

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**

**ETIOLOGIA DA MORTE DE PLANTAS E ALGUNS FUNGOS
ISOLADOS DE CRAVEIRO-DA-ÍNDIA (*Syzygium aromaticum*) NO
BAIXO SUL DA BAHIA**

JULIELTON SANTOS DA SILVA

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
SETEMBRO – 2022**

**ETIOLOGIA DA MORTE DE PLANTAS E ALGUNS FUNGOS
ISOLADOS DE CRAVEIRO-DA-ÍNDIA (*Syzygium aromaticum*) NO
BAIXO SUL DA BAHIA**

JULIELTON SANTOS DA SILVA

Engenheiro Agrônomo
Universidade do Estado da Bahia, 2013

Mestrado em Ciências Agrárias
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2016

Tese apresentada ao Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Agrárias, Área de Concentração: Fitotecnia (Fitopatologia).

Orientador: Prof^o. Dr^o. José Luiz Bezerra
Co-orientador: Prof^o. Dr^o. Carlos Augusto Dórea Bragança
Co-orientador: Prof^o. Dr^o. José Ricardo G. Magalhães

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

SETEMBRO – 2022

FICHA CATALOGRÁFICA

S586e

Silva, Julielton Santos da.

Etiologia da morte de plantas e alguns fungos isolados de craveiro-da-índia (*Syzygium aromaticum*) no Baixo Sul da Bahia: *Cytospora eugeniae* e *Chrysosporthe cubensis* associados a morte de craveiro-da-índia (*Syzygium aromaticum*) / Julielton Santos da Silva. Cruz das Almas, BA, 2022.

84f.; il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Doutorado em Ciências Agrárias.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Bezerra.

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Dórea Bragança.

1.Plantas aromáticas – Fitopatologia – Doenças e pragas.
2.Tagetes – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.
II.Título.

CDD: 633.88

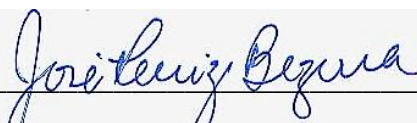
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**

**ETIOLOGIA DA MORTE DE PLANTAS E ALGUNS FUNGOS ISOLADOS DE
CRAVEIRO-DA-ÍNDIA (*Syzygium aromaticum*) NO BAIXO SUL DA BAHIA**

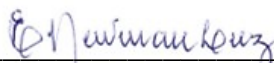
COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE

Julielton Santos da Silva


Realizada em 30 de setembro de 2022



Prof. Dr. José Luiz Bezerra
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia / UFRB
Presidente (Orientador)



Profa. Dra. Edna Dora Martins Newman Luz
Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira / CEPLAC
Examinador Externo



Dr. Leonardo de Oliveira Barbosa
JCO Bioprodutos
Examinador Externo



Dr. Mateus Endringer Caliman
Universidade Estadual de Santa Cruz / UESC
Examinador Externo



Prof. Dr. Armínio Santos
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia / UESB
Examinador Externo

DEDICATÓRIA

À Deus, por estar presente em todos os momentos da minha vida.

Ofereço

Aos meus pais, José Lima da Silva e Djanira Gomes dos Santos, pelo amor, carinho e apoio que dedicam a mim. Minha enorme gratidão por compreender e aceitar os vários momentos de solidão para que este trabalho se consolidasse.

Aos meus irmãos, Itanivaldo, Jucilene, Pedro Gilson, Antônio Carlos, Maria de Lourdes, Eliana, Nivalda Maria, Paulo Cesar e Mario Antônio, por acreditaram e confiaram na minha capacidade.

À Geiza, pelo amor, carinho, apoio e paciência em todos os momentos dessa jornada. Pelo incentivo, pelo companheirismo e por participar dessa conquista.

E a Vicente meu filho, presente de Deus em minha vida.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, à Deus, que iluminou e guiou meus passos nessa jornada e me deu sabedoria para concluir esta etapa.

À todos os meus familiares, pelo apoio e pelo incentivo durante toda minha caminhada de ensino.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pela estrutura disponibilizada na execução deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da UFRB pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado.

Ao meu orientador professor Dr. José Luiz Bezerra, pessoa muito especial, pelos ensinamentos acadêmicos, pelo apoio nas pesquisas, pelo incentivo, pela paciência e principalmente pela persistência. Sou muito grato pela confiança depositada em meu trabalho.

Ao meu coorientador professor Dr. Carlos Augusto Dórea Bragança, por todo apoio e atenção recebidos na Clínica Fitossanitária, durante todo o desenvolvimento dos trabalhos.

Ao professor Dr. José Ricardo G. Magalhães, por ajudar e contribuir no uso de drone e sensores remotos acoplados no estudo da sanidade de craveiros, enriquecendo ainda mais este trabalho.

Aos amigos da Clínica Fitossanitária, em especial a técnica Carolina Yamamoto, pela amizade e por toda ajuda no desenvolvimento dos trabalhos.

Ao professor Dr. Givaldo Rocha Niella, pelo entusiasmo e incentivo na pesquisa sobre as doenças do craveiro, e por se dispor a compartilhar sua experiência em fitopatologia.

Ao Dr. Rafael Vilela de Oliveira, pelo apoio e contribuição ao compartilhar seu vasto conhecimento em análise molecular.

A todos os funcionários das unidades locais da CEPLAC dos municípios do Baixo Sul, pelo apoio e contribuição durante as coletas.

Aos produtores de cravo-da-índia da região do Baixo Sul da Bahia, que gentilmente cederam suas e um pouco do seu tempo para as coletas, em especial ao Sítio Bahia e Fazenda Três Barras.

A todos da APROCRAVO, em especial a Solano e Zeinha, o apoio, ajuda de vocês foram muito importantes para realização da pesquisa.

Ao CIAPRA Baixo Sul, pelo auxílio concedido na etapa final deste trabalho.

A CEPLAC, pelo apoio durante as coletas.

À CAPES, pela bolsa concedida.

E a todos que contribuíram, direta ou indiretamente em toda a minha formação acadêmica e para a realização deste trabalho.

OBRIGADO A TODOS!!!

DADOS BIOGRÁFICOS

JULIELTON SANTOS DA SILVA – filho de José Lima da Silva e Djanira Gomes dos Santos, nasceu em Ipirá-BA, em 27 de maio de 1988. Residente e domiciliado na Primeira Travessa da Rua Pau Brasil, N° 65, Bairro Ana Lúcia, CEP 44.380-000, Cruz das Almas, Bahia

Graduado em Engenharia Agrônômica pela Universidade do Estado da Bahia – UNEB/Campus IX, Barreiras (abril de 2008 a outubro de 2013). Trabalho de Conclusão de Curso - Inibição *In Vitro* do Crescimento Micelial do Fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* Utilizando Isolados de Actinomicetos Obtidos da Rizosfera de Plantas Nativas do Cerrado Baiano.

Em março de 2014, ingressou no mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, sob orientação do Dr. José Luiz Bezerra. A dissertação intitulada “Diversidade de fungos associados a laranjeiras (*Citrus sinensis* L. Osbeck) nos municípios de Cruz das Almas e Rio Real, Bahia”, concluída em maio de 2016.

Em agosto de 2017, iniciou o curso de Doutorado em Ciências Agrárias na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, na área de concentração Fitotecnia, Linha de Pesquisa Bioecologia e Manejo de Insetos e Micro-organismos (Fitopatologia), com o projeto de tese intitulado “Etiologia da Morte de Cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum* (L) Merr. & Perry) na Região do Baixo Sul da Bahia”, sob orientação do Dr. José Luiz Bezerra.

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO GERAL	14
REFERÊNCIAL TEÓRICO	17
CAPÍTULO 1	
<i>Cytospora eugeniae</i> E <i>Chrysosporthe cubensis</i> ASSOCIADOS A MORTE DE CRAVEIRO-DA-ÍNDIA (<i>Syzygium aromaticum</i>) NA BAHIA, BRASIL	33
CAPÍTULO 2	
FIRST REPORT OF SUDDEN DEATH OF CLOVE TREES CAUSED BY <i>Cytospora eugeniae</i> IN BRAZIL	63
CAPÍTULO 3	
FIRST REPORT OF <i>Chrysosporthe cubensis</i> CAUSING ACUTE DIEBECK DISEASE IN CLOVES (<i>Syzygium aromaticum</i>) IN BRAZIL	67
CAPÍTULO 4	
FUNGOS ASSOCIADOS A CRAVEIROS NO BAIXO SUL DA BAHIA E NOVOS REGISTROS	74
CONSIDERAÇÕES FINAIS	87

ETIOLOGIA DA MORTE DE PLANTAS E ALGUNS FUNGOS ISOLADOS DE CRAVEIRO-DA-ÍNDIA (*Syzygium aromaticum*) NO BAIXO SUL DA BAHIA

Autor: Julielton Santos da Silva
Orientador: Dr. José Luiz Bezerra

RESUMO

O craveiro-da-índia (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry) é uma árvore de grande porte que pode atingir até 15 metros de altura e pode durar mais de 100 anos e seu produto, o cravo-da-índia é utilizado principalmente como especiaria ou na fabricação de medicamentos. O Brasil produziu 1.418 toneladas de cravo em 2017, sendo que a totalidade da produção nacional é restrita ao estado da Bahia, que explora a cultura comercialmente, mais especificamente na região do Baixo Sul onde ocorre a morte de craveiros por causas, até então, não definidas. Os objetivos deste trabalho foram: i) identificar os agentes etiológicos causadores dessa morte de craveiros e ii) registrar a ocorrência de outros fungos associados ao craveiro-da-índia. Para isso, foram realizadas coletas em duas propriedades de cinco municípios nos anos de 2017 a 2019. Amostras de raízes, caule/casca e ramos de cinco plantas vivas ou mortas com sintomas e sinais de doença, foram levadas para a Clínica Fitossanitária Professor Edgar Santos Filho do Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas – CCAAB da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB. Os fragmentos foram desinfestados, para isolamento indireto e direto. O agente da morte súbita do craveiro foi identificado como *Cytospora eugeniae*, sendo este, o primeiro relato deste patógeno causando morte súbita em craveiro-da-índia no Brasil. O fungo *Chrysosporthe cubensis* foi também constatado em constante associação à craveiros doentes e mortos nas mesmas localidades. Para comprovar a patogenicidade desses fungos, ambos foram inoculados em fragmentos dos ramos de plantas de craveiro sadias, os quais, quinze dias após a inoculação exibiram lesões típicas enquanto que os controles permaneceram sem sintomas. Ambos patógenos foram reisolados dos fragmentos de caule inoculados. *Cytospora eugeniae* esteve associado sempre com craveiros que apresentavam sintomas ou morreram de morte súbita. Os sintomas de morte súbita consistem em uma clorose muito leve, difícil de ser diagnosticada, seguida por forte queda de folhas e repentina murcha das folhas restantes, as quais adquirem uma cor marrom-avermelhada enquanto ainda estão na árvore. Um sintoma característico da doença no tronco é uma coloração amarela intensa, visível abaixo da casca. *Chrysosporthe cubensis* ocorreu sempre associado com sintomas de morte regressiva de galhos, sintomatologia também denominada de doença conhecida como “dieback” ou “dieback agudo”, encontrado também associado à morte súbita de craveiros jovens. Este patógeno é um parasita que penetra no hospedeiro por meio de feridas feitas em craveiros de todas as idades, podendo causar a morte súbita de árvores jovens. O fungo coloniza tanto a madeira como a casca, onde provoca uma descoloração castanho-avermelhada dos tecidos parasitados, muito

distinta e característica. Foram identificados 23 fungos associados ao cravo-da-índia no Baixo Sul da Bahia, destes, 20 foram identificados morfologicamente ao microscópio ao nível de gênero e 5 a nível de espécies. São novos registros para *Syzygium aromaticum*: *Acremonium* sp., *Cytospora brevispora*, *Gliocladiopsis tenuis*, *Idriella* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Rhizopus* sp., *Septoria* sp., *Trichoderma* sp., *Trichoderma longibrachiatum*. Estes resultados contribuirão para o manejo de doenças do craveiro-da-índia na Bahia, que ameaça a produção de cravo e o emprego de aproximadamente 60 mil trabalhadores.

