deste estudo permitiu um posicionamento filogenético inicial consistente dos táxons analisados.

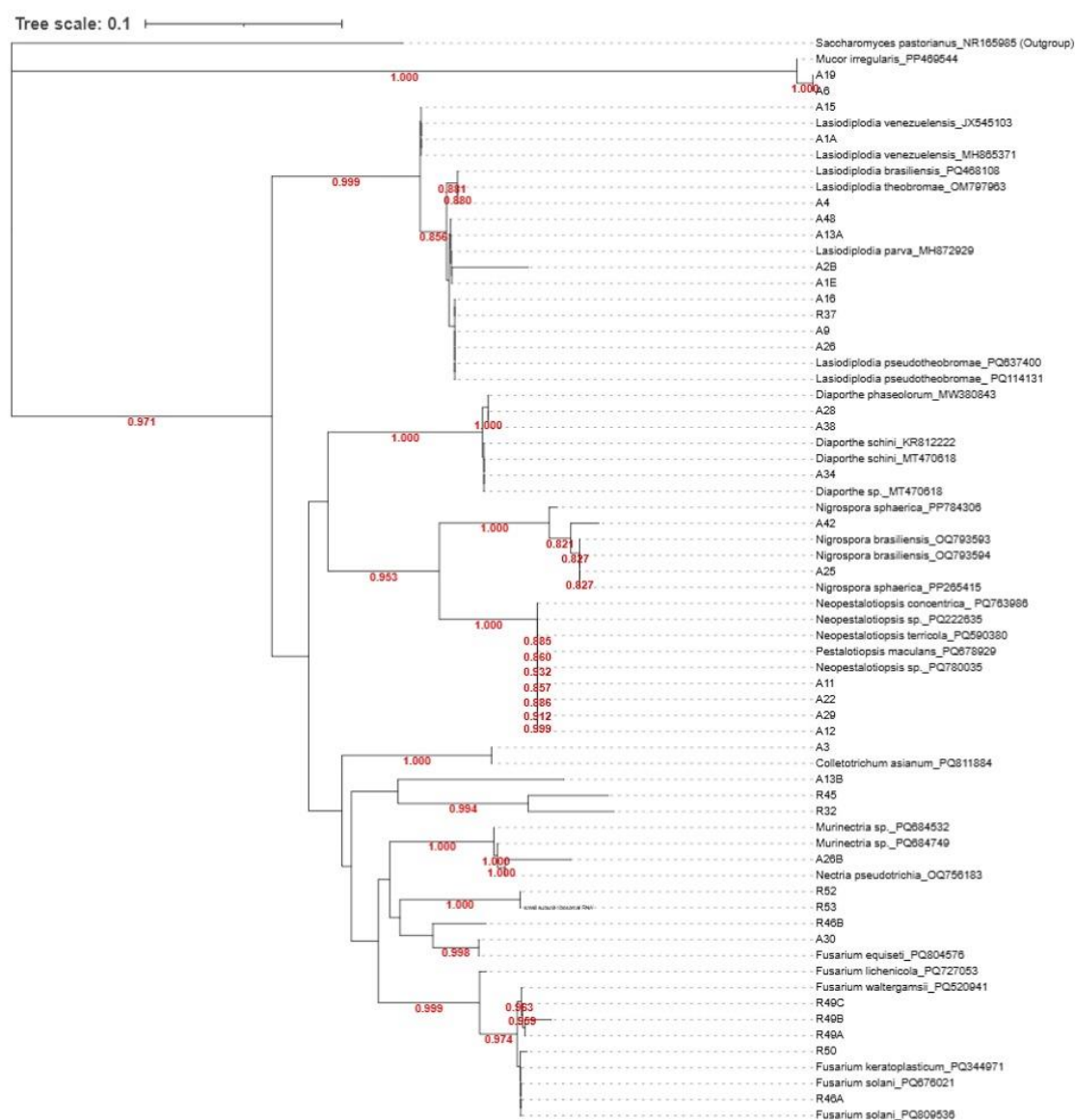


Figura 08. Dendrograma filogenético baseado na região ITS, construído a partir das sequências obtidas neste estudo. Uma sequência de *Saccharomyces pastorianus* foi utilizada como outgroup.

A região ITS mostrou-se eficiente como marcador de DNA barcoding, como era esperado, uma vez que combina regiões relativamente conservadas com porções mais variáveis, possibilitando a comparação entre sequências e a inferência de relações evolutivas, especialmente em nível genérico. É por esse motivo que optamos também por não utilizar outgroup na análise da região ITS. Testes preliminares com diferentes outgroups mostraram distorção na topologia da árvore, com posicionamento instável e ramos mal suportados, devido a grande variabilidade de gêneros presentes no nosso estudo.

De modo geral, o dendrograma baseado na região ITS revelou uma elevada diversidade de gêneros fúngicos associados ao cupuaçuzeiro, refletindo as condições ambientais características de regiões tropicais, como alta umidade, temperaturas elevadas e elevada complexidade ecológica. Esses fatores favorecem a colonização por diferentes grupos fúngicos, resultando em uma comunidade diversa, composta tanto por fungos endofíticos quanto por potenciais patógenos oportunistas.

Dentre os gêneros identificados, destacam-se *Mucor*, *Pestalotiopsis*, *Neopestalotiopsis*, *Nigrospora*, *Lasiodiplodia*, *Diaporthe*, *Calonectria*, *Neurospora*, *Murinectria*, *Fusarium*, *Colletotrichum*. A predominância foi para *Lasiodiplodia* sp. (31%), *Fusarium* sp. (11,5%). A maioria dos isolados com potencial patogênico pertence ao gênero *Lasiodiplodia*, evidenciado pela organização em ramos menores, onde os isolados se acoplam a diferentes espécies dentro do gênero.

Esse padrão reflete a proximidade filogenética entre os táxons e evidencia a diversidade intra-genérica, indicando que múltiplos isolados compartilham afinidade com distintas espécies de *Lasiodiplodia*, reforçando seu papel como grupo relevante em termos fitopatológicos para o cupuaçuzeiro. Para outros gêneros, observou-se o seguinte: os isolados A6 e A19 agruparam-se em um mesmo clado juntamente com a sequência de referência PP459544, indicando proximidade filogenética com base na ITS, porém adequada apenas para inferência em nível de gênero ou complexo de espécies, devido à limitada resolução do marcador.

De forma semelhante, os isolados A22, A29 e A11 formaram um clado associado aos gêneros *Pestalotiopsis* e *Neopestalotiopsis*, apresentando aproximadamente 90% de identidade com *Neopestalotiopsis* sp. e *Pestalotiopsis maculans*, evidenciando a interação de espécies próximas em um mesmo agrupamento. No gênero *Nigrospora*, o isolado A42 agrupou-se com sequências de *Nigrospora vesicularifera*, enquanto o isolado A25 se posicionou próximo a *Nigrospora brasiliensis*, indicando consistência do agrupamento segundo a resolução oferecida pela ITS.

O isolado R37 inseriu-se em um clado com sequência de *L. parva*. Dentro desse grupo, observou-se a formação de sub-clados distintos, refletindo a proximidade filogenética desses táxons na região ITS. O isolado A48 agrupou-se com sequências de *L. subglobosa*, sugerindo, inicialmente, afinidade filogenética com base nesse marcador. Os isolados A28, A34 e A38 agruparam-se dentro do gênero *Diaporthe*, com valores de suporte de 100%, sem definir a espécie, e indicando que o posicionamento é consistente apenas em nível genérico. O isolado R52 agrupou-se com sequências de *Calonectria parvispora*, enquanto o isolado A26B posicionou-se próximo a sequências de *Murinectria* sp., ambos compatíveis com a resolução do ITS.

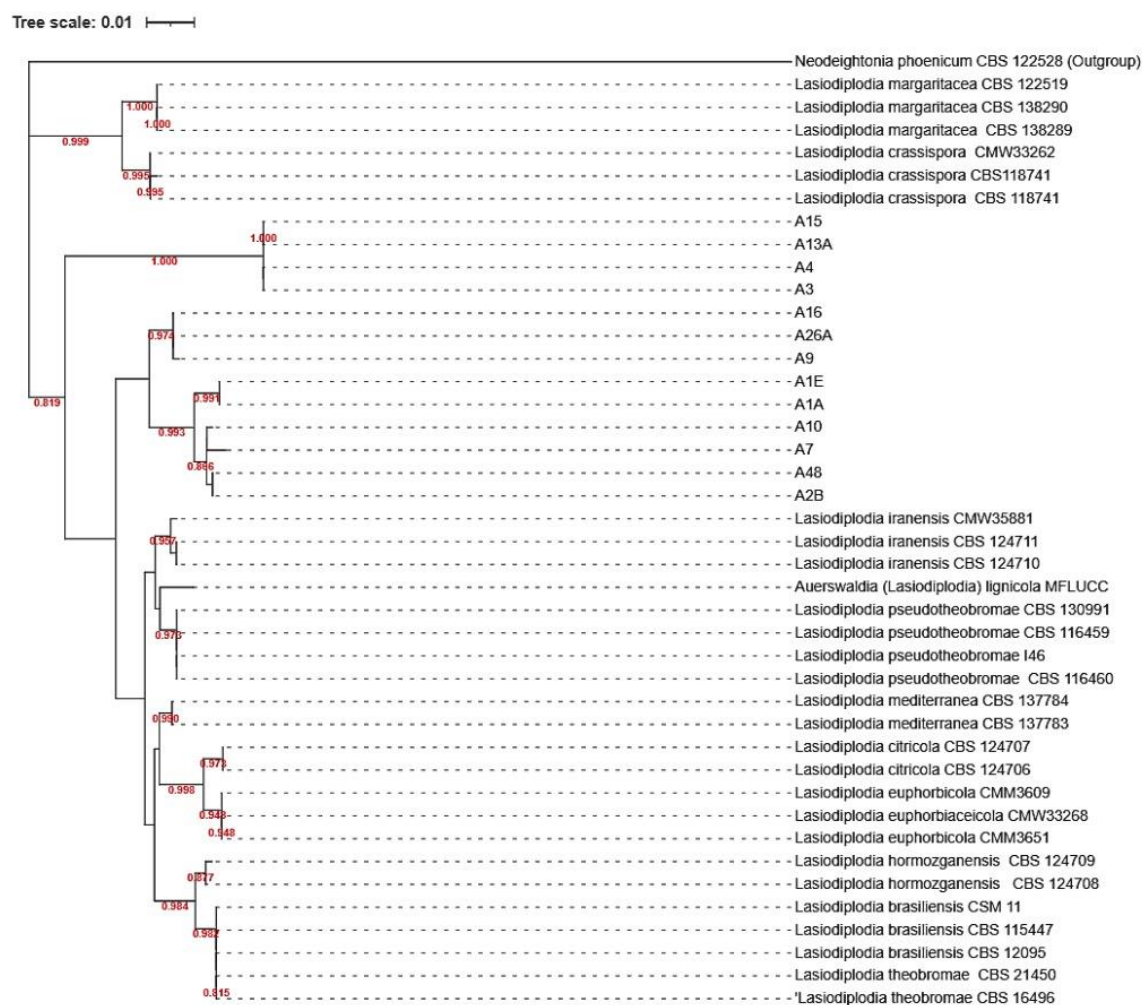


Figura 09. Dendrograma filogenético baseado no método *Neighbour-Joining* utilizando sequências das regiões β -tubulina e RPB2, obtido a partir de 1.000 réplicas de *bootstrap*. Os números nos ramos representam os valores de *bootstrap* variando de 0 a 1, em que valores próximos de 1 indicam forte suporte estatístico para os agrupamentos. *Neodeighonia phoenicum* foi utilizada como *outgroup*.

O isolado A3 agrupou-se com sequências atribuídas a *Colletotrichum asinum*, enquanto os isolados A46, A50, A49, A49B e A49C formaram um clado inserido no complexo *F. solani*, e o isolado A30 posicionou-se próximo ao complexo *F. equiseti*. A partir desses resultados, o foco foi direcionado para os principais organismos com potencial patogênico para o cupuaçu, *Lasiodiplodia* spp. e *Fusarium* spp.

Na Figura 09 acima, é apresentado o dendrograma dos isolados do gênero *Lasiodiplodia*, construído com base nas sequências das regiões β -tubulina e RPB2 concatenadas.

Os isolados obtidos neste estudo agruparam-se dentro do grande clado correspondente ao gênero *Lasiodiplodia*. Na análise filogenética concatenada, as sequências formaram dois clados irmãos, bem definidos e com alto suporte de bootstrap, sem intercalação com as sequências de referência disponíveis para *Lasiodiplodia*, indicando grupos geneticamente diferenciados, embora filogeneticamente próximos dessas espécies apresentadas na figura, conforme evidenciado pelo comprimento dos ramos.

O primeiro clado compreendeu os isolados, A15, A13A, A3 e A4, enquanto o segundo clado incluiu os isolados A16, A26A, A9, A1E, A1A, A10, A7, A48 e A2B, ambos aparecendo como grupos irmãos de clados que reúnem espécies descritas do complexo *L. theobromae*. Uma possível hipótese para a ausência de intercalamento entre as sequências deste estudo e as sequências de referência dentro dos clados é que os isolados analisados representam linhagens evolutivas distintas, possivelmente associadas a populações locais. Um estudo recente, produzido por Souza *et al.* (2025), que avaliou a patogenicidade de isolados de *Lasiodiplodia* spp. em cupuaçuzeiro no norte do Brasil, constatou que duas espécies pertencentes ao complexo *L. theobromae* — *L. theobromae* e *L. brasiliensis* — foram patogênicas às plantas, com base em análises das regiões do fator de alongação 1- α (*tef1- α*) e da β -tubulina.