Palavras-chave: Morte-súbita, Dieback agudo, *Cytospora eugeniae*, *Chrysoporthe cubensis*, fitopatógeno.

ETIOLOGY OF DEATH OF PLANTS AND SOME FUNGI ISOLATED FROM CLOVE (*Syzygium aromaticum*) IN THE LOW SOUTH OF BAHIA

Author: Julielton Santos da Silva

Advisor: Dr. José Luiz Bezerra

ABSTRACT

The clove tree (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry) is a large tree that can reach up to 15 meters in height and can last for more than 100 years and its product, the clove is mainly used as a spice or in the manufacture of medicines. Brazil produced 1,418 tons of cloves in 2017, with the entire national production restricted to the state of Bahia, which exploits the crop commercially, more specifically in the Lower South region where the death of clove trees occurs due to causes, until then, not defined. The objectives of this work were: i) to identify the etiological agents causing this death of clove trees and ii) to record the occurrence of other fungi associated with clove tree. For this, collections were carried out on two properties in five municipalities from 2017 to 2019. Samples of roots, stem/bark and branches of five live or dead plants with symptoms and signs of disease were taken to the Phytosanitary Clinic Professor Edgar Santos Son of the Center for Environmental and Biological Agricultural Sciences – CCAAB of the Federal University of Recôncavo da Bahia – UFRB. The fragments were disinfested for indirect and direct isolation. The agent of sudden death in cloves was identified as *Cytospora eugeniae*, this being the first report of this pathogen causing sudden death in cloves in Brazil. The fungus *Chrysosporthe cubensis* was also found in constant association with sick and dead clove tree in the same localities. To prove the pathogenicity of these fungi, both were inoculated in fragments of the branches of healthy clove plants, which, fifteen days after inoculation, showed typical lesions while the controls remained without symptoms. Both pathogens were reisolated from inoculated stem fragments. *Cytospora eugeniae* was always associated with clove trees that showed symptoms or died of sudden death. Symptoms of sudden death consist of a very mild chlorosis, which is difficult to diagnose, followed by heavy leaf drop and sudden wilting of the remaining leaves, which turn a reddish-brown color while still on the tree. A characteristic symptom of the disease on the trunk is an intense yellow coloration, visible under the bark. *Chrysosporthe cubensis* was always associated with symptoms of regressive death of branches, a symptomatology also called a disease known as “dieback” or “acute dieback”, also found associated with the sudden death of young clove trees. This pathogen is a parasite that penetrates the host through wounds in clove trees of all ages, and can cause the sudden death of young trees. The fungus colonizes both wood and bark, where it causes a very distinct and characteristic reddish-brown discoloration of the parasitized tissues. Twenty-three fungi associated with cloves were identified in the Low South Bahia, of which 20 were morphologically identified under the microscope at the genus level and 5 at the species level. There are new records for *Syzygium aromaticum*: *Acremonium* sp. *Cytospora brevispora*, *Gliocladiopsis tenuis*, *Idriella*

sp., *Pestalotiopsis* sp., *Rhizopus* sp., *Septoria* sp., *Trichoderma* sp., *Trichoderma longibrachiatum*. These results will contribute to the management of clove tree diseases in Bahia, which threatens clove production and the employment of approximately 60,000 workers.

Keywords: Sudden death, Acute dieback, *Cytospora eugeniae*, *Chrysosporthe cubensis*, phytopathogen.

INTRODUÇÃO GERAL

O craveiro-da-índia (*Syzygium aromaticum* (L) Merr. & Perry), pertencente a família Myrtaceae, é originário do arquipélago das Ilhas Molucas, na Indonésia, uma planta de porte arbóreo com copa alongada e que pode atingir 12-15 metros de altura e o ciclo vegetativo chega a mais de 100 anos. O principal produto é a flor, produzida na parte externa da copa, e que deve ser colhida na fase de botão. Ainda subestimado pelas suas propriedades terapêuticas, hoje o cravo da índia tem sido usado popularmente na culinária, perfumaria e no tratamento de muitas doenças (AFONSO et al., 2012; ARAUJO et al., 1989).

Os principais países produtores de cravo da índia, segundo dados da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) 2017, são Indonésia (123.773t), Madagascar (19.677t), República Unida da Tanzânia (9.011t), Sri Lanka (7.292t), Comores (2.618t), Quênia (2.133t) e China (1.305t). Apesar de não aparecer nos dados da FAO, o Brasil possui uma produção de 1.688 toneladas, sendo que a totalidade da produção nacional provém do estado da Bahia, principalmente da região do Baixo Sul, destacando os municípios de Valença, Ituberá, Taperoá, Camamu, Igrapiúna e Nilo Peçanha. (IBGE, 2017).

O craveiro se adaptou muito bem à região do Baixo Sul da Bahia, por consequência de condições excelentes de solo e clima. A cultura é explorada comercialmente, principalmente no Baixo Sul até o município de Una, localizado na região do Sudeste da Bahia (OLIVEIRA et al., 2008). Em 2017, foram observados plantios com perdas de 10 a 90 % de árvores em plena produção em virtude da incidência de morte súbita e “dieback” (SILVA et al., 2020).

A doença de morte súbita é causada pelo fungo *Cytospora eugeniae* (Nutman & F.M. Roberts) G. C. Adams & Rossman (2015). Os sintomas consistem em forte queda de folhas verdes e repentina murcha das folhas restantes as quais adquirem uma cor marrom-avermelhada enquanto ainda estão na árvore. O sistema radicular apresenta degeneração das raízes mais finas, simultaneamente com o aparecimento dos sintomas na copa. Um sintoma característico da doença no tronco é uma coloração amarela intensa, visível abaixo da casca. Os sintomas

na copa (queda rápida ou demorada das folhas) variam, dependendo das condições de umidade que precedem a morte.

No Brasil, craveiros com sintomas de morte súbita foram detectados por Bezerra (1993). Porém, apesar de existir enfermidade com quadro sintomatológico semelhante, não existem relatos identificando este fungo como seu agente causal no Brasil (DALLA PRIA; CAMARGO, 1997).

O "dieback" ou morte dos ramos, é causado pelo fungo *Chrysosporthe cubensis* (Bruner) Gryzenh. & M.J. Wingf. (2004). É um parasita de feridas de craveiros de todas as idades, e muitas vezes causa a morte súbita de árvores jovens. É a principal causa de morte de ramos individuais e, eventualmente, de árvores inteiras, de todas as idades, e da chamada "morte súbita" de árvores jovens. O fungo coloniza tanto a madeira como na casca, onde provoca uma descoloração castanho-avermelhada muito distinta e característica. Externamente, surgem os sinais da doença e do patógeno pelos ascomas (peritécios) e picnidomas (picnídios) que se desenvolvem na casca pouco tempo após a infecção. A princípio são sempre picnídios; os peritécios são encontrados mais raramente e se desenvolvem posteriormente.

O craveiro-da-índia é cultivado no Baixo Sul da Bahia desde a década de 70, não havendo registros de que alguma dessas doenças limitasse o seu cultivo ou sua produção. No entanto, há cerca de dez anos surgiu a demanda dos produtores dessa região para solucionar o problema da morte de craveiros, que vem causando a diminuição da produção resultando em graves perdas econômicas.

As plantas de modo geral, são colonizadas por microrganismos epifíticos e endofíticos, em grande parte representados por fungos. No craveiro-da-índia (*S. aromaticum*) já foram registradas 45 espécies de fungos associados, incluindo espécies patogênicas e não patogênicas (FARR; ROSSMAN, 2019). No entanto, no Brasil, um país rico em biodiversidade, a microbiota presente no craveiro ainda não foi estudada.

O conhecimento dos aspectos biológicos dos patógenos, do hospedeiro e das condições edafo-climáticas é necessário para subsidiar a adoção de técnicas de manejo da doença e minimizar os impactos causados pelos patógenos na cultura (FALEIRO et al., 2004).

Diante do exposto, os objetivos desse trabalho foram: i) identificar os agentes etiológicos causadores da morte de craveiros (*S. aromaticum*) na Região do Baixo Sul da Bahia e ii) relatar os fungos associados a esta cultura, registrando novas ocorrências de fungos no craveiro-da-índia.

REFERENCIAL TEÓRICO

O CRAVO-DA-ÍNDIA (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry) E A CULTURA DO CRAVEIRO

Classificação e Descrição Botânica

A espécie *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry já foi descrita anteriormente como *Caryophyllus aromaticus* L., *Eugenia aromatica* (L.) Baill., *E. caryophyllata* Thunb. e *E. caryophyllus* (Spreng.) Bullock & Harrison (DUKE et al., 2003). A palavra cravo deriva do termo em latim *clavus*, que significa prego, devido o formato do botão floral (AFFONSO et al., 2012).

O craveiro é uma planta arbórea de grande porte, perene, tronco robusto, que pertence a ordem Myrtales, família Myrtaceae, e gênero *Syzygium*. Possui a copa cônica e alongada, medindo 12 – 15 metros de altura (Figura 1), o ciclo produtivo do craveiro chega a mais de 100 anos (AFFONSO et al., 2012; DUKE et al., 2003; ARAÚJO et al., 1989).

As folhas são duras, oblongas, pecioladas, aromáticas, com até 12 centímetros de comprimento. Possuem flores hermafroditas, pequenas, aromáticas, róseas ou avermelhadas, agrupadas em terminais de 20-25 flores, geralmente bifurcados em três pedúnculos. Os frutos são de drupa elipsoide com coloração vermelho-escuro, não são consumidos *in natura* por possuir sabor forte adstringente e ardência (MARTIN, 1991; AFFONSO et al., 2012).



Figura 1. *Syzygium aromaticum*. (A) Árvore. (B) Folhas. (C) Pedúnculo + botão floral. (D) Flores. (E) Frutos. (F) Botões florais secos (cravo).

Centro de Origem e Dispersão

O craveiro é originário do arquipélago das Ilhas Molucas, na Indonésia. Suas fortes propriedades aromáticas foram conhecidas pelos primeiros habitantes humanos dessas ilhas, sendo cultivada desde então, pois foi exportada para a China durante o período Han (220-206 a. C.). Como havia plantações naquela época, o comércio de exportação deve ter sido baseado também em usos culinários, medicinais ou religiosos, pois o produto de uma única árvore bastava para tirar o mau-hálito de grande número de cortesãos da época. Assim, a antiguidade da indústria do cravo é conhecida por ter mais de 2000 anos (NUTMAN; ROBERTS, 1971).

A primeira descrição do craveiro-da-índia e seu cultivo, data de 1506 por Ludovico di Varthema, segundo Nutman e Roberts (1971). Nessa época, uma das expedições de Vasco da Gama, chegando até a cidade de Calicute na Índia em 1497, logo depois o comércio de cravo se concentrou em na cidade de Lisboa – Portugal, onde era altamente lucrativo.

O comércio de cravo permaneceu um monopólio, ou quase monopólio, dos portugueses por cerca de um século até quando o império holandês em 1605, capturou o forte português em Amboina. Para preservar o monopólio que haviam conquistado, usaram métodos drásticos, comerciantes de outras nacionalidades foram capturados, presos, torturados e às vezes mortos. Os holandeses decretaram que o craveiro-da-índia deveria ser cultivado apenas na ilha de Amboina; que todos os cravos em outros lugares seriam destruídos; e que o cultivo de craveiros fora das áreas permitidas deveria ser punido com as mais severas penalidades. Esses regulamentos foram rigorosamente aplicados e aparentemente bem-sucedidos, pois o comércio de cravo permaneceu um monopólio holandês durante os séculos XVII e XVIII (NUTMAN; ROBERTS, 1971).

Esse valioso monopólio era cobiçado por outras nações. Os franceses enviaram uma expedição para a parte menos povoada das Molucas em 1770. Eles saíram um salto à frente dos holandeses com sementes e mudas, e destas foram abastecidas a maior parte das possessões francesas no Oceano Índico: as Ilhas Mascarenhas, as Seychelles, Madagascar, entre outras. O cultivo de cravo também foi tentado nas Índias Ocidentais (como era chamado o continente americano pelos

navegantes). Porém, em nenhuma dessas ilhas, a cultura do craveiro conseguiu se desenvolver comercialmente (NUTMAN; ROBERTS, 1971).

No início de 1800 os britânicos promoveram o plantio de árvores de cravo-da-Índia em outros lugares, como Madagascar, Brasil, Ilhas Maurício, Ternate, Tidore, Tanzânia e Zanzibar (DUKE et al., 2003).

Hoje, no Brasil o único pólo produtor de cravo-da-índia encontra-se no estado da Bahia, precisamente na região do Baixo Sul, destacando os municípios de Valença, Taperoá, Ituberá, Camamu e Igrapiúna (IBGE, 2017).

Cultivo do craveiro

É tipicamente encontrado em áreas de baixas altitudes, até 300m, os maiores centros produtores estão localizados entre as latitudes 20° ao Norte até 20° ao Sul, com clima tropical úmido e sem estação seca perceptível (ALMEIDA et al., 1990).

O craveiro-da-índia requer solos francos profundos, com bom teor de húmus e francos pretos de regiões florestais com boa drenagem. Os craveiros são multiplicados por sementes. Após a germinação das sementes, são transplantadas para sacos de polietileno (dimensão 25 cm x 15 cm) contendo mistura de terra, areia e esterco bem decomposto na proporção 3:3:1, podendo serem transplantadas novamente após 1 ano de crescimento para sacos maiores. As mudas estão prontas para serem transplantadas a campo com 18 a 24 meses de idade. Os espaçamentos mais utilizados entre plantas, dependendo da região, são 7 x 7m, 8 x 8m ou 10 x 10m, o que dá uma densidade de 200, 150 e 100 plantas/hectare, respectivamente (DUKE et al., 2003).

Desde o plantio até a primeira safra leva de 4 a 7 anos, com idade de safra a plena produção por volta dos 20 anos. Quando os botões ficam marrom avermelhados, eles estão prontos para a colheita. Os botões de flores são secos de quatro a cinco dias em pisos de cimento ou esteiras de secagem. Uma árvore produz em média de 5,5 kg de cravos secos por ano, mas rendimentos de 18 kg não são incomuns. Caules de cravo, folhas, frutas e botões florais são usados para destilar o óleo de cravo. Os cravos rendem de 14 a 21% de óleo essencial, rico em eugenol (DUKE et al., 2003; BRANDÃO et al., 1978; DANTHU et al., 2014).

Na região do Baixo Sul da Bahia, o cravo-da-índia é colhido geralmente entre os meses de outubro a fevereiro, quando a maioria das plantas apresenta o botão floral com o máximo de desenvolvimento. A colheita pode ser realizada de forma manual ou química.

No sistema de colheita manual, são utilizadas escadas e as inflorescências são colhidas para depois retirada do pedúnculo. Há dificuldades inerentes ao processo de colheita manual, como falta de mão-de-obra, custo elevado e riscos de acidentes pela utilização de escadas em terrenos acidentados, motivo pelo qual esse sistema caiu em desuso desde os anos de 1990. Nos dias atuais este método é empregado apenas em cultivos inferiores a 2 hectares (ARAÚJO et al., 1989; BRANDÃO et al., 1978).

A colheita química, consiste na utilização de Ethephon (ácido fosfônico 2-cloroetil), nome comercial Ethrel, que, aplicado em pulverização, na época da floração, causa abscisão dos botões florais (ARAÚJO et al., 1989), este é o principal sistema utilizado atualmente, mesmo ainda não tendo registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, para cultura do craveiro-da-índia. Segundo Araújo et al. 1989 o processo de colheita química do cravo-da-índia representou um grande avanço, permitindo a redução dos custos de produção, promovendo a expansão da cultura na região do Baixo Sul.

Importância Econômica

O principal produto do craveiro é a flor, produzida na parte externa da copa, e que deve ser colhida na fase de botão. Ainda subestimado pelas suas propriedades, hoje o cravo-da-índia tem sido usado popularmente na culinária, perfumaria (AFFONSO et al., 2012; ARAÚJO et al., 1989) e em tratamentos farmacológicos, tais como: antiviral, antiúlcera, antidiabético, antitumoral, anestésico, anti-inflamatório, entre outros (DUKE et al., 2003).

O óleo de cravo é usado na Europa desde o século XVI. É produzido essencialmente por destilação dos cravos, pedúnculos e folhas, de onde são obtidos os maiores rendimentos, respectivamente. O alto interesse no cravo-da-índia é por conta do seu teor de eugenol, que pode conter até 90%, dependendo do órgão destilado e modo de destilação (DANTHU et al., 2014).

Os principais constituintes do óleo essencial do cravo-da-índia (Tabela 1), são conhecidos por seus efeitos antibacterianos, fungicidas, antissépticos, antioxidantes, anestésicos e analgésicos, e também são amplamente utilizados em aromaterapia, farmácia, medicina humana, veterinária e odontologia (AFFONSO et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2008; OLIVEIRA et al. 2009; DUKE et al., 2003; MILIND; DEEPA, 2011). O cravo-da-índia é usado na Indonésia, maior produtor mundial, principalmente para confecção de cigarros perfumados (“kretek” ou “gudan”), que são muito difundidos na Indonésia e Brasil (DANTHU et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2007; AGRA et al., 2008).

Tabela 1. Teor de óleo essencial de *S. aromaticum* e seus principais componentes. Adaptado de Oliveira et al., 2009.

	Teor de óleo essencial (%)				
	FV	FSS	FSE	PED	BFS
<i>S. aromaticum</i>	2,3	6,6	5,6	9,4	15,4
	Componente do óleo essencial (%)				
eugenol	82,5	87,1	82,6	90,4	88,4
β -cariofileno	10,8	8,3	10,5	3,6	0,6
α -humuleno	1,4	1,1	1,6	0,6	-

FV: Folhas frescas, FSS: Folhas secas ao sol; FSE: Folhas secas em estufa, PED: Pedúnculos e BFS: Botões florais secos.

O cravo-da-índia é uma das especiarias mais importantes comercializada no mundo, a produção mundial em 2020 foi de 183 mil toneladas, com área colhida de 652 mil hectares (FAO, 2020). A Indonésia é líder na produção mundial de cravo-da-índia, com 68%, seguida de Madagascar, com 15% e Tanzânia, com 5%. Na sequência vem, Sri Lanka, Comores, Quênia, Brasil, China, Malásia e Granada (Figura 2) (FAO, 2017; IBGE, 2017).

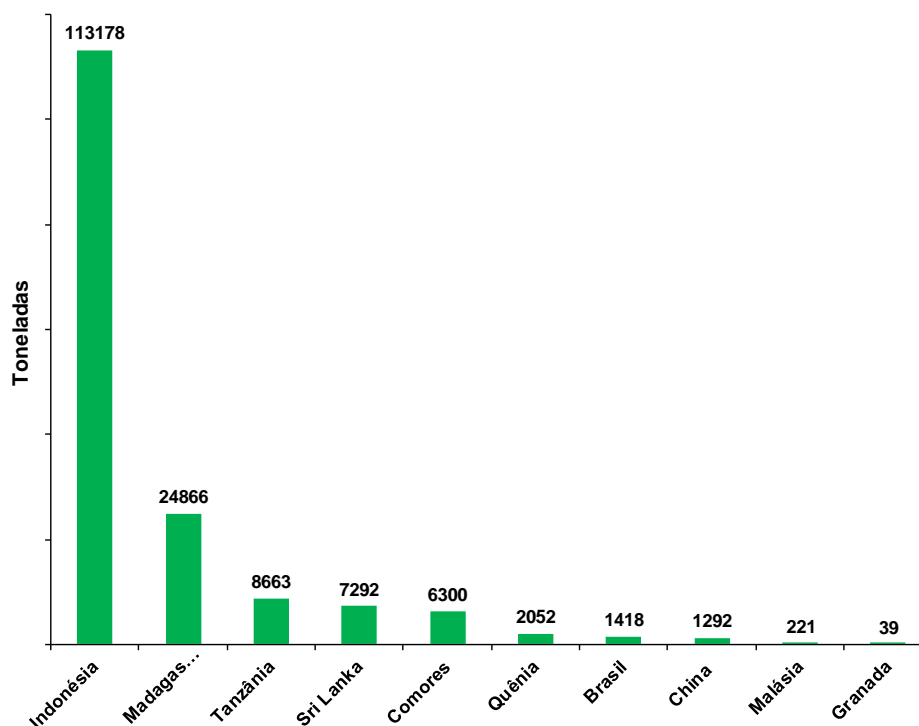


Figura 2. Principais países produtores (FAO, 2017; IBGE, 2017).

No Brasil o craveiro se adaptou bem na região do Baixo Sul da Bahia, por consequência de condições excelentes de solo e clima, a cultura vem sendo explorada comercialmente (OLIVEIRA et al., 2008). O levantamento do censo agropecuário do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE de 2017 mostrou que o Brasil produziu 1.418 toneladas de cravo, com área colhida de 4.944 hectares, equivalente a R\$ 25,5 milhões o valor da produção, considerando a cotação de R\$ 18,00 por quilo do cravo seco nesse período (SEAGRI, 2017). Esse mesmo levantamento evidenciou que a totalidade da produção nacional é produzida no estado da Bahia, mais especificamente na região do Baixo Sul. O município de Valença é o líder na produção nacional, com 39,8%, seguido por Taperoá, com 13,2% e Ituberá com 10,4%. Na sequência vem os municípios de Camamu, Presidente Tancredo Neves e Igrapiúna (Figura 3) (IBGE, 2017).