Entretanto, as sequências obtidas neste estudo, para a região da β -tubulina, ainda não estavam disponíveis no GenBank para a comparação, devido à recente publicação. Na mesma linha, Huda-Shakirah *et al.* (2025), ao avaliarem a patogenicidade de isolados de *Lasiodiplodia* spp. em cacaueiro (*Theobroma cacao*), espécie filogeneticamente próxima ao cupuaçuzeiro, na Malásia, identificaram *Lasiodiplodia theobromae* como o agente causal da doença. Embora os autores tenham utilizado, em suas análises filogenéticas, isolados de referência também empregados no presente estudo, foi observado intercalamento entre as sequências em suas análises, enquanto tal convergência não foi verificada neste trabalho.

Esse resultado reforça a possível presença de variações sequenciais nos isolados aqui analisados. Contudo, deve-se considerar que os autores também utilizaram a região do fator de

elongação 1- α (*tefl- α*), marcador reconhecidamente mais informativo e com maior poder discriminatório do que a região da β -tubulina especialmente para a delimitação de espécies dentro do complexo *L. theobromae*.

A ausência de recombinação genética entre os isolados deste estudo e as sequências de referência de *Lasiodiplodia* depositadas em coleções como CBS e CMW pode indicar a existência de populações fúngicas geneticamente estruturadas. Essa estruturação pode estar associada a adaptações locais a hospedeiros ou ambientes específicos, bem como à presença de linhagens evolutivamente independentes (Belair et al., 2024).

Em *Lasiodiplodia*, a reprodução predominantemente clonal favorece a formação de clados bem definidos, com haplótipos estáveis e baixo fluxo gênico entre populações, resultando em desequilíbrio de ligação e ausência de recombinação detectável. Esse padrão é recorrente em *Botryosphaeriaceae* e já foi descrito para populações atribuídas a *L. theobromae*, nas quais linhagens geneticamente distintas permanecem segregadas, apesar da similaridade morfológica sugerindo isolamento genético (Ko et al., 2025).

Marcadores como β -tubulina e RPB2 têm sido amplamente utilizados em estudos de *Lasiodiplodia* e apresentam bom poder de discriminação intra e interespecífica, ou seja, dentro das espécies do gênero, contribuindo para a formação de agrupamentos consistentes dentro do gênero. Entretanto, diversos trabalhos apontam que esses locus quando empregados em combinações restritas, não resolvem de maneira adequada as fronteiras entre espécies filogeneticamente próximas, devido à baixa variabilidade interespecífica e à presença de polimorfismos compartilhados, o que pode resultar em clados pouco diagnósticos ou em topologias instáveis (Oliveira et al., 2024).

No contexto relatado acima, a ausência de dados para o marcador *tefl- α* (EF1- α), reconhecido como um dos loci mais informativos para a delimitação de espécies em *Lasiodiplodia*, representa uma limitação importante do presente estudo. A literatura recente recomenda abordagens multilocus combinando, pelo menos, β -tubulina *tefl- α* e RPB2 (frequentemente também ITS) para aumentar o poder discriminatório e melhorar a delimitação de espécies dentro do complexo *L. theobromae*.

A região da *calmodulina* foi utilizada de forma complementar às demais regiões gênicas na identificação de *Lasiodiplodia*, conforme recomendado em estudos multilocus para *Botryosphaeriaceae*; contudo, esse marcador ainda apresenta número limitado de sequências de referência depositadas em bancos de dados públicos para o gênero, com poucas entradas tipificadas para espécies dentro do complexo *L. theobromae*.

Para ampliar a representatividade taxonômica e tentar superar essa limitação, foram incluídos registros adicionais não tipificados, conforme descrito em revisões de alto impacto como *Studies in Mycology* que enfatizam a inclusão de sequências ex-tipo e não tipificadas devido à escassez de *cmdA* no GenBank. A árvore inferida abaixo, (Figura 10) a partir das sequências de *calmodulina* agrupou todos os isolados em subgrupos bem definidos e próximos de espécies descritas como *L. parva*, *L. euphorbiaceicola*, *L. pseudotheobromae* e *L. venezuelensis*, porém sem intercalamento direto com as sequências de referência dessas espécies.

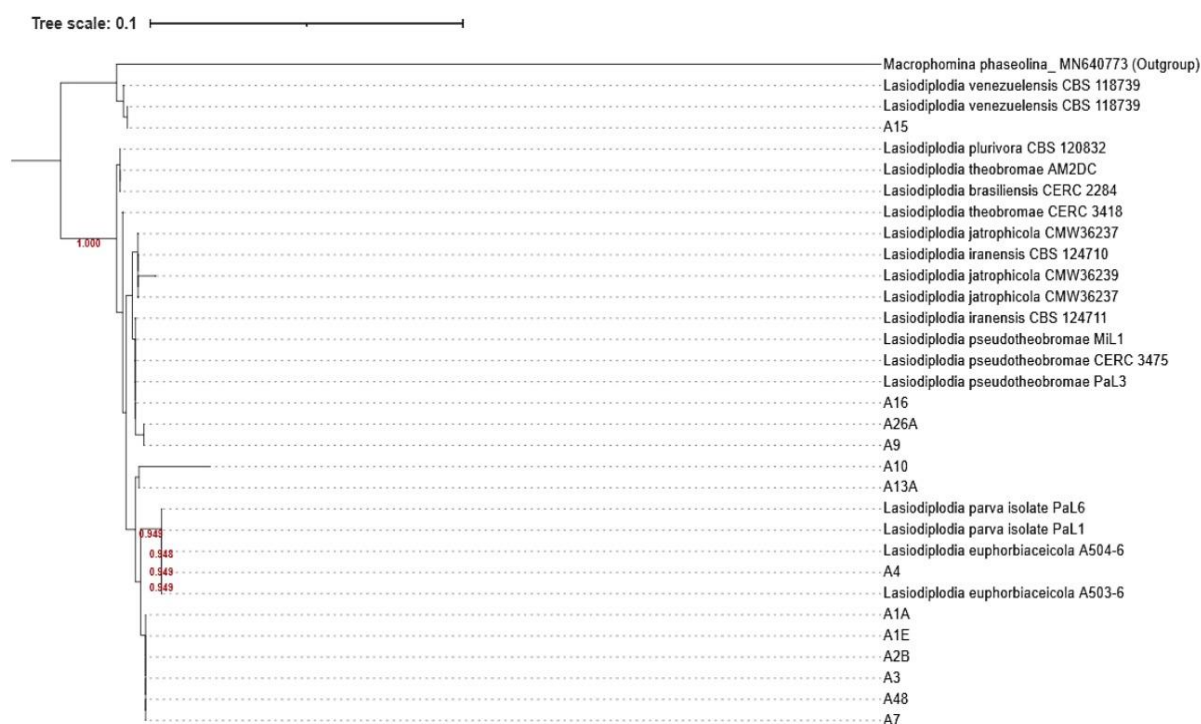


Figura 10. Dendrograma filogenético baseado no método *Neighbour-Joining* a partir de sequências da região *calmodulina* de isolados de *Lasiodiplodia*, com base em 1.000 réplicas de *bootstrap*. Os valores nos nós representam o suporte de *bootstrap* (0–1), sendo valores próximos de 1 indicativo de forte suporte estatístico para os agrupamentos. Uma sequência de *Macrophomina phaseolina* foi utilizada como *outgroup*.

Embora a faixa delimitante de bootstrap seja 0,6 — valor geralmente considerado suporte moderado —, o isolado A4 agrupou-se com sequências de *Lasiodiplodia euphorbiaceicola*, indicando afinidade genética com essa espécie. No entanto, não se agrupou com isolados de referência de estudos anteriores, sugerindo a existência de linhagens geneticamente diferenciadas.

Os isolados com os quais A4 se alinhou foram previamente descritos como causadores de danos em abacateiro (*Persea americana*) na China, corroborando a identidade do patógeno

em frutíferas. Os isolados A26A, A16 e A9 agruparam-se com sequências identificadas como *L. pseudotheobromae* e *L. iranensis*, reforçando o caráter inconclusivo desta região para a delimitação específica entre espécies de *Lasiodiplodia*. Para os demais isolados, não houve agrupamento com sequências de referência conhecidas, formando um único clado composto por A1A, A1E, A2B, A3, A48 e A7.

Esse padrão é consistente com a árvore gerada a partir da concatenação das regiões β -tubulina e *RPB2*, na qual esses isolados também se agruparam de maneira semelhante. O isolado A15 agrupou-se com sequências de *L. venezuelensis*, embora com suporte de bootstrap inferior a 0,6, indicando que esse agrupamento carece de respaldo estatístico robusto. *L. venezuelensis* foi descrita originalmente por Burgess *et al.* (2006) a partir de tecidos lenhosos vivos de *Acacia mangium* na Venezuela e, posteriormente, isolada de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* em outros estudos.

Diferentemente de outras espécies de *Lasiodiplodia* com distribuição amplamente documentada em regiões tropicais e subtropicais, *L. venezuelensis* até o momento apresenta uma distribuição geográfica mais restrita, com poucos relatos fora da Venezuela. Essa limitação, aliada ao fato de que muitos registros a descrevem como endófito ou patógeno latente (isolada de tecidos sem causar lesões evidentes ou sintomas quando reinoculada), sugere que a espécie desempenha um papel ecológico mais restrito do que outras do gênero, embora ainda possa ser patogênica sob determinadas condições.

Essas características reforçam a hipótese de evolução própria dos isolados deste estudo. No entanto, a análise de regiões adicionais do genoma se faz necessária para confirmar essa tendência e aprofundar a compreensão da diversidade filogenética observada.

Para *Fusarium* spp., a árvore consenso baseada nas regiões, *RPB2*, *cmdA* e β -tubulina é apresentada a seguir (Figura 11). Nessa análise, o isolado A30 agrupou-se filogeneticamente com *F. incarnatum* e *F. equiseti*, integrantes do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC), com suporte robusto de 100% de bootstrap nas análises concatenadas, refletindo elevada similaridade genética entre essas espécies.

O FSSC é um grupo complexo que compreende mais de 40 espécies filogenéticas, amplamente distribuídas em ambientes naturais e cultivados, diferenciáveis principalmente por seus perfis de metabólitos secundários, incluindo micotoxinas com relevância econômica e toxicológica (Wang *et al.*, 2019). Espécies do complexo exibem virulência variável, sendo descritas tanto como patógenos oportunistas quanto como endofíticos em diferentes hospedeiros. Por exemplo, *F. incarnatum* é conhecido por causar podridão de raízes (Lazarotto, 2014) e murcha em noqueira-pecã (*Carya illinoensis*) no sul do Brasil (Rolim *et al.*, 2022).

F. equiseti está associado a murcha em café (*Coffea arabica*) e a podridão seca em pimenta, demonstrando ampla adaptabilidade a diferentes plantas hospedeiras.

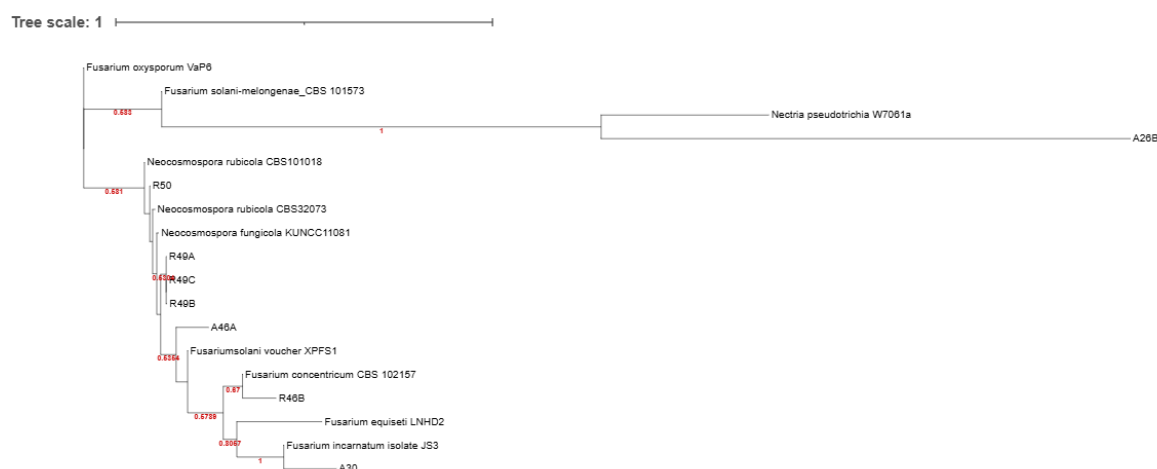


Figura 11. Dendrograma filogenético baseado no método Neighbour-Joining a partir de sequências concatenadas da região calmodulina (cmdA) β -tubulina e RPB2 de isolados de *Fusarium* spp., com base em 1.000 réplicas de bootstrap. Os valores nos representam o suporte de bootstrap (0–1), sendo valores próximos de 1 indicativos de forte suporte estatístico para os agrupamentos. Uma sequência de *Fusarium oxysporum* foi utilizada como outgroup.

Outras espécies do FIESC foram relatadas em pinhas - *Ananas comosus*- (Querino, 1992) com fusariose e em *Casuarina equisetifolia* (Balamurugan et al., 2019). Em plantações florestais, como de eucalipto e pinus, espécies de *Fusarium* contribuem significativamente para a podridão de raízes pós-plantio, especialmente em solos mal drenados ou sujeitos a estresse hídrico. Além disso, *F. incarnatum* e *F. equiseti* foram isolados de frutos de cacau (*Theobroma cacao*) apresentando antracnose, bem como de ramos com sintomas de dieback na Venezuela, frequentemente associados à morte súbita e à podridão pós-colheita, com maior intensidade quando há ferimentos mecânicos (Castillo *et al.*, 2022).

Estudos indicam que espécies do FSSC dominam a microbiota endofítica foliar de cacau em regiões da Indonésia e da América Latina, atuando como patógenos latentes que se tornam ativos sob condições de estresse, como alta umidade ou deficiências nutricionais (Schmidt, 2010). No Brasil, relatos recentes apontam para o potencial patogênico dessas espécies em viveiros de cacau, onde mudas infectadas podem apresentar murcha e redução de vigor (Sousa, 2021). Do ponto de vista filogenético, espécies do FSSC estão intimamente relacionadas ao gênero *Nectria*, uma vez que diversas espécies teleomórficas do complexo pertencem a este gênero, o que reforça a identificação do isolado A26B, associado a *Nectria pseudotrichia* (Yang *et al.*, 2018)

Essa relação destaca a importância de análises integradas de marcadores moleculares e informações morfológicas na delimitação de espécies dentro do complexo, considerando sua ampla diversidade genética e capacidade de adaptação a diferentes ambientes e hospedeiros. Apesar dos resultados consistentes para os A26B e A30, os demais isolados não puderam ser identificados com precisão. Nesse contexto, a região do gene *Tef1-α* se mostra importante, assim como em *Lasiodiplodia* spp. pois é amplamente utilizada como marcador molecular para a identificação e delimitação de espécies de *Fusarium*. Sua alta variabilidade entre espécies próximas, combinada com conservação relativa dentro de uma mesma espécie, permite uma discriminação mais confiável do que regiões mais conservadas. Assim, a utilização do *Tef1-α* conferiria maior robustez e precisão à identificação dos isolados, auxiliando na resolução de agrupamentos filogenéticos.

5.2 Caracterização macro morfológica

A caracterização morfológica demonstrou a variabilidade quanto a Velocidade de Crescimento (VC) dos fungos avaliados em condições laboratoriais, refletindo diferenças fisiológicas intrínsecas entre os gêneros e sua capacidade de colonização do meio de cultura (Tabela 11 e Figura 12). A variabilidade de crescimento entre os diferentes gêneros partiu de muito rápido (1 dia, com crescimento micelial médio de 11,75 mm em 3 horas) para *Neurospora* sp. a 11 dias para *Colletotrichum* sp., *Dwiroopa* sp., *Fusarium* sp. e *Calonectria* sp.

Tabela 11. Velocidade de Crescimento para 10 gêneros de isolados associados a patogenicidade da SMD (PAT: Patógeno).

Patógeno	Gênero	Crescimento Total (Dias)	Crescimento Final (mm)	Média de crescimento diário (mm)
PAT 01 - A27	<i>Colletotrichum</i> sp.	11	90	8,18
PAT 02 - A28	<i>Diaporthe</i> sp.	7	90	15,00
PAT 03 - A2A	<i>Dwiroopa</i> sp.	11	65,15	5,92
PAT 04 - R50	<i>Fusarium</i> sp.	8	90	12,86
PAT 04 - R49B		11	78,75	7,16
PAT 05 - A13A	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	3	90	30,00
PAT 06 - A26B	<i>Nectria</i> sp.	4	90	22,50
PAT 07 - A29	<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	9	90	10,00
PAT 08 - A13B	<i>Neurospora</i> sp.	1	90	90,00
PAT 09 - A42	<i>Nigrospora</i> sp.	5	90	18,00
PAT 10 - R52.1	<i>Calonectria</i> sp.	11	61,5	5,59
PAT 10 - R52.2		11	90	8,18

Observou-se que, *Neurospora* sp. apresentou o crescimento mais acelerado, com média diária de 90,0 mm. *N. crassa*, é a espécie mais estudada do gênero e um dos seus atributos está descrito na literatura como crescimento micelial extremamente rápido em condições ótimas, com o micélio podendo exceder 5 mm/hora em meio sólido (Ryan *et al.*, 1943). Quando incubada entre 25 e 30 °C, a literatura descreve velocidades médias de crescimento radial geralmente situadas entre 30 e 40 mm dia, podendo variar conforme a linhagem e as condições ambientais (Davis, 2000 e Perkins *et al.*, 2001). Em um segundo grupo de crescimento muito rápido, destacaram-se *Lasiodiplodia* sp. e *Nectria* sp., que alcançaram o diâmetro máximo da placa em 3 e 4 dias, respectivamente, com médias diárias elevadas (30,0 e 22,5 mm), indicando alta capacidade de exploração do substrato.

Estudos clássicos e contemporâneos conduzidos em meio BDA (Batata-Ágar-Dextrose), sob temperaturas próximas de 25–28 °C, indicam que colônias de *L. theobromae* frequentemente atingem o diâmetro máximo da placa (90 mm) em 2 a 4 dias, o que corresponde a taxas médias de crescimento radial da ordem de 20 a 40 mm dia⁻¹ (Dhingra e Sinclair, 1995).

Isolados de *Nectria* sp, geralmente atingem 60 a 90 mm de diâmetro entre 4 e 7 dias, o que corresponde a taxas médias de crescimento radial situadas, aproximadamente, entre 10 e 20 mm dia⁻¹ e tendem a crescer mais rapidamente que fungos como *Calonectria*, porém mais lentamente que gêneros extremamente vigorosos, como *Neurospora* (Barnett e Hunter, 1998; Agrios, 2005).

Nigrospora sp. também apresentou crescimento expressivo, com média diária de 18,0 mm, completando a colonização em 5 dias. Um grupo intermediário de crescimento foi representado por *Diaporthe* sp., *Fusarium* sp. e *Neopestalotiopsis* sp, cujas médias diárias variaram entre 10,0 e 12,86 mm, alcançando 90 mm entre 7 e 9 dias, sugerindo bom potencial competitivo, porém inferior aos gêneros de crescimento extremamente rápido.

No caso de *Fusarium* sp., a variação observada entre os isolados (11,25 mm/dia em 8 dias e 7,16 mm/dia em 11 dias) indica heterogeneidade intraespecífica, comum em complexos de espécies desse gênero. Estudos conduzidos em meio BDA a aproximadamente 25 °C indicam que o fungo alcança taxas médias de crescimento radial entre 5 e 10 mm dia⁻¹, sendo essa faixa a mais frequentemente reportada na literatura. Avaliações comparativas de isolados do complexo *F. solani* demonstram que colônias podem atingir diâmetros entre 60 e 70 mm após 7 dias de incubação, o que corresponde a taxas próximas de 8–10 mm dia⁻¹, enquanto outros isolados menos vigorosos alcançam valores mais baixos, em torno de 5–7 mm dia⁻¹ no mesmo período (Leslie e Summerell, 2006).

Colletotrichum sp. apresentou um crescimento médio diário de 8,18 mm e atingiu 90 mm em 11 dias. A taxa de crescimento diário médio das colônias de *Colletotrichum* sp., são frequentemente superiores a 5 mm/dia, podendo atingir valores de 7 mm/dia ou mais em condições ótimas (Rollemberg, 2014.). Oliveira *et al* (2022), descreveu a média geral de crescimento micelial para espécies do complexo, incluindo *C. gloeosporioides*, superior a 5 mm/dia.

Por outro lado, *Dwiroopa* sp. e *Calonectria* sp. apresentaram crescimento mais lento, com médias diárias entre 4,83 e 5,92 mm, respectivamente, para os isolados que não atingiram o diâmetro máximo da placa, demandando 11 dias para alcançar valores finais entre 61,50 e 65,15 mm, enquanto outro isolado de *Calonectria* sp. atingiu 90 mm com média de 8,18 mm/dia, evidenciando novamente variabilidade entre isolados. Com crescimento radial lento a moderado, a literatura indica que, em meio BDA, incubada em temperaturas próximas de 25 °C, as colônias de *Calonectria* sp. normalmente alcançam diâmetros entre 60 e 90 mm após 10 a 14 dias, o que corresponde, em média, a taxas de crescimento radial variando entre aproximadamente 4 e 8 mm dia⁻¹.

Espécies de *Calonectria* (anamorfo *Cylindrocladium*) tendem a apresentar crescimento relativamente lento em meio artificial, apesar de elevada agressividade em condições de alta umidade, especialmente em viveiros florestais e sistemas tropicais (Crous e Wingfield, 1994; Crous *et al.*, 2004). Avaliações fisiológicas relatam valores próximos de 5–7 mm dia⁻¹ como típicos para o gênero em meio BDA, destacando ainda significativa variação intraespecífica entre isolados, associada à origem geográfica e ao hospedeiro (Agrios, 2005).

Assim, o VC observado para os 10 gêneros estudados estão em consonância com estudos elencados na literatura científica. Agora, quando abordamos a importância dos dados para virulência e a agressividade dos fungos avaliados, podemos concordar, em face a literatura, que *Colletotrichum* sp. apresenta elevada virulência, associada à sua eficiente capacidade de penetração, colonização e produção de enzimas degradativas, sendo responsável por antracnoses severas em diversas culturas (Agrios, 2005 e Dean *et al.*, 2012).

Diaporthe sp. demonstra agressividade moderada a alta, sobretudo em tecidos lenhosos, causando cancrs, seca de ramos e declínio progressivo das plantas, com forte impacto fisiológico no hospedeiro (Udayanga *et al.*, 2011 e Santos *et al.*, 2017). No entanto, *Dwiroopa* sp. apresenta comportamento menos agressivo, geralmente associado a infecções oportunistas ou de evolução lenta, com menor potencial destrutivo quando comparado a patógenos primários (Hyde *et al.*, 2016).

Quanto ao *Fusarium* sp., este caracteriza-se por elevada virulência, especialmente em infecções vasculares, promovendo murchas, podridões radiculares e morte de plantas, com grande variabilidade de agressividade entre isolados e espécies do complexo (Leslie e Summerell, 2006 e Agrios, 2005).

O fungo *Lasioidiplodia* sp. é reconhecido como altamente agressivo, com capacidade de causar necroses extensas, cancos e morte descendente, sendo frequentemente associada a estresses ambientais e rápido colapso dos tecidos vegetais (Slippers e Wingfield, 2007 e Phillips *et al.*, 2013). O fungo é altamente competitivo, especialmente quando comparado a outros patógenos associados a podridões, cancos e morte descendente em espécies lenhosas tropicais (Alves *et al.*, 2008; Agrios, 2005). A taxa de crescimento micelial é consistente com a ecologia do patógeno, que se comporta como oportunista e agressivo, sobretudo em plantas sob estresse hídrico ou com tecidos feridos. Entretanto, conforme enfatizado pela literatura fitopatológica, o crescimento radial em placa deve ser interpretado como um parâmetro fisiológico, não representando, de forma isolada, uma medida direta de virulência ou severidade da doença em campo (Agrios, 2005; Madden, Hughes e Van Den Bosch, 2007).

Nectria sp., fase assexuada do *Fusarium* sp. apresenta elevada agressividade em plantas lenhosas, induzindo cancos profundos e comprometendo a integridade estrutural dos ramos e troncos, resultando em perdas significativas (Hirooka *et al.*, 2012). Para o fungo *Neopestalotiopsis* sp., a virulência é intermediária, sendo capaz de causar lesões foliares, ramos e frutos, com progressão eficiente das doenças, porém geralmente menos destrutiva que patógenos altamente agressivos (Maharachchikumbura *et al.*, 2014).

Neurospora sp., embora extremamente competitiva em substratos orgânicos, é predominantemente saprofítica e apresenta baixa virulência fitopatogênica, não sendo usualmente associada a doenças severas em plantas cultivadas (Agrios, 2005; Perkins e Davis, 2000). Contudo, estudos posteriores, como Kuo *et al.* (2014), demonstraram que *N. crassa* pode atuar como patógeno oportunista, causando lesões e morte de mudas de coníferas em condições experimentais.

Nigrospora sp. demonstra agressividade moderada, relacionada principalmente a manchas foliares e podridões, podendo causar danos relevantes sob condições ambientais favoráveis (Wang *et al.*, 2017). Por fim, *Calonectria* sp. destaca-se pela alta virulência, especialmente em viveiros e ambientes úmidos, causando tombamento, podridões radiculares e lesões foliares severas, com impacto expressivo na sobrevivência e no estabelecimento das plantas (Crous, 2002 e Lombard *et al.*, 2010).

De forma geral, foi possível observar que a velocidade de crescimento radial é um parâmetro importante para caracterizar o comportamento dos fungos, permitindo classificá-los em grupos de crescimento lento, intermediário e rápido, com ampla variabilidade no crescimento radial entre gêneros. Outro aspecto, foi a relação da VC com a virulência e agressividade, que podem estar relacionadas com a Síndrome da Morte Descendente. Todos os 10 gêneros de isolados patogênicos apresentaram virulência e agressividade, com destaque acentuado para *Lasiodiplodia* sp.

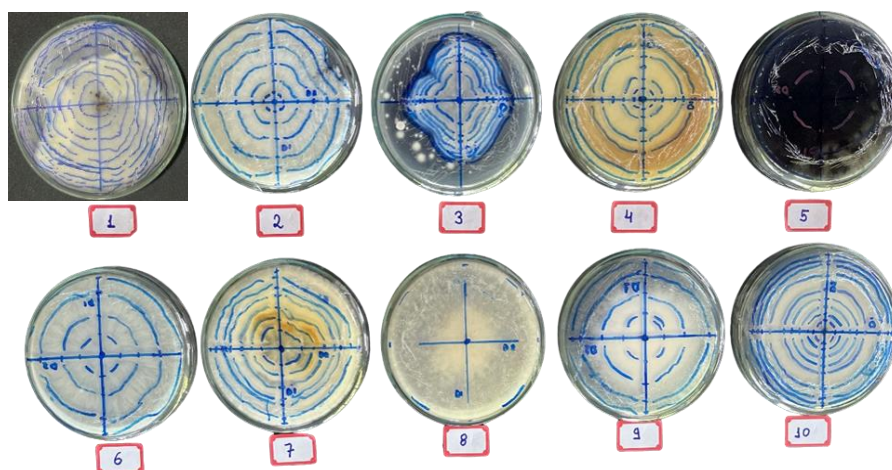


Figura 12. Reverso das colônias de isolados com as mensurações efetuadas para (1) *Colletotrichum* sp, (2) *Diaporthe* sp, (3) *Dwiroopa* sp, (4) *Fusarium* sp, (5) *Lasiodiplodia* sp, (6) *Nectria* sp (7) *Neopestalotiopsis* sp, (8) *Neurospora* sp. (9) *Nigrospora* sp. e (10) *Calonectria* sp.