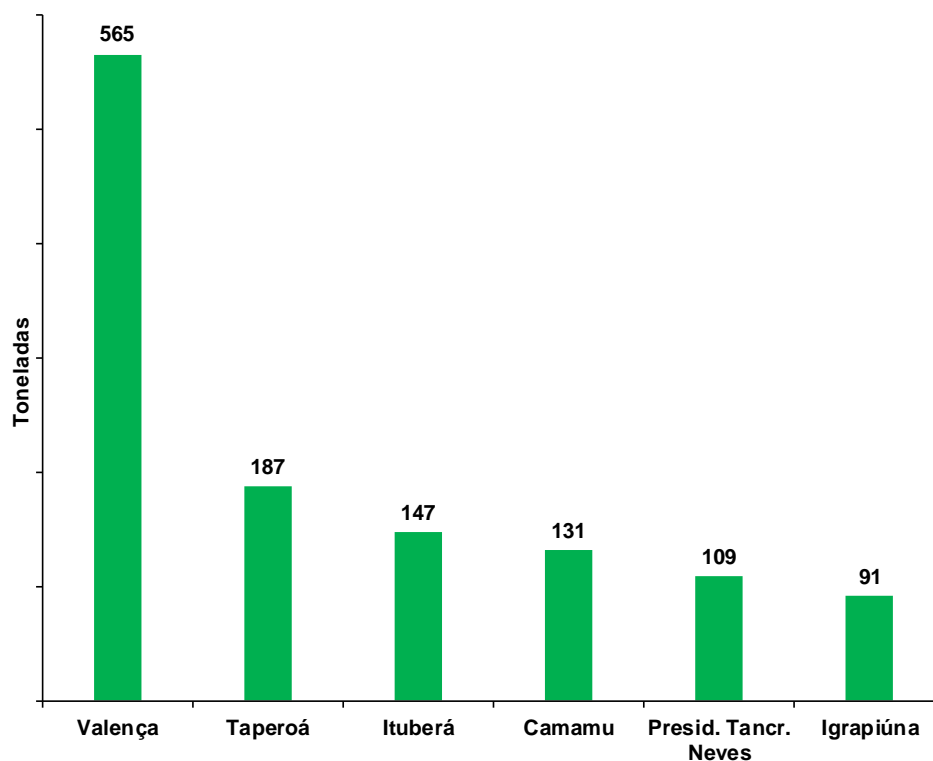


Figura 3. Principais municípios produtores de cravo-da-índia no Brasil e suas respectivas produções. (IBGE, 2017).

Segundo relatos de produtores, o auge da produção de cravo-da-índia ocorreu entre as décadas de 80 e 90, tendo os municípios do Baixo Sul produzido cerca de 12.000 toneladas. Em 2009, a produção foi em torno de 6.000 toneladas (VITASPICE, 2009). Na safra de 2014, a região produziu 4.000 toneladas em 8.000 hectares colhidos (BAHIA-RURAL, 2014). Com base nos dados do IBGE de 2017, a produção caiu para 1.418 toneladas. Um dos principais fatores responsáveis pela queda na produção foi o aumento da mortalidade de craveiros por problemas fitossanitários. Foram observados plantios com perdas de 10 a 90 % de árvores em plena produção em virtude da incidência de Morte Súbita, na região do Baixo Sul – Bahia (SILVA et al., 2020).

O cultivo do craveiro-da-índia na região do Baixo Sul, é praticado principalmente por pequenos produtores da agricultura familiar, sendo, para a maioria dos quais a fonte principal de geração de renda anual da família. No entanto, o fator fitossanidade se tornou muito importante, pois ameaça a produção de cravo e o emprego de aproximadamente 60 mil trabalhadores, que lidam direta ou indiretamente com a cultura do craveiro.

Doenças do Craveiro-da-Índia

A ilha de Pemba, que faz parte do Arquipélago de Zanzibar, ao largo da costa da Tanzânia, no Oceano Índico, localizada a cerca de 50 km a norte da ilha de Unguja e a cerca de 50 km da costa do continente Africano (WIKIPÉDIA, 2022), vastas extensões de terras estavam cobertas de densas florestas de craveiros. Por volta de 1895, porém, ocorreu uma mudança, quando uma patologia do cravo-da-índia se tornou importante. Mortes ocasionais de árvores, aparentemente em pleno vigor e sem causa óbvia, foram registradas por alguns anos. A atitude naquela época, era atribuir as baixas a uma série de causas não patogênicas (NUTMAN; ROBERTS, 1971).

Nutman e Roberts (1953a) publicaram um relato das várias tentativas de elucidar a morte dos craveiros, entre 1895 e o fim da Segunda Guerra Mundial, quando foram feitas investigações sobre a doença. Nessa época relataram que desde 1907, McCellan, formado em silvicultura e Diretor de Agricultura (Pemba), sugeriu que a morte súbita tinha muitas semelhanças com uma doença, causada por um fungo que atacava o sistema radicular das árvores. Fungo este, que foi identificado posteriormente por Nutman e Roberts (1953b) como *Valsa eugeniae*.

Morte súbita

A morte súbita, principal doença que ataca craveiros, foi relatada pela primeira vez por Nutman e Roberts (1953b), devastando plantações de craveiro-da-índia no Arquipélago de Zanzibar na Tanzânia. O agente causal foi identificado por esses autores como *Valsa eugeniae* Nutman & Roberts, o qual foi renomeado *Cytospora eugeniae* (Nutman & F.M. Roberts) G. C. Adams & Rossman (2015).

As raízes absorventes morrem em um estágio comparativamente inicial da doença, e o fungo pode então ser isolado das partes distais do sistema radicular. O fungo pode ser encontrado no colo uma semana ou mais após a morte e depois se espalha rapidamente por toda a árvore, produzindo uma cor amarela intensa nos tecidos invadidos. Extensas pesquisas realizadas por Nutman e Roberts (1953c) não mostraram nenhum caso de morte súbita onde *Cytospora eugeniae* (= *Valsa eugeniae*) estivesse ausente, e nunca foi encontrado, na ocasião, em árvores que foram mortas por outros agentes, como incêndio, seca ou “dieback”. Além disso, no período de estudos, entre 1949 e 1954, não foi encontrado por estes autores

nenhum outro fungo consistentemente associado à morte súbita, que não fosse *C. eugeniae*.

Dieback agudo

Nutman e Roberts (1953b), também relataram *Cryptosporella eugeniae* Nutman & Roberts, renomeado posteriormente como *Chrysosporthe cubensis* (Bruner) Gryzenh. & M.J. Wingf. (2004), como um patógeno grave, que penetra principalmente por feridas em craveiros de todas as idades, e que ocasionalmente causa a morte súbita.

A Morte dos Ponteiros ou Dieback agudo (“Acute Dieback”), é causada principalmente por *Chrysosporthe cubensis*. No entanto, *Cytospora eugeniae* também causa Dieback, com desenvolvimento da doença mais lento, sendo menos comum sua ocorrência em relação àquela causada por *Chrysosporthe cubensis* (NUTMAN; ROBERTS, 1954).

Outras doenças

A **Podridão Vermelha** da Raiz, considerada o maior problema fitopatológico da cultura no estado da Bahia, não teve o agente etiológico descoberto por anos, até que Oliveira (1992) sugeriu que o fungo *Ganoderma philippii* (Bress & Henn. ex Sacc.) Bres. era o agente causal da doença.

Podridão Negra foi descrita no Brasil por Oliveira et al. em 2008. Causada pelo fungo *Rosellinia pepo*, os sintomas são murcha, amarelecimento e seca das folhas, na região do colo da planta, sob a casca, há rizomorfias esbranquiçadas, típicos do fungo *R. pepo*.

Mal de Sumatra é uma doença ainda não relatada no Brasil, ocorrendo nas ilhas de Sumatra e Java, na Indonésia. Caracterizada como uma doença de planta adulta com mais de 2 m de altura. Os sintomas são amarelecimento e queda das folhas, começando pelas mais velas. Pode ocorrer morte de galhos, começando nos galhos superiores e frequentemente associados ao murchamento, levam à morte da árvore em 6 a 18 meses. São observadas estrias marrom-acinzentadas nos vasos do xilema, assim como o pus bacteriano após corte do tecido doente (DALLA PRIA; CAMARGO, 2016; BENNET; HUNT; ASMAN, 1985)

A **Mancha de Phyllosticta**, causada por *Phyllosticta* sp., é uma doença que ainda não foi registrada no Brasil, no entanto, segundo Dalla Pria e Camargo (2016), sua ocorrência é provável, sendo um fungo que pode ser encontrado em vários hospedeiros no Brasil. Os sintomas nas árvores são manchas intumescidas nas folhas, eventualmente resultando em queda das mesmas.

A **Murcha-de-mudas** (*Seedling Wilt*) é um sério problema em muitos viveiros. As folhas de mudas afetadas perdem seu brilho natural, inclinam e finalmente morrem. O sistema radicular e a região da coroa da muda, mostram variações de descoloração e apodrecimento. *Cylindrocladium* sp., *Fusarium* sp. e *Rhizoctonia* sp., são organismos comumente associados à essa doença (ANANDARAJ et al., 2005).

Existem outros patógenos que causam doenças no craveiro, como *Calonectria quinqueseptata* Figueiredo & Namek., *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) S. Hughes, *Colletotrichum capsici* (Syd. & P. Syd.) E.J. Butler & Bisby, que causam manchas foliares (OLIVEIRA et al., 2008).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFFONSO, R.S.; RENNÓ, M.N.; SLANA, G.B.C.A.; FRANÇA, T.C.C. Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. **Revista Virtual Química**. Vol. 4, No. 2, 146-161p. 2012.

AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18(3): 472-508, Jul./Set., 2008.

ALMEIDA, H. A.; LIMA, A. A.; FRANCO, M. A. G.; RAMOS, J. V. **Potencial climático para o cultivo do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L. Merr. & Perry) no Sudeste da Bahia**. In: VI Congresso Brasileiro de Meteorologia, Salvador: SBMET, v. I. p. 125-129. 1990.

ANANDRAJ, M.; DEVASAHAYAM, S.; ZACHARIAH, J.T.; KRISHNAMOORTHY, B.; MATHEW, P.A.; REMA, J. Nutmeg (Extension pamphlet). IISR (Indian Institute of Spice Research) Kozhikode. January 2005. 4p.

ARAÚJO, A.C.; SACRAMENTO, C.K.; SILVA, P.H. **Avaliação econômica da colheita do cravo-da-índia na região Sudeste da Bahia**. CEPEC/CEPLAC. Boletim Técnico nº164. Bahia, Brasil, 1989.

ARX, J.A; MÜLLER, E. Die Gattungen der amersporen Pyrenomyceten. **Beiträge zur Kryptogamenflora der Schweiz, Wabern- Bern**, v.11, n.1, p.1–434. 1954.

BAHIA RURAL. Saiba como é feito o cultivo do cravo-da-índia no baixo sul baiano. Globoplay, 2014. Disponível em:
<<https://globoplay.globo.com/v/3120075/?s=0s>> Acessado em: 14/09/2021

BENNET, C. P. A.; HUNT, P.; ASMAN, A. Association of a xylem-limited bacterium with Sumatra disease of cloves in Indonesia. **Plant Pathology** **34**: 487-494, 1985.

BEZERRA, J. L. Primeiro registro de *Valsa eugeniae* causando morte de craveiro-da-índia na Bahia. **Fitopatologia Brasileira** **18:487**, 1993.

BRANDÃO, A. L.; TAFANI, R. R.; LIMA L. P. **Estimativas dos custos de produção de cravo-da-índia, na região cacaeira da Bahia.** CEPEC/CEPLAC, Boletim Técnico nº61, p 03-15. Bahia, Brasil, 1978.

BROWER, J.E.; ZAR, J.H.; VON ENDE, C.A. **Field and laboratory methods for general ecology.** 4 ed. Boston: WCB McGraw-Hill, p.273, 1998.

CERQUEIRA, K.S. **Fungos Endofíticos e não Endofíticos em Plantas Ornamentais Tropicais na Região sul da Bahia.** 2011. 119p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilheus-Bahia, 2011.

DALLA PRIA, M.; CAMARGO, L.E.A. Doenças do Craveiro-da-Índia. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia - Doenças das Plantas Cultivadas.** Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016, v.2. 772 pp.

DANTHU, P.; PENOT, E.; RANOARISON, K. M.; RAKOTONDRAVELO, J. C.; MICHEL-DOUNIAS, I.; TIOLLIER, M.; MICHELS, T.; NORMAND, F.; RAZAFIMAMONJISON, G.; FAWBUSH, F.; JAHIEL, M. The clove tree of Madagascar: a success story with an unpredictable future. **Bois et Forêts des Tropiques.** N° 320 (2), 2014.

DUKE, J. A.; BOGENSCHUTZ-GODWIN, M. J.; DUCCELLIER, J; **Handbook of medicinal spice.** CRC Press, 2003.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BELLON, G.; BORGES, T.A.; ANJOS, J. R. N.; PEIXOTO, J. R.; BRAGA, M. F.; SANTOS, D. G. Diversidade genética de espécies silvestres de maracujazeiro com resistência múltipla a doenças com base em marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira,** Brasília, v. 29, p. 325, 2004.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2017. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>> Acessado em: 13/09/2022.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2020. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>> Acessado em: 09/09/2022.

FARR, D.F.; ROSSMAN, A.Y. FUNGAL DATABASES, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Disponível em: <<https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/Retrieved>> Acessado em: 14/12/2019.

GRYZENHOUT, M.; MYBURG, H.; VAN DER MERWE, N. A.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Chrysoporthe, a new genus to accommodate Cryphonectria cubensis. **Studies in Mycology**. 50(1):119-142, 2004.

HUMBER, R.A. Entomophthoromycota: a new phylum and reclassification for entomophthoroid fungi. **Mycotaxon**. 120: 477-492. 2012.

IBGE. Produção Agrícola Municipal. **Área colhida e área plantada da lavoura permanente**. 2017. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/6616#resultado>> Acessado em: 21 de maio de 2019.

MARTIN, P.J. The Zanzibar clove industry. **Economic Botany**, 45: 450–459, 1991.

MILIND, P.; DEEPA, K. Clove: a champion spice. **International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy**, 2 (1): 47-54, 2011.

MULLER-DOMBOIS, D. Ecological measurements and microbial populations. In: WICKLOW, D. T.; CARROLL, G. C. (eds.). **The fungal community: Its organization and role in the ecosystem**. New York: Marcel Dekker, p. 173-184, 1981.

NUTMAN, F. J.; ROBERTS, F. M. Investigations into diseases of the clove tree in Zanzibar. **East African Agricultural Journal**, 18:4: 146-154, 1953a.

NUTMAN, F. J.; ROBERTS, F. M. Sudden-death disease of the clove tree. **Nature, Lond.**, 171, p128, 1953c.

NUTMAN, F. J.; ROBERTS F. M. The Clove Industry and the Diseases of the Clove Tree, **PANS - Pest Articles & News Summaries**, 17:2, 147-165, 1971.

NUTMAN, F. J.; ROBERTS, F. M. Two New Species of Fungi on Clove Trees in the Zanzibar Protectorate. **Transactions British Mycological Society**. **36:29**, 1953b.

NUTMAN, F. J.; ROBERTS, F. M. *Valsa eugeniae* in Relation to the Sudden-Death Disease of the Clove Tree (*Eugenia aromatica*). **Ann. Appl. Biol.** **41 (1)**, 23-44. 1954.

OLIVEIRA, F. Q.; GOBIRA, B.; GUIMARÃES, C.; BATISTA, J.; BARRETO, M.; SOUZA, M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 17(3): 466-476, Jul./Set. 2007.

OLIVEIRA, M. L.; MELO, G.L.; NIELLA, A.R.R.; SILVA, V.R. Black root rot caused by *Rosellinea pepo*, a new disease of the clove tree in Brasil. **Tropical Plant Pathology**, Vol. 33, 2, 90-95 p, 2008.

OLIVEIRA M. L. *Ganoderma philippii* causando podridão vermelha na raiz do craveiro-da-índia. **Agrotrópica** 4:27-32, 1992.

OLIVEIRA, R. A.; REIS, T. V.; SACRAMENTO, C. K.; DUARTE, L. P.; OLIVEIRA, F. F. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 19(3): 771-775, Jul./Set. 2009.

ROSSMAN, A. Y.; ADAMS, G. C.; CANNON, P. F.; CASTLEBURY, L. A.; CROUS, P. W.; GRYZENHOUT, M.; JAKLITSCH, W. M.; MEJIA, L. C.; STOYKOV, D.; UDAYANGA, D.; VOGLMAYR, H.; WALKER, D. M. Recommendations of generic names in Diaporthales competing for protection or use. **IMA Fungus** 6:145. 2015.

SANTOS, C. D. **Fungos e oomiceto associados a espécies nativas e cultivadas de orquídeas no sul da Bahia**. 2012. 74p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus – Bahia, 2012.

SEAGRI – Secretaria da Agricultura, Pecuária, Irrigação, Pesca e Aquicultura. **Agronegócio – Cotação Agrícola – 2017**. Disponível em: <http://www.seagri.ba.gov.br/cotacao?produto=511&praca=286416&tipo=368&data_inicio=01%2F09%2F2017&data_final=13%2F09%2F2017> Acessado em: 13/09/2022.

SEIFERT, K. A. et al. **The Genera of Hyphomycetes**. (CBS Biodiversity Series no. 9). utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2011.

SILVA, J. S.; BEZERRA, J. L.; BRAGANÇA, C. A. D.; VILELA, R. J. O.; COSTA, A. Z. M.; NIELLA, G. R.; MARTINS, C. Y. S. First Report of Sudden Death of Clove Trees Caused by *Cytospora eugeniae* in Brazil. **Plant Disease**, v. **104**, p. PDIS-10-19-2126-1868, 2020.

SILVA, J.S.; COIMBRA, J.L.; TAVARES, D.G.; AFONSO, G.O. Inibição *in vitro* do crescimento micelial do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* utilizando solados de actinomicetos obtidos da rizosfera de plantas nativas do cerrado baiano. **Natureza online**, v. 11 (1): 15-19, 2013.

SILVEIRA NETO, N. S, NAKANO, O. BARBIN, D; VILLA NOVA, N. A. **Manual de Ecologia dos Insetos**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, p.419, 1976.

THOMAZINI, M. J.; A. P. B. W. THOMAZINI. Diversidade de abelhas (Hymenoptera: Apoidea) em inflorescências de *Piper hispidinervum* (C.D.C.). **Neotropical entomology**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 27-34, 2002.

VITASPICE – Comércio e Exportação de Especiarias, Cacau e Café. **Produtos – Cravo-da-índia**. Valença, Bahia, Brasil, 2009. Disponível em: <<http://www.vitaspice.com.br/bra/cravodaindia.asp>> Acessado em: 14/09/2022.

WIKIPÉDIA. Pemba (Tanzânia). Disponível em: <[https://pt.wikipedia.org/wiki/Pemba_\(Tanz%C3%A2nia\)](https://pt.wikipedia.org/wiki/Pemba_(Tanz%C3%A2nia))> Acessado em: 14/09/2022.

CAPÍTULO 1

Cytospora eugeniae E *Chrysosporthe cubensis* **ASSOCIADOS A MORTE DE CRAVEIRO-DA-ÍNDIA (*Syzygium aromaticum*) NA BAHIA, BRASIL¹**

¹Artigo a ser ajustado para submissão ao Comitê Editorial de periódico científico.

***Cytospora eugeniae* e *Chrysosporthe cubensis* associados a morte de Craveiro-da-Índia (*Syzygium aromaticum*) na Bahia, Brasil**

Julielton Santos da Silva¹, José Luiz Bezerra¹, Carlos Augusto Dórea Bragança¹

¹Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, R. Rui Barbosa, 710 – 44380-000 – Cruz das Almas, BA – Brazil.

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi identificar os agentes etiológicos causadores da morte de craveiros (*Syzygium aromaticum*) na Região do Baixo Sul da Bahia, Brasil. Para isso, foram realizadas coletas em duas propriedades de cinco municípios nos anos de 2017 a 2019. Foram identificados *Cytospora eugeniae* e *Chrysosporthe cubensis* em constante associação à craveiros doentes e mortos no Baixo Sul da Bahia. Para comprovar a patogenicidade foram realizados testes com fragmentos do caule de plantas sadias, nos quais, quinze dias após a inoculação, todos os isolados de *C. eugeniae* e *C. cubensis* produziram lesões, enquanto que os controles permaneceram sem sintomas. Os patógenos foram reisolados dos fragmentos de caule inoculados. *Cytospora eugeniae* foi associado sempre com craveiros que apresentavam sintomas ou morreram da doença de morte súbita, algumas vezes causando morte de galhos. Os sintomas de morte súbita consistem em uma clorose muito leve, difícil de ser diagnosticada seguida por forte queda de folhas e repentina murcha das folhas restantes, as quais adquirem uma cor marrom-avermelhada enquanto ainda estão na árvore. O sistema radicular apresenta degeneração das raízes mais finas, simultaneamente com o aparecimento dos sintomas na copa. Um sintoma característico da doença no tronco é uma coloração amarela intensa, visível abaixo da casca. *Chrysosporthe cubensis* ocorreu sempre associado com sintomas de morte de galhos ou parte da planta, doença conhecida como “Dieback” ou “Dieback Agudo”, encontrado também associado à morte súbita de craveiros jovens. É um parasita de ferimentos graves de craveiros de todas as idades, e pode causar a morte súbita de árvores jovens. O fungo ramifica-se tanto na madeira como na casca, onde provoca uma descoloração castanho-avermelhada muito distinta e característica. Externamente sua presença pode ser detectada pelas frutificações que se desenvolvem na casca pouco tempo após a infecção, principalmente na base do tronco, bem próximo ao solo. Estes resultados contribuirão para o manejo de doenças do cravo-da-índia na Bahia, que ameaça a produção de cravo e o emprego de aproximadamente 60 mil trabalhadores.

Palavras chaves: Parasita de feridas, Dieback, Etiologia, Sintomatologia.