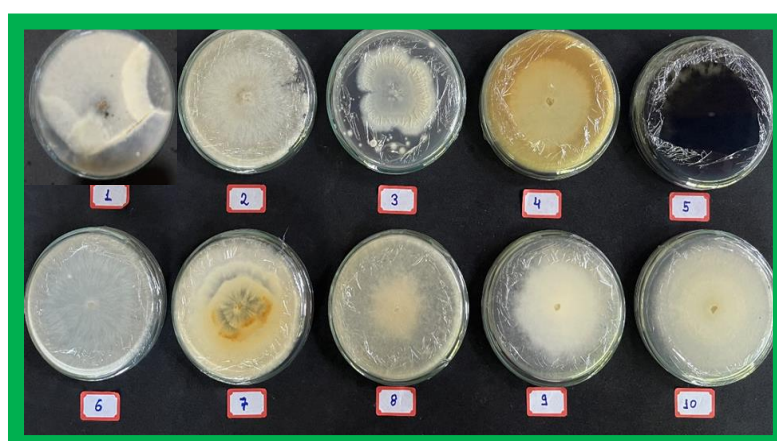


Figura 13. Verso e reverso das colônias de isolados aos 11 dias de crescimento (1) *Colletotrichum* sp, (2) *Diaporthe* sp, (3) *Dwiroopa* sp, (4) *Fusarium* sp, (5) *Lasiodiplodia* sp, (6) *Nectria* sp (7) *Neopestalotiopsis* sp, (8) *Neurospora* sp. (9) *Nigrospora* sp. e (10) *Calonectria* sp.



5.3. Teste de patogenicidade

Sintomas visíveis de clorose, necrose, murcha ou morte não foram perceptíveis nas plantas inoculadas em 9 dos 10 gêneros fitopatogênicos ao final dos 75 dias. Para o método do palito, o gênero *Calonectria* sp. (Figura 14), foi o único isolado que apresentou, aos 30 dias, necrose de 2 mm nas folhas de 12 plantas, das 16 inoculadas. O gênero *Lasiodiplodia* sp. e *Fusarium* sp., apresentaram aos 75 dias, cancro, lesões internas e podridão radicular (Figuras 15 e 16). Para os 10 gêneros, foram realizados cortes longitudinais no caule das plantas e coleta de material para o reisolamento e comparados com a testemunha (Figura 17). A Tabela 12 resume as observações por patógeno inoculado.

Tabela 12. Resultados do Teste de Patogenicidade para os 10 gêneros inoculados.

PAT	Gênero	Sintomas	Patogênico
01	<i>Colletotrichum</i> sp.	Cancro: lesão sem a presença do patógeno no reisolamento.	Não
02	<i>Diaporthe</i> sp.	Cancro: lesão sem a presença do patógeno no reisolamento.	Não
03	<i>Dwiroopa</i> sp.	Cicatrização e sem presença do patógeno no reisolamento.	Não
04	<i>Fusarium</i> sp.	Cancros de tamanho pequeno, lesão escura central no tecido lenhoso, podridão no colo e na raiz e presença do patógeno no reisolamento.	Sim
05	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	Cancros em todas as plantas inoculadas, lesão escura presente no tecido lenhoso e presença do patógeno no reisolamento	Sim
06	<i>Nectria</i> sp.	Cicatrização e sem presença do patógeno no reisolamento	Não
07	<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	Cancro: lesão sem a presença do patógeno no reisolamento.	Não
08	<i>Neurospora</i> sp.	Cancro: lesão sem a presença do patógeno no reisolamento.	Não
09	<i>Nigrospora</i> sp.	Cancro: lesão sem a presença do patógeno no reisolamento.	Não
10	<i>Calonectria</i> sp.	Cancro presente em 10 plantas inoculadas, coloração escurecida no tecido lenhoso, lesões pequenas próxima aos cancos e presença do patógeno no reisolamento da folha e caule.	Sim

O fato da ausência de características visíveis de clorose, necrose, murcha ou morte nas plantas inoculadas, não significa a ausência de patogenicidade. Alterações internas nos tecidos podem ser explicadas pela ocorrência de infecção latente e pela dinâmica temporal da interação patógeno–hospedeiro–ambiente, na qual a colonização precede a expressão externa da doença.

Fitopatógenos, especialmente fungos com comportamento biotrófico ou hemibiotrófico, são capazes de se estabelecer nos tecidos internos da planta, colonizando espaços intercelulares, vasos condutores ou regiões parenquimáticas, sem causar inicialmente danos suficientes para desencadear sintomas externos perceptíveis, como clorose, necrose, murcha ou lesões visíveis (Campbell e Madden, 1990 e Agrios, 2005).

Na fase assintomática, o patógeno mantém um crescimento restrito e metabolicamente ajustado, evitando a rápida destruição celular, enquanto a planta ativa mecanismos de defesa, como a produção de compostos fenólicos, lignificação, deposição de calose e compartimentalização do tecido infectado, o que limita a progressão visível da doença, mas resulta em escurecimentos internos, necroses localizadas ou alterações anatômicas detectáveis apenas por cortes longitudinais ou transversais (Agrios, 2005 e Taiz *et al.*, 2017). Além disso, a manifestação externa dos sintomas geralmente depende do alcance de um limiar fisiológico de dano, no qual a área funcional comprometida, a concentração de toxinas ou enzimas hidrolíticas e a intensidade da degradação celular ultrapassam a capacidade compensatória do hospedeiro, condição que nem sempre é atingida dentro do período experimental avaliado (Madden *et al.*, 2007).

Fatores ambientais associados ao ensaio, como temperatura, umidade relativa, disponibilidade hídrica, luminosidade e, idade (Agrios, 2005), além do estado nutricional da planta, também exercem papel determinante na velocidade de colonização e na expressão sintomatológica, podendo retardar significativamente o aparecimento de sintomas externos mesmo na presença de infecção ativa (Campbell e Madden, 1990).

Assim, a observação de sintomas internos sem manifestação externa aos 60 dias é biologicamente consistente e indica que o patógeno já está estabelecido e interagindo fisiologicamente com o hospedeiro, porém ainda em uma fase latente ou contida, anterior à transição para um estágio de maior agressividade e expressão visível da doença (Agrios, 2005 e Madden *et al.*, 2007). A menor diferenciação estrutural em plantas jovens, com sistemas vasculares ainda em formação, favorece a disseminação silenciosa do patógeno nos tecidos internos, sem provocar interrupções funcionais suficientemente severas para gerar sintomas como murcha, clorose ou necrose externa (Campbell e Madden, 1990).

Portanto, quando a inoculação ocorre em plantas jovens, a combinação entre maior capacidade de tolerância fisiológica, respostas defensivas eficientes e ausência de dano funcional crítico contribui para a manutenção de uma fase assintomática prolongada, explicando a não expressão de sintomas visíveis mesmo após 60 dias, apesar da presença inequívoca de infecção interna (Agrios, 2005; Madden *et al.*, 2007).

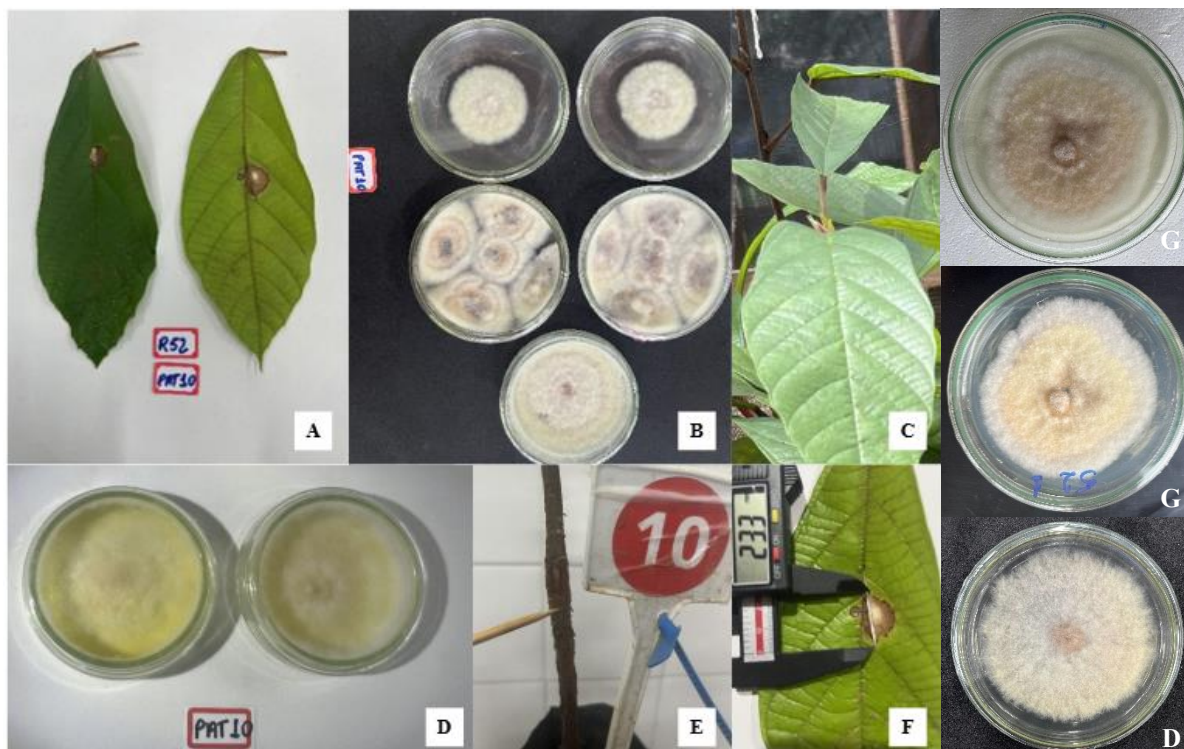


Figura 14. Reisolamento do gênero *Calonectria* sp.: A, F) necrose presente na folha de 12 plantas aos 30 dias; B) reisolado da folha aos 30 dias; C) folhas saudáveis; D) reisolado do cancro; E) cancro aos 60 dias; F) Patógeno inoculado na folha e caule.

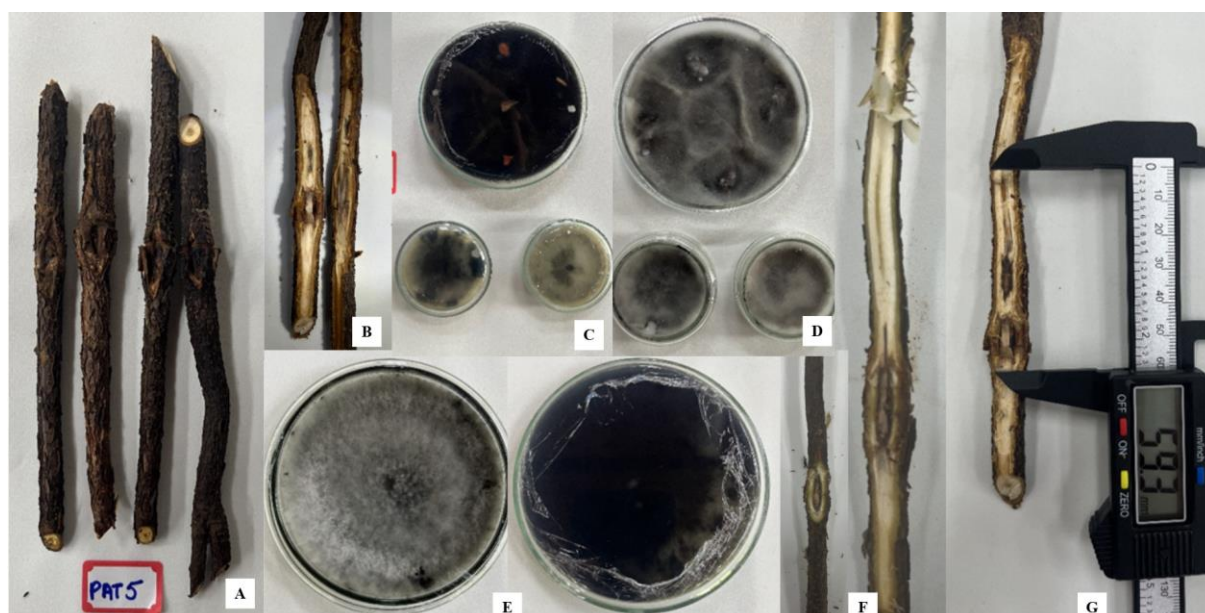


Figura 15. Reisolamento do gênero *Lasiodiplodia* sp.: A) cancos presentes no caule das 16 plantas aos 75 dias e lesões escurecidas no lenho; B, F, G) lesão interna ocasionada pelo patógeno aos 75 dias; C, D) reisolado (verso e reverso) de *Lasiodiplodia* sp inoculado nas plantas aos 75 dias E) isolado (verso e reverso) de *Lasiodiplodia* sp inoculado nas plantas saudáveis.