***Cytospora eugeniae* and *Chrysosporthe cubensis* associated with the death of Cloves (*Syzygium aromaticum*) in Bahia, Brazil**

Julielton Santos da Silva¹, José Luiz Bezerra¹, Carlos Augusto Dórea Bragança¹

¹Federal University of Recôncavo da Bahia – Center for Agricultural, Environmental and Biological Sciences, R. Rui Barbosa, 710 – 44380-000 – Cruz das Almas, BA – Brazil.

ABSTRACT

The objective of this work was to identify the etiological agents that cause the death of carnations (*Syzygium aromaticum*) in the Baixo Sul region of Bahia, Brazil. For this, collections were carried out in two properties of five municipalities in the years 2017 to 2019. *Cytospora eugeniae* and *Chrysosporthe cubensis* were identified in constant association with sick and dead clove tree in the Southern Bahia Lowlands. To prove the pathogenicity, tests were performed with stem fragments of healthy plants. Which, fifteen days after inoculation, all isolates of *C. eugeniae* and *C. cubensis* produced lesions in the inoculated fragments, while the controls remained without symptoms. The pathogens were reisolated from the inoculated stem fragments. *Cytospora eugeniae* has always been associated with carnations that showed symptoms or died of sudden death disease, sometimes causing twig death. Symptoms of sudden death consist of a very mild, difficult to diagnose chlorosis followed by heavy leaf drop and sudden wilting of the remaining leaves, which turn a reddish-brown color while still on the tree. The root system shows degeneration of the finer roots, simultaneously with the appearance of symptoms in the tree top. A characteristic symptom of the disease on the trunk is an intense yellow color, visible below the bark. *Chrysosporthe cubensis* has always been associated with symptoms of death of branches or part of the plant, a disease known as “Dieback” or Acute “Dieback”, also found associated with the sudden death of young clove tree. It is a parasite of severe wounds of clove trees of all ages, and can cause sudden death of young trees. The fungus branches out both on the wood and on the bark, where it causes a very distinctive and characteristic reddish-brown discoloration. Externally, its presence can be detected by the fructifications that develop on the bark shortly after infection, especially at the base of the trunk, very close to the ground. These results will contribute to the management of clove disease in Bahia, which threatens clove production and the employment of approximately 60,000 workers.

Keywords: Wound parasite, Dieback, Etiology, Symptomatology.

INTRODUÇÃO

O craveiro-da-índia (*Syzygium aromaticum* (L) Merr. & Perry), pertencente à família Myrtaceae, é originário do arquipélago das Ilhas Molucas, na Indonésia, uma planta de porte arbóreo com copa alongada e que pode atingir 12-15 metros de altura e o ciclo vegetativo chega a mais de 100 anos. O principal produto é a flor, produzida na parte externa da copa, e que deve ser colhida na fase de botão. Ainda subestimado pelas suas propriedades terapêuticas, hoje o cravo da Índia tem sido usado popularmente na culinária, perfumaria e no tratamento de muitas doenças (AFFONSO et al., 2012; ARAÚJO et al., 1989).

Os principais países produtores de cravo da Índia, segundo dados da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) 2020, são Indonésia (133.604t), Madagascar (23.931t), República Unida da Tanzânia (8.602t), Comores (6.799t), Sri Lanka (6.711t), Quênia (2.057t) e China (1.294t). O Brasil produziu 1.418 toneladas pelos dados do censo agropecuário de 2017, sendo que a totalidade da produção nacional é do estado da Bahia, principalmente na região do Baixo Sul, destacando os municípios de Valença, Ituberá, Taperoá, Camamu, Igrapiúna e Nilo Peçanha (IBGE, 2017).

O craveiro se adaptou muito bem à região do Baixo Sul da Bahia, por condições ideais de solo e clima, sendo explorado comercialmente, principalmente no Baixo Sul até o município de Una, localizado na região do Sudeste da Bahia (OLIVEIRA et al., 2008).

Alguns patógenos já foram encontrados causando doenças em craveiros na região do Baixo Sul da Bahia. No entanto, não eram considerados problema à época, tendo em vista que as perdas chegavam apenas 1%, como por exemplo a podridão vermelha da raiz causada por *Ganoderma philippii* (Bres. & Henn. ex Sacc.) Bres. que era tido como principal problema fitossanitário da cultura no estado da Bahia (DALLA PRIA; CAMARGO, 1997).

O craveiro-da-índia é cultivado no Baixo Sul da Bahia desde a década de 70, até então, não se tinha registros de que alguma doença limitasse o seu cultivo ou produção. No entanto, em 2017, foram observados plantios com perdas de 10 a 90 % de árvores em plena produção em virtude da incidência de morte súbita e

“dieback” (SILVA et al., 2020), surgindo a demanda de produtores dessa região para solucionar o problema da morte de craveiros, pois já estavam sentindo a diminuição da produção, acarretando perdas econômicas.

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi identificar os agentes etiológicos da morte de craveiros (*Syzygium aromaticum*) na Região do Baixo Sul da Bahia, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de Coleta

As coletas foram realizadas no período de novembro de 2017 a setembro de 2019, em cinco municípios (Tabela 1), importantes produtores de cravo-da-índia na região do Baixo Sul da Bahia. Em cada município foram selecionadas duas propriedades (Tabela 1), onde foram coletadas, no inverno e no verão, amostras de raízes, caule/casca e ramos de cinco plantas vivas ou mortas com sintomas e sinais de doença, sendo feitas também observações sobre os sintomas da doença, uma vez que algumas plantas apresentavam diferentes tipos de sintomas e sinais do patógeno.

Tabela 1. Dados das áreas nas propriedades onde foram realizadas as coletas por município da Bahia, nos anos de 2017 a 2019.

	Valença	Taperoá	Ituberá	Camamu	P. Tancredo Neves
Área 1					
Área total	25 ha.	50,00 ha.	24,5 ha.	189,50 ha.	2,5 ha.
Área com craveiros	20,0 ha.	7,5 ha.	4,0 ha.	4,0 ha.	1,5 ha.
Produção	18 t.	5 t.	3,5 t.	2,8 t.	0,5t.
Localização	13°21'24.56"S 39° 8'24.69"O	13°32'23.34"S 39° 6'29.77"O	13°45'30.75"S 39°10'36.10"O	13°58'20.82"S 39° 8'19.93"O	13°28'46.10"S 39°26'55.92"O
Área 2					
Área total	100 ha.	15,50 ha.	18 ha.	166,95 ha.	3,0 ha.
Área com craveiros	20,0 ha.	10,0 ha.	12,0 ha.	3,5 ha.	2,0ha.
Produção	15 t.	10 t.	10 t.	2,5 t.	1,3 t.
Localização	13°19'36.76"S 39°15'56.19"O	13°30'3.44"S 39° 5'45.59"O	13°45'25.47"S 39°11'0.44"O	13°52'17.84"S 39° 8'18.13"O	13°28'1.90"S 39°26'16.36"O

Isolamento

As amostras foram levadas para a Clínica Fitossanitária Professor Edgar Santos Filho do Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas – CCAAB da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, onde foram lavadas com sabão neutro em água corrente e em seguida foram cortadas em fragmentos de 5 milímetros. Os fragmentos foram desinfestados, para isolamento indireto, em álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio a 2% por 1 minuto, lavados por 3 vezes em água destilada e esterilizada (ADE) e transferidos para placas de Petri com meio de batata-dextrose-ágar (BDA). Para o isolamento direto, após a desinfestação prévia, as amostras que continham os sinais da doença, foram mantidas em

câmaras úmidas, provocando a exsudação da massa de esporo das estruturas de reprodução dos fungos. Com auxílio de um estéreo-microscópio (Zeiss® Stemi 2000-C) e agulha, a massa de esporos exsudada foi transferida para placa de Petri contendo meio BDA. As placas foram colocadas em incubadora do tipo BOD a temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Após o crescimento inicial, as colônias foram purificadas e identificadas quanto à espécie.

Identificação

Após a incubação e purificação das colônias, o material foi observado em estéreo-microscópio. As estruturas fúngicas foram retiradas com uma agulha fina e colocadas em lâminas e lamínulas com meio de montagem temporários (lactofenol azul de algodão e KOH 3%). Lâminas permanentes foram montadas com resina PVLG (Polivinil-Lacto-Glicerol) para a caracterização morfológica. A caracterização morfológica foi procedida através das características macroscópicas das colônias e microscópicas das estruturas reprodutivas. As fotomicrografias foram obtidas em estéreo-microscópio Zeiss® Stemi 2000-C, acoplado a câmera Zeiss® AxioCam MRc5 e Microscópio óptico Zeiss® Axio Imager 2 Pol. acoplado a câmera Zeiss® AxioCam MRc5. Com as chaves taxonômicas existentes na literatura especializada foram feitas as identificações em nível de gênero, enquanto que as espécies foram identificadas comparando-se as descrições mais específicas.

Extração de DNA

A biomassa dos fungos foi obtida a partir de culturas em BDA mantidas a 28 °C por até sete dias em placas de Petri. Com uma alça de platina, todo o micélio foi retirado e transferido para microtubos de 2 mL com tampa de rosca, acrescidos de 0,5g de contas de vidro (glass beads) com dois diâmetros diferentes na proporção de 1:1 (acid-washed, 150-212 µm and 425-600 µm; Sigma, U.S. sieve). Foi realizada a extração do DNA genômico seguindo a metodologia proposta por Oliveira et al. (2016), que inclui homogeneização do material em tampão CTAB 2%, trituração por agitação em alta velocidade através de um FastPrep, uma lavagem com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), além de precipitação em isopropanol, lavagem em etanol 70% e ressuspensão em 50 µL de água ultrapura.

Amplificação, Purificação e Sequenciamento do DNA

Para amplificação das regiões ITS do rDNA, foram utilizados os primers ITS1 e ITS4 (WHITE et al.1990). A PCR (Polymerase Chain Reaction) foi realizada com um volume final de 50 µL, os parâmetros para amplificação e as concentrações dos reagentes incluem os dNTPs, a Taq DNA polimerase, os iniciadores, água ultrapura e o tampão de reação (OLIVEIRA et al., 2014). Controles negativos, contendo todos os componentes exceto DNA, foram utilizados em cada procedimento para detectar possíveis contaminações.

Todos os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, as amostras foram coradas pela adição de GelRed®. Os produtos de PCR oriundos dos fungos endofíticos foram purificados utilizando-se a enzima ExoSAP® de acordo com as recomendações do fabricante. Posteriormente, as amostras foram enviadas para a Plataforma Multiusuária de Sequenciamento de DNA do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

Análises filogenéticas

Para a análise filogenética, as sequências obtidas foram preliminarmente comparadas com sequências similares depositadas no GenBank, utilizando a ferramenta BLASTn, posteriormente foram alinhadas e editadas no MEGA v.7 (Kumar et al., 2016). A análise de Máxima Verossimilhança (1.000 bootstraps) foi realizada com PhyML (GUINDON; GASCUEL 2003), executados a partir do programa Topali 2.5 (MILNE et al. 2004).

Teste de Patogenicidade

Os testes foram conduzidos em casa de vegetação em vasos com mudas de craveiros cultivadas por 180 dias. Os fungos foram cultivados em placas de Petri contendo meio de batata-dextrose-ágar (BDA) e incubados durante 8 dias a 25°C de temperatura. As mudas foram inoculadas com discos de 5 mm de diâmetro provenientes da cultura dos fungos. Com auxílio de perfurador foi retirado 5 mm da casca no caule a três centímetros do solo, em seguida foi depositado disco com micélio e estruturas do fungo. O local da inoculação na planta foi coberto com algodão umedecido e filme plástico (Figura 01). Foram feitas observações diárias nas plantas inoculadas para verificar o aparecimento de sintomas.