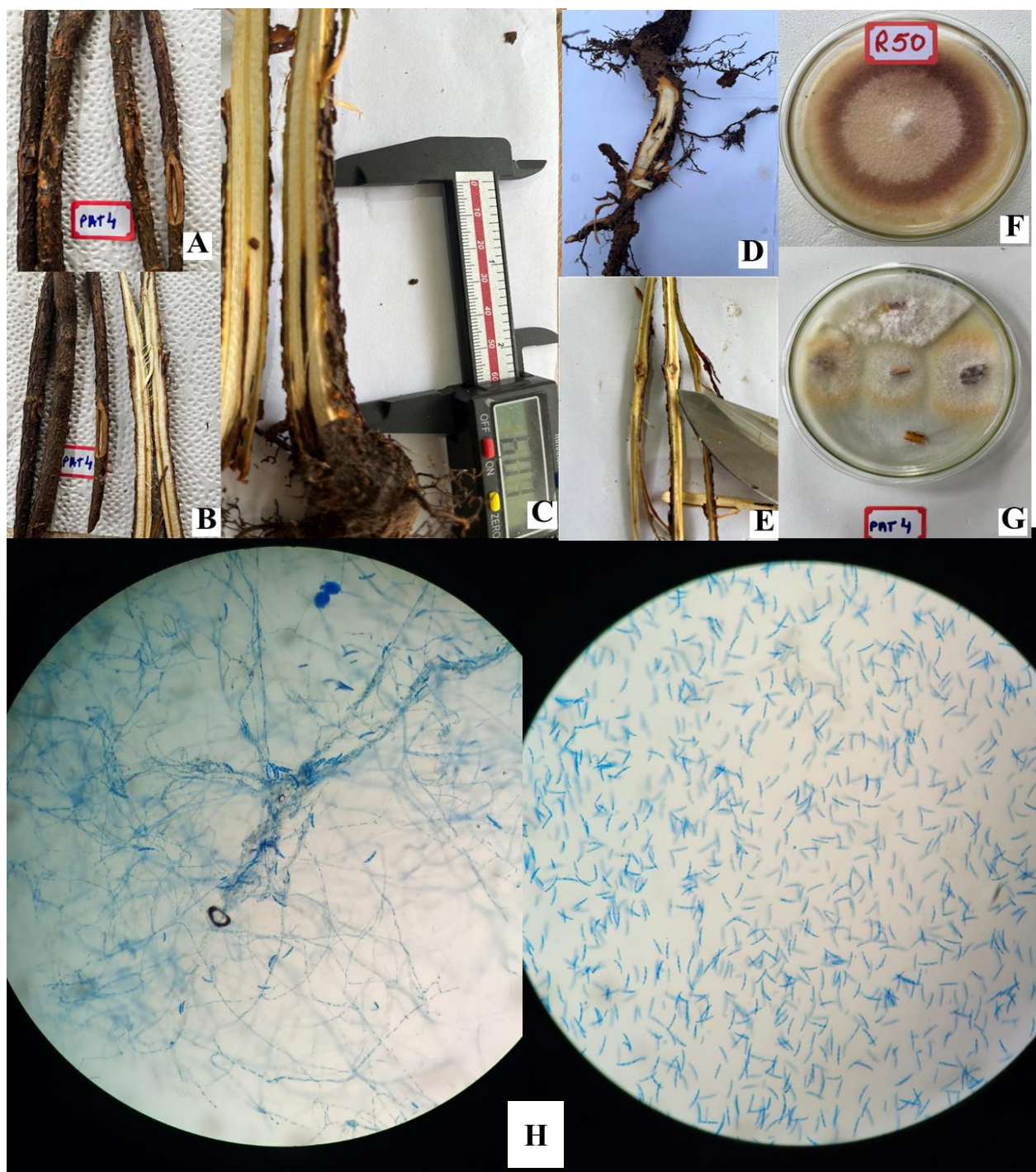


Figura 16. Reisolamento do gênero *Fusarium* sp.: A) cancos presentes no caule das 16 plantas aos 60 dias e lesões escurecidas no lenho; B) lesão central interna ocasionada pelo patógeno aos 75 dias em toda a extensão do caule; C) apodrecimento do colo das plantas aos 75 dias D) lesão interna e podridão das raízes; E) cancro a 23 cm do colo e lesão a 10 cm da inoculação; F) isolado inoculado na planta sadia; G) reisolamento do cancro, lesão interna e podridão do colo e raízes e H) lâminas com hifas e microconídios observados dos reisolados.



Figura 17. Planta Testemunha: A) 16 plantas aos 75 dias; B) cicatrização da inoculação; C) lenho interno sadio; D) corte sadio no local da cicatrização; E) folhas, lenho e raízes sadias das 16 plantas aos 75 dias.

6.0. Considerações finais

As evidências obtidas neste estudo indicam que a Síndrome da Morte Descendente (SMD) em plantas de cupuaçu, nos sistemas agroflorestais do Projeto RECA apresenta elevada incidência, um padrão espacial predominantemente agregado e variabilidade na ADEF, revelando características típicas de doenças de etiologia biótica.

A identificação de fungos fitopatogênicos associados às plantas sintomáticas, aliada aos resultados dos testes de patogenicidade, confirma a participação de agentes fúngicos no complexo etiológico da síndrome, com destaque para isolados de *Calonectria* sp.; *Fusarium* sp. e *Lasiodiplodia* sp. Esses resultados reforçam a importância de estudos integrados que associam levantamento de campo, análises espaciais e caracterização morfológica e molecular para a compreensão de doenças de declínio em culturas perenes na Amazônia.

A etiologia da SMD em pomares de cupuaçu conduzidos em sistemas agroflorestais não pode ser explicada de forma simplista apenas pela presença de fungos fitopatogênicos ou por uma única causa biótica isolada. Trata-se de uma enfermidade de natureza complexa, resultante da interação entre múltiplos fatores bióticos e abióticos que atuam de forma simultânea ou sucessiva sobre o hospedeiro.

Entre os fatores abióticos, destacam-se as mudanças climáticas recentes, caracterizadas por períodos prolongados de seca severa, aumento da temperatura média e irregularidade no regime de chuvas, que contribuem diretamente para o estresse hídrico das plantas. Esse estresse compromete os mecanismos fisiológicos de defesa do cupuaçuzeiro, tornando-o mais suscetível

à colonização por patógenos oportunistas. Adicionalmente, deficiências nutricionais, desequilíbrios na fertilidade do solo, manejo cultural inadequado, adensamento excessivo e práticas de poda mal executadas podem favorecer a instalação e o progresso da doença.

Além disso, o padrão de distribuição espacial observado fornece subsídios relevantes para o entendimento da dinâmica epidemiológica da SMD e para o delineamento de estratégias de manejo mais eficientes, especialmente em sistemas agroflorestais complexos, onde múltiplos fatores bióticos e abióticos interagem. Embora os resultados apontem para uma associação consistente entre fungos fitopatogênicos e a síndrome da morte descendente, ressalta-se a necessidade de pesquisas complementares, com maior tempo de teste de patogenicidade.

O avanço nesse conhecimento é fundamental para o desenvolvimento de práticas sustentáveis de manejo fitossanitário integrado, contribuindo para a manutenção da produtividade, da sustentabilidade dos SAFs e da segurança socioeconômica dos produtores de cupuaçu da região amazônica.

A hipótese de que fungos fitopatogênicos estão associados à síndrome da morte descendente do cupuaçuzeiro foi aceita, evidenciando um papel relevante desses agentes na dinâmica da doença. Nas seis áreas avaliadas, os gêneros predominantes foram *Lasiodiplodia* sp., com frequência relativa de 31% e *Fusarium* sp., com 11,5%, indicando maior potencial de associação com os sintomas observados. Fungos antagônicos, a exemplo do *Trichoderma* sp aparecem com 21%.

Estudos recentes corroboram esses achados, como o trabalho de Souza *et al.* (2025), que confirmou a associação de *L. theobromae* e *L. brasiliensis* com sintomas de die-back e cancro em cupuaçuzeiros no Brasil, reforçando a importância desse gênero na etiologia da síndrome. Apesar de as análises moleculares multirregionais terem permitido a identificação de dez gêneros de fungos fitopatogênicos associados ao cupuaçuzeiro — *Colletotrichum* sp., *Diaporthe* sp., *Dwiroopa* sp., *Fusarium* sp., *Lasiodiplodia* sp., *Nectria* sp., *Neopestalotiopsis* sp., *Neurospora* sp., *Nigrospora* sp. e *Calonectria* sp. — apenas três gêneros apresentaram resultado positivo nos testes de patogenicidade, a saber: *Fusarium* sp., *Lasiodiplodia* sp. e *Calonectria* sp.

Os resultados também indicam que a simples detecção molecular do patógeno não implica, necessariamente, sua capacidade de causar doença sob condições experimentais controladas. Adicionalmente, fatores experimentais e fisiológicos podem influenciar na expressão dos sintomas, como a utilização de mudas de cupuaçu bem nutridas e fisiologicamente vigorosas, a ausência de estresse hídrico ou nutricional durante o período de

avaliação, o tempo relativamente limitado de observação das plantas inoculadas, restrito a 60 dias, e a condução de inoculações individuais.

Ressalta-se que, em condições naturais de campo, plantas adultas frequentemente estão expostas à inoculação cruzada por diferentes patógenos simultaneamente, o que pode potencializar a severidade dos sintomas e alterar a dinâmica da patogenicidade, diferindo substancialmente do observado em ensaios conduzidos sob condições controladas.

A região ITS foi amplificada com sucesso para a maioria dos isolados analisados, demonstrando sua aplicabilidade como marcador molecular inicial neste estudo. Entretanto, para alguns isolados, não foi possível obter sequências confiáveis devido à baixa qualidade dos eletrogramas, caracterizada por elevado nível de ruído. Esse padrão pode estar associado à degradação do DNA genômico, à baixa concentração do material genético extraído ou à presença de compostos inibidores da reação de PCR. Ainda assim, as sequências válidas obtidas apresentaram qualidade suficiente para permitir a identificação taxonômica inicial em nível de gênero, possibilitando a confirmação da presença de fungos fitopatogênicos associados à síndrome da morte descendente do cupuaçuzeiro, sem comprometer os objetivos gerais desta etapa do estudo.

O dendrograma construído com base na região ITS evidenciou elevada diversidade de gêneros fúngicos associados ao cupuaçuzeiro, refletindo condições ambientais típicas de regiões tropicais, como alta umidade relativa, temperaturas elevadas e elevada complexidade ecológica. Os isolados analisados agruparam-se majoritariamente dentro do grande clado correspondente ao gênero *Lasiodiplodia*, confirmando seu posicionamento no complexo *L. theobromae*. Na análise filogenética concatenada, as sequências formaram dois clados irmãos bem definidos, ambos com alto suporte de bootstrap, sem se intercalar com sequências de referência de *L. theobromae* ou *L. pseudotheobromae*, indicando a presença de grupos geneticamente diferenciados, embora filogeneticamente próximos dessas espécies descritas.

O primeiro clado reuniu os isolados A9, A26, A16, A1A, A1E, A2A, A48, A7 e A10, enquanto o segundo incluiu os isolados A3, A4, A13 e A15, ambos posicionados como grupos irmãos de clados do complexo *L. theobromae*. Ressalta-se que estudos taxonômicos recentes recomendam o uso de marcadores mais informativos, como o fator de alongação 1- α (*tefl- α*), em combinação com β -tubulina e RPB2, para maior poder discriminatório na delimitação de espécies desse complexo. Para *Fusarium* spp., a árvore consenso baseada nas regiões RPB2, *cmdA* e β -tubulina indicou que o isolado A30 se agrupou com *Fusarium incarnatum* e *F. equiseti*, pertencentes ao complexo *Fusarium incarnatum–equiseti*, com suporte robusto de 100% de bootstrap, evidenciando elevada similaridade genética.

Dessa forma, a inclusão do marcador *tefl- α* tende a conferir maior robustez e precisão às inferências filogenéticas, sendo necessária a ampliação das análises multilocus para aprofundar a compreensão da diversidade genética observada.

A incidência da doença variou significativamente entre as áreas analisadas, com média geral de 49,36%, indicando heterogeneidade espacial na distribuição do patógeno dentro dos Sistemas Agroflorestais (SAFs) estudados. A Área I apresentou baixa incidência (22,77 e a Área VI se destacou com incidência crítica (77,56%), configurando um cenário de epidemia local.

Os valores de ID das áreas I, II, III, IV e V foram significativamente superior a 1, o que indica que a doença apresenta um padrão espacial agregado, rejeitando-se H_0 , enquanto que a área VI apresentou valores de ID bem próximos a 1, aceitando-se H_0 e a distribuição de Poisson, mesmo sendo levemente inferior no quadrat 2 x 2 e também levemente superior no quadrat 3 x 2. A Área VI apresentou o maior valor de incidência, acompanhado de índices de dispersão próximos a 1 (I.D. = 0,92 no quadrat 2x2 e 1,02 no quadrat 3x2), sugerindo que, diferentemente das demais áreas, a doença encontra-se em um padrão mais aleatório ou tendendo à regularidade.

Na ADEF, a Área I demonstrou um padrão composto por focos pequenos e relativamente fragmentados, com NFT = 23 e NMPF = 4,54 plantas por foco, sendo 10 unitários e 13 não unitários, totalizando 59 plantas afetadas. A presença de dez focos unitários sugere um processo de infecção distribuído, possivelmente associado à dispersão moderada em curta distância. Os índices IFF (0,831) e ICF (0,836) indicam focos de forma intermediária e compactação mediana. Na Área II, embora haja apenas 16 focos, o número total de plantas afetadas é elevado (NPF = 106). O tamanho médio dos focos (NMPF = 8,83) indica maior expansão interna e menor fragmentação.