Figura 01. Inoculação das mudas em casa de vegetação. (A e C) Inoculação com discos contendo micélio e estruturas do fungo; (B) detalhe do ponto da inoculação coberto com algodão umedecido e filme plástico.

Em laboratório, foram realizados testes de patogenicidade com segmentos de caule destacados de plantas saudáveis (20 cm comprimento, 2 – 4 cm diâmetro) de cravo-da-índia comum. As extremidades cortadas foram seladas com parafina derretida para evitar a dessecação, e os segmentos foram esterilizados com hipoclorito de sódio a 10% por 5 min e enxaguados com água destilada estéril. Uma alíquota de 20 μL de uma suspensão (10^6 esporos/mL) foi pipetada sobre um corte transversal (1 cm de comprimento) feito na casca dos segmentos (Figura 02). Seis isolados de *Cytospora eugeniae* e seis de *Chrysosporthe cubensis* foram utilizados para inoculação. Também foi inoculado *Phomopsis* sp., isolado do craveiro, usado como comparativo por ser reconhecido como patogênico a muitas culturas. Em seguida foram colocados em câmara úmida e mantidos a 25°C em BOD com fotoperíodo de 12 horas.

O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado – DIC, com seis repetições, cada repetição composta por um fragmento de caule. A comparação das médias de comprimento da lesão foi realizada pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade, com o programa estatístico *Software RStudio* (R version 4.2.1, R Foundation for Statistical Computing, 2022). O ensaio foi repetido duas vezes.

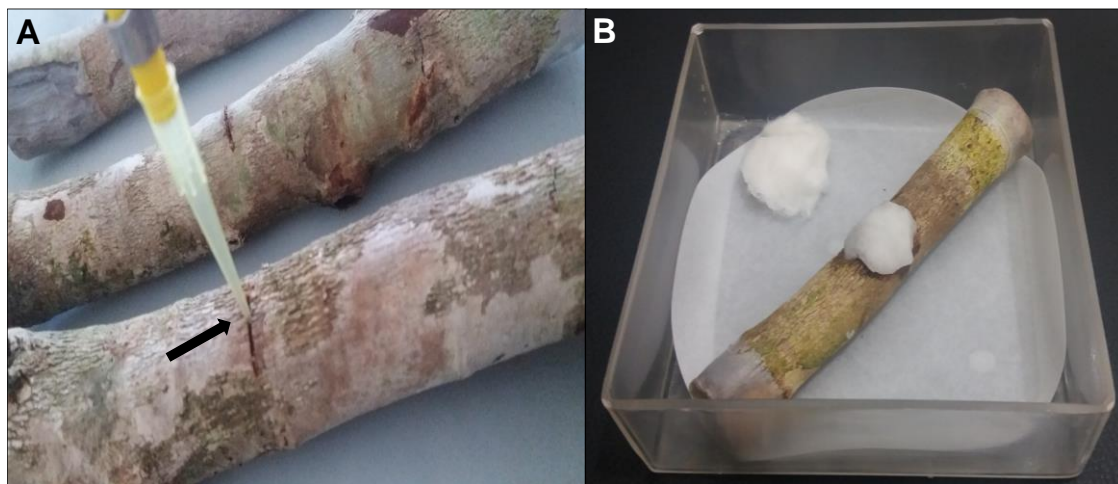


Figura 02. Teste de patogenicidade realizado em fragmentos de caule, em laboratório; (A) Inoculação de suspensão de esporos dos fungos isolados do craveiro-da-índia; (B) incubação em câmara úmida.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificadas duas espécies de fungos patogênicos, em constante associação ao cravo-da-índia doentes e mortos no Baixo Sul da Bahia. *Cytospora eugeniae* (Nutman & F.M. Roberts) G. C. Adams & Rossman (2015) foi associado sempre com craveiros que apresentavam sintomas ou morreram de morte súbita, algumas vezes causando morte de galhos (figura 03A-B). *Chrysosporthe cubensis* (Bruner) Gryzenh. & M.J. Wingf. (2004) ocorreu sempre associado com sintomas de morte de galhos ou parte da planta, doença conhecida como “Dieback” (figura 03C), encontrado também associado à morte súbita de craveiros jovens.

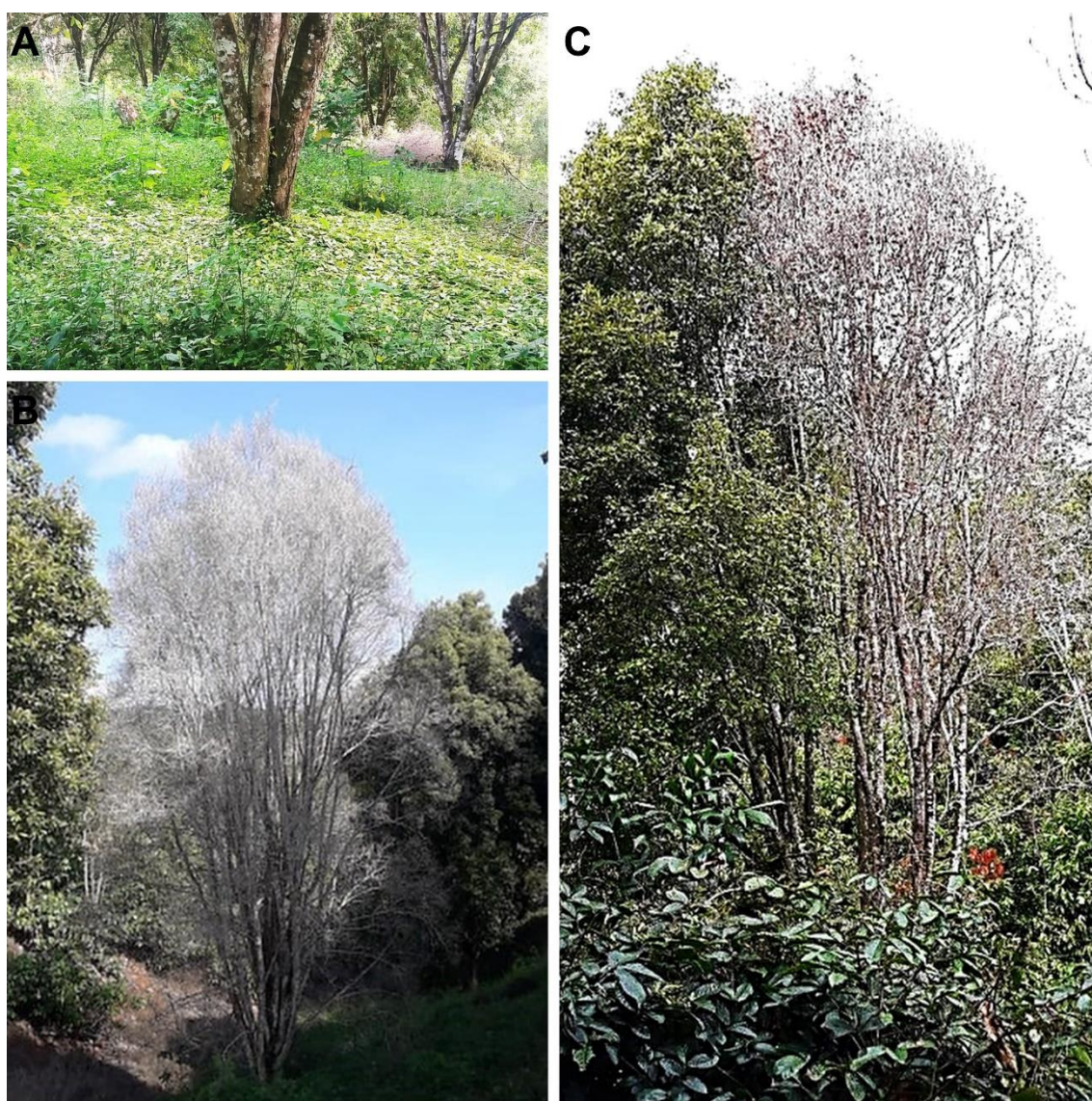


Figura 03. Plantas de craveiro-da-índia com sintomas de morte súbita. (A e B) atacadas por *Cytospora eugeniae*; A – queda repentina das folhas, B – aspecto cinzento após a morte da planta; e C – dieback de craveiro maduro caudado por *Chrysosporthe cubensis*.

Análise filogenética

A identificação morfológica de *Cytospora eugeniae* foi confirmada por sequenciamento de DNA. As sequências foram depositadas no banco de dados GenBank MN460826. As análises no BLASTn das sequências de ITS1 e ITS4 mostraram que a espécie foi 100% semelhante com as sequências do CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center (figura 04): CBS 116839 (KY051813), CBS 116837 (KY051811), CBS 116836 (KY051810), CBS 116835 (KY051809) e CBS 116834 (KY051808).

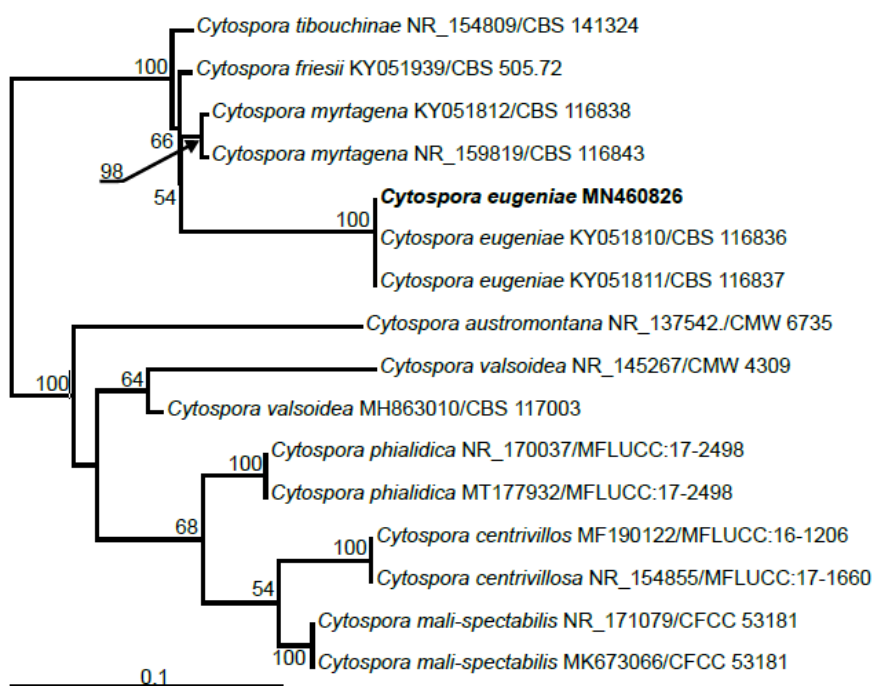


Figura 04. Árvore filogenética de *Cytospora eugeniae* e espécies relacionadas, construída usando a região rDNA ITS1 e ITS4 combinada. *Cytospora tibouchinae* CBS 141324 foi usado como grupo distante. Os valores de suporte foram obtidos a partir da análise de máxima verossimilhança. A sequência obtida neste estudo está anotada em negrito.