O índice de forma IFF (1,169) aponta alongação dos focos ou focos alongados entre linhas, resultado que pode refletir dispersão mais dirigida ou assimétrica, possivelmente associada a ventos, topografia ou manejo. A Área III configurou um cenário epidemiológico altamente peculiar, com apenas dois focos (NFT = 2), ambos extremamente extensos (NPF = 142), resultando no tamanho médio do (NMPF = 71). É o 2º maior entre as áreas, exceto pela Área VI. Os índices IFF de 0,740 confirmam alongamento na própria fila e o ICF = 0,483, evidenciando compactação e agregação interna e estrutura coesa do foco. Esse tipo de padrão é típico de epidemias avançadas, em que a doença já se estabeleceu e progride por contiguidade. Na Área IV, o arranjo epidemiológico mostrou NFT = 5 e NPF = 152, com NMPF = 30,4. Os valores intermediários de IFF (0,979) e ICF (0,753) caracterizam focos bem formados,

isodiamétricos, bem estabelecidos, de alta agregação, mas menos extensos que os da Área III. A Área V exibiu 11 focos e um total de 106 plantas doentes, com $NMPF = 17,60$.

Os valores de IFF (0,789) e ICF (0,705) indicam focos com estrutura relativamente equilibrada, situando-se entre compactação e fragmentação. Área VI, apresentou um padrão mais extremo entre todas as áreas: um único foco ($NFT = 1$) contendo 214 plantas doentes. Esse resultado, com $NMPF = 214$, caracteriza um foco massivo, contínuo e altamente consolidado. Os índices IFF (0,480) e ICF (0,713) revelam forma relativamente compacta, ainda que, com certa alongação.

O padrão espacial ao acaso ou aleatório da doença em linhas pelo teste de Run foi encontrado fortemente nas áreas I, II, III, IV, V e VI, com frequência superior a 80%. Já no teste de Doublet, o padrão espacial ao acaso para as áreas I, IV, V e VI e com frequência de 50% para as áreas II e III, mas que, quando associado ao teste de Run foi possível concordar com os padrões espaciais de aleatoriedade.

7. Conclusões:

- I. A hipótese H_1 deverá ser aceita, pois plantas de cupuaçu com a SMD em plantios de cupuaçu apresentam 10 gêneros de fungos associados e fitopatogênicos, sendo que, *Calonectria* sp., *Fusarium* sp. e *Lasiodiplodia* sp., induziram cancos e lesões escuras nos tecidos lenhosos.
- II. A incidência da doença associada a SMD variou entre as áreas estudadas, com média de 49%.
- III. O padrão espacial predominante nas parcelas foi agregado, com variabilidade nos parâmetros da ADEF, rejeitando-se assim, H_0 e consequentemente a distribuição de Poisson, que representa o modelo de referência para padrões aleatórios.
- IV. O padrão espacial aleatório em linhas de plantio foi predominante, ajustando-se a distribuição de Poisson e aceitando-se H_0 .
- V. Pesquisas complementares se fazem necessárias para aprofundar a identificação dos fungos em nível de espécie, como também, avaliar a patogenicidade em plantas sujeitas a doenças abióticas e os métodos de controle associados a SMD.

8. Referências bibliográficas

- ADAIME, R.; SANTOS, R. S.; SILVA, N. M. **Primeiro registro de *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae) no estado do Amapá, Brasil.** Biota Amazônia, Macapá, v. 10, n. 3, p. 69-70, 2020.
- AFEK, U.; SZTEJNBERG, A. **Accumulation of latent infections of *Colletotrichum gloeosporioides* in avocado fruits.** Phytopathology, v. 80, p. 1266–1270, 1990.
- AFEK, U. & SZTEJNBERG, A. **A rapid method for evaluating citrus seedlings for resistance to foot rot caused by *Phytophthora citrophthora*.** Plant Disease, v. 74, p. 66-68, 1990.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology.** 3. ed. San Diego: Academic Press, 1988. 803 p.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology.** 5. ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005.
- ALFENAS, A. C. *et al.* **Fitopatologia: métodos e técnicas.** Viçosa, MG: UFV, 2004.
- ALFENAS, A. C. *et al.* **Isolamento de fungos fitopatogênicos.** In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (org.). Métodos em fitopatologia. Viçosa: Editora UFV, 2007. v. 1, p. 53-90.
- ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A. **Métodos em fitopatologia.** 2. ed. rev. e ampl. Viçosa, MG: Editora UFV, 2016. 516 p.
- ALMEIDA, A.; SILVA, J. R.; SANTOS, R. S. **Avaliação da eficácia de agentes de biocontrole no manejo de doenças do cacau.** Journal of Plant Pathology, v. 104, n. 1, p. 45-56, 2022. DOI: 10.1007/s42161-022-00708-3.
- ALVES, A. **Espécies de *Lasiodiplodia* associadas à morte descendente e ao cancro de plantas lenhosas no Brasil.** 2008. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2008.
- ALVES, S. A. M. *et al.* **Doenças do Cupuaçuzeiro.** In: AMORIM, L. *et al.* (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas.** 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. v. 2, p. 307-316.
- ALVES, D. P. **Determinação de características físico-químicas de polpa de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) congeladas comercializadas em Ariquemes, Rondônia, Brasil.** 2013. Monografia – Faculdade de Educação e Meio Ambiente, Ariquemes, 2013.
- ALVES, R. M. *et al.* **Resistência de genótipos de cupuaçuzeiro a *Lasiodiplodia theobromae*.** Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2018.
- AMARAL, E. F. *et al.* **Levantamento de reconhecimento de média intensidade dos solos da região de inserção do Projeto RECA nos estados de Rondônia, Acre e Amazonas.** Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2023. (Documento 176).
- AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Epidemiologia de doenças de plantas: princípios e aplicações.** Piracicaba: FEALQ, 2016.

- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011.
- ARCO-VERDE, M. F.; AMARO, G. **Cálculo de indicadores financeiros para sistemas agroflorestais**. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2014. (Documentos, 57).
- ARMANDO, M. S. *et al.* **Agrofloresta para agricultura familiar: desenho da agrofloresta**. Brasília, DF: Embrapa, 2002. (Circular Técnica).
- BARBOSA, F. F. L. **Dinâmica espacial e temporal da clorose variegada dos citros**. 1997. 82 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.
- BARNES, I. *et al.* ***Ceratocystis fimbriata* infecting *Eucalyptus grandis* in Uruguay**. Australasian Plant Pathology, v. 32, p. 361-366, 2003.
- BASTOS, M. S. R. *et al.* **Effect of pectolytic enzymes in the yield of cupuaçu pulp extraction**. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 24, p. 240-242, 2002.
- BATISTA, D. C. *et al.* **Seca-da-mangueira: detecção, sintomatologia e controle**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2008. (Comunicado Técnico, 1385).
- BATISTA, V. T. F. *et al.* **Biocontrole de *Colletotrichum gloeosporioides* por isolados de *Trichoderma***. Cadernos de Agroecologia, v. 13, n. 2, 2018.
- BEED, F. D.; CROZIER, J.; FLOOD, J. **Cocoa pod diseases: *Moniliophthora roreri* and *Moniliophthora perniciosa***. CAB Reviews, v. 3, n. 62, p. 1–15, 2008.
- BENSO, L. A. *et al.* **Dinâmica espacial da murcha-de-ceratocystis em *Khaya senegalensis* A. Juss.** Summa Phytopathologica, v. 47, p. 24-30, 2021.
- BENTES-GAMA, M. M. *et al.* **Análise econômica de sistemas agroflorestais na Amazônia Ocidental, Machadinho d'Oeste-RO**. Revista Árvore, v. 29, n. 3, p. 401-411, 2005.
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Principais doenças do cacaueiro e seus métodos de controle**. Fitopatologia Brasileira, v. 21, n. 2, p. 245-260, 1996.
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas no Brasil: Epidemiologia e controle econômico**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 289 p, 1996.
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Controle de doenças em cacaueiros**. Embrapa - Comunicação Técnica, n. 15, p. 1-12, 1996.
- BERGAMIN FILHO, A. *et al.* **Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas**. Belo Horizonte: Perfil, 2004. p. 195-240.
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Epidemiologia de doenças de plantas**. Piracicaba: FEALQ, 1996.
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Epidemiologia de doenças de plantas**. Viçosa: Ed. Ceres, 2019.

- BERGAMIN FILHO, A. *et al.* **Epidemiologia: a dinâmica das doenças de plantas.** In: AMORIM, L. *et al.* (org.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos.** São Paulo: Agronômica Ceres, 2004. p. 45–68.
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de Plantas Tropicais.** Piracicaba: USP/ESALQ, 2011.
- BERGAMIN FILHO, A. *et al.* **Análise espacial e temporal de epidemias de patógenos de solo.** In: POLTRONIERI, L. S.; VERZIGNASSI, J. R. **Fitossanidade na Amazônia: inovações tecnológicas.** Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2007. p. 17-36.
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais: Epidemiologia e controle econômico.** São Paulo: Agronômica Ceres, 1996. 289 p.
- BONAN, L. F. S. **Avaliações de tecnologia em saúde para câncer de pulmão no Brasil: abordagem descritiva e prática.** 2015. Tese (Doutorado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, 2015.
- BORGES, A. C. F. *et al.* **Escalas diagramáticas para avaliação da severidade da vassoura-de-bruxa do cupuaçuzeiro.** *Agrotropica*, v. 31, n. 1, p. 25–34, 2019.
- BOWEN, K. L. **Plant Disease Epidemiology.** In: OWNLEY, B. H.; TRIGIANO, R. N. **Plant Pathology: Concepts and Laboratory Exercises.** 3. ed. Boca Raton: [s. n.], 2016. p. 345-361.
- BRITO, N. M. **Característica morfofisiológica e patogênica de isolados de *Ceratocystis fimbriata* em clones de erva-mate.** 2019. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019.
- BURGESS T. I. *et al.* **Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology.** *Mycologia*, v. 98, n. 3, p. 423–435, 2006. DOI: 10.3852/mycologia.98.3.423.
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology.** New York: John Wiley & Sons, 1990. 532 p.
- CANNON, P. F. *et al.* ***Colletotrichum* – current status and future directions.** *Studies in Mycology*, v. 73, p. 181-213, 2012.
- CARVALHO, C. A. C. *et al.* **Effect of cupuaçu fruits pre-cooling on the sensory acceptance of the nectar.** *Revista Agro@mbiente On-line*, v. 9, n. 1, p. 91-95, 2015.
- CASTILLO, S. R. M. *et al.* **Mycobiota associated with anthracnose and dieback symptoms on *Theobroma cacao* L. in Mérida State, Venezuela.** *Summa Phytopathologica*, v. 49, p. e245874, 2023.
- COHEN, Y.; SACKSTON, W. E. **Patterns of plant disease: analysis of Runs.** *Phytopathology*, v. 63, p. 731–736, 1973.
- COSTA, A. N. *et al.* **Recomendações técnicas para a produção de manga.** Vitória: Incaper, 2008. (Documento, 155).
- COSTA, E. L. **Estudo da ecologia química da broca-do-fruto do cupuaçuzeiro *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae): prospecção de semioquímicos e estudos comportamentais.** 2018.

- COSTA, M. C. **Conservação de polpa de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) por métodos combinados com emprego da tecnologia de obstáculos**. 2002. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.
- COUTO, A. G. V. *et al.* **Avaliação físico-química e bioativa da polpa e geleia produzida a partir do fruto *Theobroma grandiflorum* Schum (Cupuaçu)**. Revista Arquivos Científicos (IMMES), v. 3, n. 2, p. 146-154, 2020.
- CROLL, D.; LAINE, A.-L. **What the population genetic structures of host and pathogen tell us about disease evolution**. New Phytologist, v. 212, n. 4, p. 898-901, 2016.
- CROUS, P. W. *et al.* **Fungal Planet description sheets: 107–127**. Persoonia, v. 28, p. 138-182, 2012.
- CROUS, P. W. *et al.* **Mycologia**, v. 96, p. 112–132, 2004.
- DA SILVA, L. S.; PIERRE, F. C. **Aplicabilidade do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.) em produtos e subprodutos processados**. Tekhne e Logos, Botucatu, v. 12, n. 1, p. 19-33, 2021.
- DAVIS, R. H. **Neurospora: contributions of a model organism**. Oxford: Oxford University Press, 2000.
- DAVIS, R. H.; PERKINS, D. D. **Neurospora: a model for understanding genetics and biochemistry**. San Diego: Academic Press, 2002.
- DE SOUZA, J. F. F. *et al.* ***Lasiodiplodia theobromae* and *Lasiodiplodia brasiliensis* associated with dieback and canker in cupuaçu trees (*Theobroma grandiflorum*) in Brazil**. Physiological and Molecular Plant Pathology, p. 102759, 2025.
- DEACON, J. W. **Fungal Biology**. 4. ed. Malden: Blackwell Publishing, 2006. 371 p.
- DEAN, R. *et al.* **The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology**. Molecular Plant Pathology, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 414–430, 2012.
- DELGADO, R. A.; CAPELLO, C. S. **Evaluación de la resistencia al mal del machete en clones internacionales de cacao en Ecuador**. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 16., 2003, Accra. **Anais [...]**. Accra, Ghana: 2003.
- DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1995. 434 p.
- DIAS, J. C. F. *et al.* **Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de mangueira**. Bioscience Journal, Uberlândia, v. 28, n. 6, p. 883-891, nov./dez. 2012.
- SANTOS, Á. F. dos; DORNELES, M. S. **Murcha-de-Ceratocystis em acácia-negra**. Pesquisa Florestal Brasileira, Colombo, n. 51, p. 119-122, 2005.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. **A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue**. Phytochemical Bulletin, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 11-15, 1987.

ELLIOTT, J. M. **Some methods for the statistical analysis of samples of benthic invertebrates**. 2. ed. Ambleside: Freshwater Biological Association, 1979. 160 p. (Scientific Publication, 25).

ELLIOTT, J. M. **Some methods for the statistical analysis of samples of benthic invertebrates**. 2. ed. Ambleside: Freshwater Biological Association, 1979. (Outras edições: 1977, 1983).

EMBRAPA. **Cupulate agora é marca registrada da Embrapa**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2015. Disponível em: <https://cloud.cnpgc.embrapa.br/clpi/cupulate-agora-e-marca-registrada-da-embrapa/>. Acesso em: 10 dez. 2025.

FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. **Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections**. Beltsville: ARS, USDA, 2016. Disponível em: <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>. Acesso em: [17/12/2025].

FERREIRA, D. F. *et al.* **Estatística aplicada à fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2009.

FERREIRA, F. A. *et al.* **Sintomatologia da murcha de *Ceratocystis fimbriata* em eucalipto**. Revista Árvore, Viçosa, v. 30, n. 2, p. 155-162, 2006.

FERREIRA, J. B. *et al.* **Análise da dinâmica, estrutura de focos e arranjo espacial da mancha manteigosa em campo**. Ciência e Agrotecnologia, v. 33, n. 1, p. 24-30, 2009.

FIRMINO, A. C. **Caracterização de isolados de *Ceratocystis* sp., avaliação de resistência clonal de eucalipto e sensibilidade deste fungo a diferença fungicida**. 2011. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

FLAUTERO-MURILLO, C. L. *et al.* **First record of *Macrosoma tipulata* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Hedyliidae) for Colombia as a species of agricultural importance in cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum) (Malvaceae)**. Entomotrópica, n. 36, p. 51-57, 2021.

FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. **Characterization of *Colletotrichum* species from almond and other fruits by RFLP analysis of the ribosomal DNA region**. Mycological Research, v. 102, n. 4, p. 433-439, 1998.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R. **Epidemiologia da vassoura de bruxa (*Crinipellis perniciosa*) do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*)**. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE VASSOURA-DE-BRUXA NO CACAUEIRO, 4., 2002, Manaus. **Anais [...]**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2002. p. 139-144.

GASPAROTTO, L. *et al.* **Aspectos fitossanitários da cultura do cupuaçu em propriedades rurais no Estado do Pará**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2010. (Documentos, 103).

GHINI, R.; HAMADA, E. **Mudanças climáticas: impactos sobre doenças de plantas no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. 331 p.

GHINI, R.; HAMADA, E.; BETTIOL, W. **Impactos das mudanças climáticas sobre doenças de plantas no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa, 2011. 356 p.

GHOSH, A. *et al.* **Species of *Neopestalotiopsis* causing leaf spot disease in Myrtaceae.** *Mycological Progress*, v. 19, p. 1-14, 2020.

GOITIA, W.; ROSALES, C. J. Relación entre la incidencia de escolítidos y la necrosis del cacao en Aragua, Venezuela. **Manejo Integrado de Plagas**, Turrialba, v. 62, p. 65-75, 2001.

GOMES, A. P. **Etiologia e epidemiologia do cancro-de-botryosphaeria em plantio de *Eucalyptus urophylla* no estado do Acre.** 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2020.

GOMES, R. R. *et al.* *Diaporthe*: diversity, phylogeny, and taxonomy. *Persoonia*, [s. l.], v. 31, p. 1-41, 2013.

GONÇALVES, R. C. *et al.* Armazenamento de microrganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (ed.). **Métodos de fitopatologia.** Viçosa: UFV, 2007. p. 91-102.

GONÇALVES, R. C. *et al.* Doenças do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*). In: KIMATI, H. *et al.* (ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas.** 5. ed. Ouro Fino: Agrônômica Ceres, 2016. v. 2, p. 315-324.

GONÇALVEZ, R. C.; ALMEIDA, J. Caracterização e manejo de doenças em cultivos de cupuaçu. **Revista Brasileira de Fitopatologia**, v. 38, n. 2, p. 123-135, 2015.

GONDIM, T. M. S. *et al.* **Aspectos da produção de cupuaçu.** Rio Branco: Embrapa Acre, 2001. 41 p. (Documentos, 67).

GOTTWALD, T. R. Analysis of disease progress and spatial patterns. **Phytopathology**, v. 85, p. 108–118, 1995.

GOTTWALD, T. R. *et al.* Preliminary spatial and temporal analysis of citrus variegated chlorosis (CVC) in São Paulo, Brazil. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 12., 1993, Campinas. **Proceedings [...]**. Riverside: IOCV, 1993. p. 327-335.

GOTTWALD, T. R.; GUMPERTZ, M. L.; LOUWS, F. J. Spatio-temporal analysis of plant disease epidemics. **Phytopathology**, St. Paul, v. 89, n. 11, p. 1075-1080, 1999.

GRIMM, G. R.; HUTCHISON, J. G. Pathogenicity and host range of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Phytopathology**, v. 63, p. 1363–1366, 1973.

GUALBERTO, G. F. *et al.* *Neopestalotiopsis formicarum* causing leaf spot on guarana plants in the Brazilian Amazon. **Phytotaxa**, v. 478, n. 1, p. 71-86, 2021.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, [s. l.], v. 41, p. 95-98, 1999.

HANADA, R. E. *et al.* Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuaçu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. **Fungal Biology**, [s. l.], v. 114, n. 11-12, p. 901-910, 2010.

HAWKSWORTH, D. L. *et al.* **Dictionary of the fungi.** [s. l.]: CAB International, 1995.

HIROOKA, Y. et al. A taxonomic revision of *Nectria sensu stricto*. **Studies in Mycology**, [s. l.], v. 71, p. 1-210, 2012.

HYDE, K. D. et al. *Colletotrichum* – a review of the world's most important plant pathogenic fungi. **Fungal Diversity**, [s. l.], v. 39, p. 147-182, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agropecuária**. Rio de Janeiro: IBGE, 2017. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/cupuaçu/br>. Acesso em: 14 fev. 2025.

ARDIM JUNIOR, A. M. **Custo-efetividade e padrões ambientais**: implicações para tratamento de esgotos no Brasil. 2006. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Sustentável) – Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

JESUS JUNIOR, W. C.; BASSANEZI, R. B. Análise da dinâmica e estrutura de focos da morte súbita dos citros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 399-405, 2004.

JESUS-BARROS, C. R. et al. **A broca-dos-ramos-do-cupuaçuzeiro (*Magulacra nigripennata* Dognin, 1924) no Amapá**. Macapá: Embrapa Amapá, 2016. (Comunicado Técnico, 141).

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; STALPERS, J. A. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi**. 10th ed. Wallingford: CAB International, 2008.

KRANZ, J.; AUST, H. J.; STEFENS, H. G. *Comparative Epidemiology of Plant Diseases*. Berlin: Springer, 1988.

KRANZ, J. *Epidemics of Plant Diseases: Mathematical Analysis and Modeling*. 2. ed. Berlin: Springer-Verlag, 1990.

KRANZ, J.; ROTEM, J. (Eds.). *Experimental Techniques in Plant Disease Epidemiology*. 1. ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1988. 299 p.

KRANZ, J. Comparison of epidemics. **Phytopathology**, St. Paul, v. 64, n. 6, p. 820-828, 1974.

KREBS, C. J. **Ecological methodology**. 2. ed. Menlo Park: Benjamin/Cummings, 1999. 620 p.

KUO, H.-C. et al. Secret lifestyles of *Neurospora crassa*. **Scientific Reports**, v. 4, p. 5135, 2014. DOI: 10.1038/srep05135.

KURAMAE-IZIOKA, E. E. et al. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* spp. from citrus orchards affected by postbloom fruit drop in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 103, n. 4, p. 323-329, 1997. DOI: 10.1023/A:1008627302706.

LARANJEIRA, F. F. Dinâmica e estrutura de focos de doenças em culturas perenes. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 230-238, 1997.

LARANJEIRA, F. F. Epidemiologia de doenças de plantas perenes: análise espacial e temporal. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 253-260, 1997.

LARANJEIRA, F. F. et al. Análise espacial do amarelecimento fatal do dendezeiro como ferramenta para elucidar sua etiologia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 3, p. 397-403, 1998.

LARANJEIRA, F. F. et al. Dinâmica e estrutura de focos da clorose variegada dos citros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 56-65, 2004.

LARANJEIRA, F. F. et al. Análise da dinâmica espacial da clorose variegada dos citros no estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 12-22, 2004. DOI: 10.1590/S0100-41582004000100004.

LAZAROTTO, M. **Identificação e caracterização de *Fusarium* spp. e *Pestalotiopsis* spp. associados a *Carya illinoensis* no Rio Grande do Sul**. 2013. 143 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

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

LI, W.; ZHENG, H. et al. **Genome-wide analyses of selection in *Phytophthora sojae* reveal genes potentiality involved in adaptive evolution**. *Scientific Reports*, v. 7, p. 4337, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-04664-y.

LI, X.; ZHENG, W. Advances in integrated management strategies for controlling crop diseases. **Journal of Plant Protection Research**, v. 60, n. 3, p. 201-210, 2020. DOI: 10.24425/jppr.2020.133568.

LI, W. et al. Molecular phylogeny and morphology of *Lasiodiplodia* species associated with papaya fruit rot. **Phytopathology**, v. 104, n. 3, 2014.

LOMBARD, L. et al. *Calonectria* species: a review of their taxonomy, phylogeny, and pathogenicity. **Studies in Mycology**, v. 66, p. 1-86, 2010.

LOMBARD, L. et al. Taxonomy and phylogeny of *Calonectria* and its *Cylindrocladium* anamorphs. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 71, p. 1-135, 2012.

LÓPEZ, P. A. B. **Avaliação da cadeia produtiva do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.) nos municípios de Itacoatiara, Presidente Figueiredo e Manaus**. 2015. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Florestas Tropicais) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2015.

LOROS, J. J.; DUNLAP, J. C. The *Neurospora* circadian clock: a mechanism for diurnal and seasonal timing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 10, p. 764-774, 2001.

LOURIDO, G. et al. Parâmetros biológicos e injúrias de *Macrosoma tipulata* Hübner (Lepidoptera: Hedylidae) em cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.) no Amazonas. **Neotropical Entomology**, v. 36, n. 3, p. 403-407, 2007.

LUDWIG, J. A.; REYNOLDS, J. F. **Statistical ecology: a primer on methods and computing**. New York: Wiley-Interscience, 1988. 337 p.

LUZ, E. D. M. N. et al. Doenças do cupuaçuzeiro. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L.; CAIXETA, E. T. (Org.). **Doenças de Plantas Perenes: Fruteiras**. Viçosa: UFV, 2001. p. 253-272.

MADDEN, L. V.; HUGHES, G.; VAN DEN BOSCH, F. **The study of plant disease epidemics**. St. Paul: APS Press, 2007. 421 p.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N. et al. Towards a natural classification and backbone tree for *Sordariomycetes*. **Fungal Diversity**, v. 72, n. 1, p. 199-301, 2015. DOI: 10.1007/s13225-015-0331-z.

MAIA, A. L. S. et al. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de frutos de palmeira juçara. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 40, n. 1, p. 57-60, 2014.

MASSON, M. V. **Ferrugem do eucalipto: planejamento evasivo, estimativa de dano e análise da viabilidade do controle químico**. 2009. 101 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

MEDEIROS, R. D. **Análise do arranjo espacial e determinação da estrutura de focos da resinose do coqueiro (*Cocos nucifera* L.) na região de Neópolis, Sergipe**. 2010. 74 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

MELA, A. P. et al. Quantitative analysis of growth rate variation in *Neurospora crassa* using race tubes. **Genetics**, v. 215, n. 3, p. 1–12, 2023.

MENEZES, M.; SILVA-HANLIN, D. M. W. Microculturas. In: MENEZES, M.; SILVA-HANLIN, D. M. W. (Ed.). **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. Recife: Imprensa Universitária da UFRPE, 1997. p. 79-80.

MEZZOMO, R. **Ceratocystis fimbriata Ellis & Halsted em espécies florestais no Rio Grande do Sul: comportamento e controle biológico**. 2014. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

MILLER, J. R. et al. A rapid and simple method for extracting DNA from plant tissues. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 6, n. 3, p. 226-231, 1988.

MOTA, L. S. S. et al. Prospecção tecnológica de *Theobroma grandiflorum*: mapeamento de tecnologias geradas a partir do cupuaçu. **Cadernos de Prospecção**, v. 13, n. 3, p. 733-747, 2020. DOI: 10.9771/cp.v13i3.33614.

MOUNDE, L. G. et al. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species causing dieback of citrus in Kenya. **African Journal of Agricultural Research**, v. 7, n. 34, p. 4831-4837, 2012. DOI: 10.5897/AJAR12.1343.

NELSON, S. C. A simple analysis of disease foci. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, n. 4, p. 332-339, 1996.

NUNES, A. M. L. **Doenças do cupuaçu**. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1991. 22 p. (EMBRAPA-CPATU. Documentos, 57).

NUNES, A. M. L. et al. Ocorrência de *Cylindrocladium kyotense* em cupuaçuzeiro e morototozeiro no Amazonas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 16, supl., p. 18, 1991.

OLIVA, A. S.; ALVES, R. M.; FERREIRA, M. A. S. V.; MARQUES, J. R. V. **Caracterização molecular de isolados de *Moniliophthora perniciosa* de cupuaçuzeiro no estado do Pará**.

Brasília, DF: Embrapa Amazônia Oriental, 2013. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 88).

OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. Identificação e manejo das principais doenças do cacaueteiro no Brasil. In: VALLE, R. R. (Ed.). **Ciência, tecnologia e manejo do cacaueteiro**. Ilhéus: CEPLAC/CEPEC, 2005. p. 55-63.

OLIVEIRA, M. L. et al. Murcha-de-*Ceratocystis* em cupuaçu no Estado da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 136, 2006.

OLIVEIRA, M. L. Doenças do cacaueteiro. In: VALLE, R. R. (Ed.). **Ciência, tecnologia e manejo do cacaueteiro**. 2. ed. Ilhéus: Ceplac/Cepec, 2017. p. 68-104.

OLIVEIRA, R. S. et al. Diversity and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with tropical fruit trees in Brazil. **Plants**, v. 13, n. 4, p. 512, 2024. DOI: 10.3390/plants13040512.

PAMPLONA, A. M. S. R.; SOUZA, A. G. C. **Controle da broca-da-ponteira em mudas de cupuaçuzeiro**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2010. 4 p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Comunicado Técnico, 89).

PERKINS, D. D.; RADFORD, A.; SACHS, M. S. **The Neurospora compendium: chromosomal loci**. San Diego: Academic Press, 2001. 352 p.

PHILLIPS, A. J. L. et al. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. **Fungal Diversity**, v. 61, n. 1, p. 1-39, 2013. DOI: 10.1007/s13225-013-0232-9.

PIELOU, E. C. **Mathematical ecology**. New York: John Wiley & Sons, 1977. 385 p.

PIMENTA, L. V. A. **Diversidade genética de *Ceratocystis fimbriata* em *Eucalyptus* spp. no Sul da Bahia**. 2014. 45 f. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

PONTES, J. S. et al. Fungos associados a podridões de frutos de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, supl., p. S164, 2006.

PRUSKY, D.; GAT, Z.; AFEK, U. Relationship between climatic conditions and anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) disease of avocado fruits after harvest. **Plant Disease**, v. 77, n. 11, p. 1157-1162, 1993.

PUGLIESE, A. G. **Compostos fenólicos do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e do cupulate: composição e possíveis benefícios**. 2010. 129 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

QUERINO, C. M. B. **Agressividade, patogenicidade e caracterização molecular de *Fusarium* spp. causadoras de podridão em *Ananas comosus* var. *comosus***. 2021. 119 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2021.

REYNOLDS, D. R.; MADDEN, L. V. Analysis of spatial pattern in plant disease epidemics. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, n. 2, p. 240-246, 1988.

- ROGEZ, H. et al. Chemical composition of the pulp of three typical Amazonian fruits: araçá-boi (*Eugenia stipitata*), bacuri (*Platonia insignis*) and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **European Food Research and Technology**, v. 218, n. 4, p. 380-384, 2004.
- ROLIM, J. M. et al. Characterization of *Fusarium* spp. causal agent of wilt in pecan. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 69, n. 6, p. 720-730, 2022. DOI: 10.1590/0034-737X202269060009.
- ROLLEMBERG, P. A. et al. Biocontrol of *Colletotrichum gloeosporioides* on mango by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Scientia Horticulturae**, v. 176, p. 119-124, 2014. DOI: 10.1016/j.scienta.2014.06.037.
- ROLLEMBERG, C. L. et al. Spatial and temporal dynamics of soybean rust. **Journal of Phytopathology**, v. 163, n. 10, p. 834-843, 2015. DOI: 10.1111/jph.12381.
- ROSSMAN, A. Y. et al. A preliminary account of the genera of Nectriaceae. **Mycologia**, Lawrence, v. 91, n. 3, p. 480-505, 1999.
- RYAN, F. J.; BEADLE, G. W.; TATUM, E. L. The tube method of measuring the growth rate of *Neurospora*. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 30, n. 10, p. 784-799, 1943.
- RYAN, F. J. et al. The relations of nutritional deficiency to the production of abnormal structures in *Neurospora*. **American Journal of Botany**, v. 30, n. 1, p. 783-793, 1943.
- SALGADO, H. L. C. et al. Estabilidade físico-química e microbiológica de sobremesa láctea com cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1158-1163, 2011.
- SAMSON, R. A. et al. Phylogeny and identification of *Aspergillaceae*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 78, p. 1-141, 2014. DOI: 10.1016/j.simyco.2014.07.004.
- SANTOS, A. F. **Distribuição e estratégia de controle da murcha-de-Ceratocystis e da gomose de *Phytophthora* nas plantações brasileiras de acácia-negra**. Colombo: Embrapa Florestas, 2007. 6 p. (Embrapa Florestas. Comunicado Técnico, 195).
- SANTOS, A. M. T. B. et al. Elaboração do Business Model Generation para uma nova variedade de cupuaçu. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GESTÃO DE PROJETOS E INOVAÇÃO, 7., 2018, Aracaju. **Anais...** Aracaju: EBS, 2018. p. 148-158. (Disponível no Repositório ALICE - Embrapa Amazônia Oriental).
- SANTOS, J. M. et al. Re-evaluation of the genus *Diaporthe* based on phylogenetic analysis of combined ITS, TEF1- α and beta-tubulin gene sequences. **Fungal Biology**, v. 121, n. 3, p. 219-238, 2017. DOI: 10.1016/j.funbio.2016.12.002.
- SANTOS, R. S. et al. Infestation of *Magulacra nigripennata* Dognin (Lepidoptera: Cossidae) in a commercial cupuaçu plantation in Nova Califórnia, Rondônia State, Brazil. **EntomoBrasilis**, v. 13, e912, p. 1-3, 2020. DOI: 10.12741/ebrasilis.v13.e912.
- SANTOS, R. S. et al. **Broca-dos-ramos-do-cupuaçu: monitoramento, identificação e estratégia de controle**. Rio Branco: Embrapa Acre, 2021. 8 p. (Embrapa Acre. Comunicado Técnico, 253).

SANTOS, V. C. C. **As análises econômicas na incorporação de tecnologias em saúde: reflexão sobre a experiência brasileira**. 2010. Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro, 2010.

SCHRAMMEL, F.; RIBEIRO, J. **Desenvolvimento de barra mista de frutas com açaí (*Euterpe precatória*) e com cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*): avaliação físico-química, sensorial e microbiológica**. 2014. Monografia – Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2014.

SEBRAE (Acre). **Cupuaçu: opções de investimento no Acre com produtos florestais não-madeireiros**. Rio Branco: SEBRAE, 1995. (Produtos Potenciais da Amazônia).

SERRA, I. M. R. S. et al. Caracterização de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* procedentes de diferentes hospedeiros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 2, p. 123-132, 2006.

SILVA, J. A. Características e usos dos frutos de cupuaçu na alimentação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 42, n. 1, p. 1-10, 2020.

SILVA, J. N. et al. Spatial distribution of cases of fatal yellowing on organic oil palm plantation. **Semina: Ciência Agrária**, v. 37, n. 5, p. 3047-3053, 2016.

SILVA, J. **Amazônia e seus frutos**. São Paulo: Editora Amazônia, 2020.

SILVA, M. A.; RESENDE, M. L. V. Doenças do cupuaçuzeiro: etiologia, epidemiologia e manejo integrado. **Agrotrópica**, v. 32, n. 2, p. 45–58, 2020.

SILVA, M. A.; RESENDE, M. L. V. Epidemiologia e manejo da vassoura-de-bruxa em cupuaçuzeiro. **Agrotrópica**, v. 32, n. 2, p. 45–58, 2020.

SILVA, S. D. et al. Genetic diversity and vegetative compatibility of *Ceratocystis fimbriata* populations from eucalyptus in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, n. 4, p. 239-247, 2012.

SIVIERO, A. et al. **Avaliação de métodos de inoculação de *Phytophthora parasitica* em plântulas e plantas jovens de citros**. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 27, n. 6, p. 574-580, nov./dez. 2002.

SIVIERO, A. et al. **Monitoramento de doenças em plantações de cupuaçu no Estado do Acre**. Porto Velho: Embrapa Acre, 2015. (Relatório Técnico, 123).

SIVIERO, A. et al. Doenças em cacaueiro e cupuaçuzeiro no Acre. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 34, n. 2, p. 159-164, 2022.

SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p. 90–106, 2007.

SODRÉ, G. A. **Cultivo do cacaueiro no estado da Bahia**. Ilhéus: CEPLAC, 2017. p. 81-83.

SOUSA, M. S. et al. Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) culture: main pests of economic damage. **Journal of Experimental Agriculture International**, v. 44, n. 5, p. 33-39, 2022.

SOUTHWOOD, T. R. E.; HENDERSON, P. A. **Ecological Methods**. 3. ed. Oxford: Blackwell Science, 2000.

- SOUZA, A. G. C. *et al.* **Boas práticas agrícolas da cultura do cupuaçuzeiro**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2007.
- SOUZA, A. G. C. *et al.* **A cultura do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.)**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 1999. (Circular Técnica, 2)
- SOUZA, A. G. C. *et al.* **A cultura do cupuaçu**: mudas. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. (Coleção Plantar, 62).
- SOUZA, A. G. C. *et al.* The cupuaçuzeiro genetic improvement program at EMBRAPA Amazônia Ocidental. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 471-478, 2002.
- SOUZA, A. G. C. *et al.* Doenças do cupuaçu. **Revista Brasileira de Fitopatologia**, v. 37, n. 1, p. 45-56, 2014.
- SOUZA, A. G. C. *et al.* Doenças do cupuaçu. In: **Título do Livro**. Local de publicação: Editora, 2014. p. 123-145.
- SPRINGER, M. L. Genetic control of fungal differentiation: the three sporulation pathways of *Neurospora crassa*. **BioEssays**, v. 15, n. 6, p. 365-374, 1993.
- SUTTON, B. C. **The Coelomycetes**: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1980.
- SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: **COLLETOTRICHUM**: biology, pathology and control. Wallingford: C. A. B. International, 1992. p. 1-26.
- SWOFFORD, D. L. **PAUP***: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version 4.0b10. Sunderland: Sinauer Associates, 2003.
- TAIZ, L. *et al.* **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- TEIXEIRA, C. A. D.; VELD, P. V. **As pequenas brocas do cupuaçu, *Xyloborus* sp. e *Hypocryphalus* sp. (Coleoptera: Scolytidae)**: danos e indicadores de manejos em sistemas agroflorestais de Rondônia. Porto Velho: Embrapa-CPAF-Rondônia, 1997.
- THOMAZINI, M. J. **Medidas para controle da broca-dos-frutos do cupuaçuzeiro**. Rio Branco: Embrapa Acre, 1998.
- TUMURA, K. G. **Avaliação de resistência, análise epidemiológica e caracterização anatômica da madeira em clones de *Eucalyptus* sp. infectados por *Ceratocystis fimbriata***. 2011. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.
- TUMURA, K. G. *et al.* Murcha por *Ceratocystis* em eucalipto: avaliação de resistência e análise epidemiológica. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 1, p. 54-60, 2012.
- TUMURA, K. G. Avaliação da resistência e análise epidemiológica de clones de *Eucalyptus* sp. infectados por *Ceratocystis fimbriata*. **Revista Brasileira de Fitopatologia**, v. 43, n. 1, p. 40-50, 2015.
- UDAYANGA, D. *et al.* The genus *Diaporthe*: a revision of generic diagnoses and molecular phylogenetic resolutions. **Fungal Diversity**, v. 50, p. 189-225, 2011.

- UDAYANGA, D. *et al.* A multi-locus phylogeny reveals new species of *Diaporthe*. **Fungal Diversity**, v. 67, p. 203-229, 2014.
- VALE, F. X. R. *et al.* **Quantificação de doenças de plantas**. Viçosa: UFV, 2004.
- VALE, F. X. R. **Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2004.
- VALE, F. X. R. *et al.* **Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas**. Viçosa: Ed. UFV, 2017.
- VAN DEN BOSCH, F. *et al.* **The study of plant disease epidemics**. St. Paul: APS Press, 2007.
- VANNI, T. *et al.* Avaliação econômica em saúde: aplicações em doenças infecciosas. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, p. 2543-2552, 2009.
- VENTURA, J. A. *et al.* Epidemiologia e manejo de doenças em sistemas agroflorestais. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 13, n. 2, p. 25–38, 2018.
- VRIESMANN, L. C. Polysaccharides from the pulp of cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*): structural characterization of a pectic fraction. **Carbohydrate Polymers**, p. 2-4, 2008.
- WAINWRIGHT, M. **Fungi: biology and applications**. [s. l.]: Ellis Horwood, 1992.
- WANG, M. *et al.* Phylogenetic reassessment of *Nigrospora*. **Mycologia**, v. 109, n. 1, p. 27-39, 2017.
- WANG, M. M. *et al.* *Fusarium incarnatum-equiseti* complex from China. **Persoonia**, v. 43, n. 1, p. 70-89, 2019.
- WHITE, T. J. *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. *et al.* (Eds.). **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-322.
- XAVIER, K. V. *et al.* *Dwiroopa punicae* sp. nov., associated with leaf spot and fruit rot of pomegranate. **FUSE**, v. 4, p. 73-85, 2019.
- ZADOCKS, J. C.; SCHEIN, R. D. **Epidemiologia e manejo de doenças de plantas**. 1. ed. São Paulo: Editora Agronômica, 1979.
- ZANUNCIO, J. C. *et al.* *Sphallenum tuberosum* (Coleoptera: Cerambycidae) em plantas de *Eucalyptus* spp. no município de Prado, Bahia. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 2, p. 339-343, 2005.
- ZHENG, H. *et al.* Genomic analysis of the *Colletotrichum* species complex reveals the molecular basis of host specificity and lifestyle transition. **BMC Genomics**, v. 22, p. 541, 2021.