Taxonomia

***Cytospora eugeniae* (Nutman & F.M. Roberts) G. C. Adams & Rossman**

(figura 05)

Sinônimo:

Valsa eugeniae Nutman & F.M. Roberts

Hospedeiro/Distribuição: *Eugenia* sp. – Indonésia, Tanzânia (LAWRENCE et al., 2018; KEPLEY et al., 2015; PAN et al., 2018); *E. aquea* – Malásia (KEPLEY et al., 2015); *Anacardium occidentale* – Tanzânia (KEPLEY et al., 2015); *Tibouchina* sp. – Brisbane, Austrália (PAN et al., 2018); *Syzygium aromaticum* – Brasil (SILVA et al., 2020).

Os estromas são fundidos com os tecidos do hospedeiro. Os peritécios ocorrem às vezes em pequenos grupos de 4 a 12, mas são encontrados com frequência em grupos maiores de 100 ou mais. Os estromas periteciais desenvolvem-se na casca externa. Peritécios são pretos mais intensos, globosos, 240 – 335 (280) μm , com longos ostíolos de 0,6 – 4 mm comprimento e 70 – 120 (95) μm diâmetro, arredondados no ápice. Paráfises ausentes. Ascos sésseis, numerosos, unitunicados, subclavados, arredondados no ápice, 8 esporos, 16 – 21 (19) x 3,6 – 5,7 (4,5) μm , parede pouco visível. Ascósporos hialinos, alantoides, unicelulares, 4,5 – 6,3 (5,2) x 1,4 – 2,2 (1,9) μm .

Os picnídios são pretos, globosos ou ovoides, subepidérmicos, não associados a nenhum estroma definido, uniloculares, hialinos internamente, com a camada produtora de conídios profundamente convoluta. São produzidos livremente, principalmente na madeira sem a cobertura da casca, ou na parte exposta cortada. Eles têm 250 – 370 (295) μm de diâmetro e 300 - 900 (540) μm de altura. Os conidióforos são hialinos e ramificados, com 10 – 40 (20) μm de comprimento e 1 – 2 (1,2) μm de largura na base. Células conidiogênicas fialídicas, enteroblásticas, 7 – 18 (11) x 1 – 1,8 (1,3) μm . Os conídios são hialinos, alantoides, unicelulares, 2 – 4 (3,1) x 0,7 – 1,6 (1,1) μm , quando são exsudados formam glóbulos amarelos ou amarelo-claros no ápice do picnídio.

No meio de cultivo BDA, o micélio não muito volumoso, às vezes encharcado, é de cor cinza, amarelada a olivácea. Crescimento rápido, cobrindo

uma placa de 9 cm de diâmetro de 3 – 5 dias à temperatura de 25°C. O crescimento é irregular, com picnídios produzidos em anéis concêntricos. Peritécios foram produzidos em cultura após 30 dias de incubação. Na borda da placa, a superfície às vezes torna-se convoluta e são formados peritécios relativamente grandes, projetando-se até 2 – 3 mm acima da superfície do meio. Estes formam no ápice glóbulos amarelos viscosos de ascósporos exsudados.

Nota: Os espécimes estudados correspondem à descrição original de Nutman e Roberts (1953), com ligeiras diferenças como o comprimento do pescoço do peritécio, ascósporos maiores e a produção de peritécios em cultura pura.

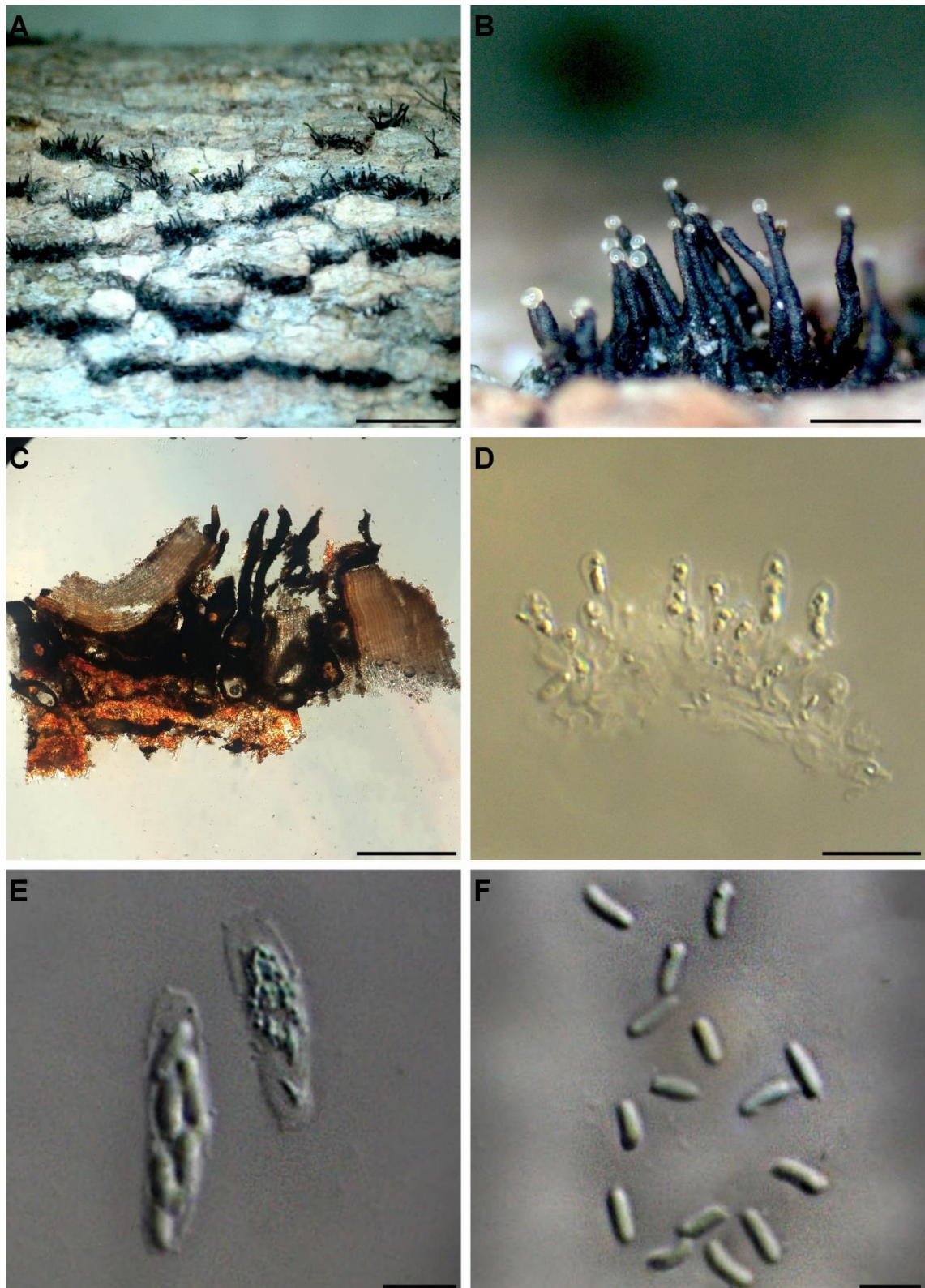


Figura 05. Micrografias de *Cytospora eugeniae*. (A) Peritécios pretos formados na casca de tronco. (B) Peritécios com exsudados de massa de ascósporos. (C) Corte vertical através do ascoma. (D) Ascós imaturos ligados ao material da parede do peritécio. (E) Ascós. (F) Ascóporos. Barras A = 1 cm; B = 2 mm; C = 0,5 mm; D = 20 μ m; E = 5 μ m; F = 5 μ m.

Sintomatologia

Morte súbita

Cytospora eugeniae foi encontrado no Baixo Sul da Bahia em constante associação com craveiros que morreram da doença de morte súbita. A presença de *C. eugeniae* foi sempre associada a uma mancha amarelo-açafrão na madeira afetada, que é separada da saudável por uma zona estreita manchada de cinza azulado e muitas vezes limitada por uma linha de zona preta nítida (figura 06A-C). No campo, os peritécios aparecem no color dos cravos-da-índia ainda vivos, foram encontrados também abaixo do solo, em rachaduras de raízes que foram expostas. Os pescoços pretos dos peritécios inicialmente se projetam ao longo de rachaduras na casca, dando à área de frutificação uma aparência quase quadriculada.

Após 3 meses dos craveiros terem morrido de morte súbita, os peritécios podem ser encontrados em grande quantidade em todas as partes externas do tronco e galhos maiores. Eles também se formam na madeira exposta de tocos de árvores derrubadas, substituindo os picnídios que são os primeiros corpos de frutificação a se desenvolverem nessas condições. Os peritécios continuam a ser produzidos em árvores mortas em pé ou derrubadas por vários anos, ou até que a casca se desintegre. Os picnídios geralmente são vistos em superfícies cortadas, rachadas ou quebradas de madeira e ocorrem em abundância apenas em condições úmidas.

Em árvores maduras, o primeiro sintoma de morte súbita é uma clorose muito leve, difícil de ser diagnosticada, pois uma clorose semelhante pode resultar de outras causas. A clorose pode persistir por muitas semanas ou até por vários meses e é seguida por uma queda de folhas repentina e muito rápida, acompanhada de murcha de uma proporção considerável das folhas que secam na árvore, sem abscisão, as quais adquirem uma cor marrom-avermelhada. Geralmente são apenas alguns dias desde o início da queda das folhas até a morte final da árvore, e é dessa aparente rapidez que a doença deriva seu nome.

O sistema radicular apresenta degeneração das raízes mais finas (figura 06D-F), simultaneamente com o aparecimento dos sintomas na copa, restando apenas as partes estruturais do sistema. Um sintoma característico da doença no tronco é uma descoloração amarela intensa, visível abaixo da casca. Os sintomas

na copa (queda rápida ou demorada das folhas) variam, dependendo das condições de umidade que precedem a morte. A causa final da morte da árvore é a falta de água.



Figura 06. Sintomas de morte súbita. (A-C) Amarelo-açafrão na madeira afetada; (B) linha preta nítida, limitando o tecido colonizado; (D-F) raízes mortas de plantas vivas com degeneração das raízes mais finas.

Em estudo detalhado de várias árvores mortas e doentes feito por Nutman e Roberts (1954), eles notaram como uma das características da doença que a desorganização da raiz precede a morte, e que a morte, dessa maneira é o

resultado direto da falta de água, corroborando as observações de campo deste trabalho, quando se observou em árvores com sintomas raízes seriamente afetadas. A detecção do estágio inicial da doença é difícil, pois a planta aparenta estar sadia, embora o sistema radicular já esteja comprometido pela colonização do fungo.

Taxonomia

***Chrysosporthe cubensis* (Bruner) Gryzenh. & M. J. Wingf. (figura 07)**

Sinônimos:

Cryphonectria cubensis (Bruner) Hodges (1980)

Cryptosporella eugeniae Nutman & F.M. Roberts (1952)

Diaporthe cubensis Bruner (1917)

Endothia eugeniae (Nutman & F.M. Roberts) J. Reid & C. Booth (1969)

Hospedeiro/distribuição: *Chrysosporthe aromatica* – Malaysia; *Clidemia sericea* – Mexico; *Corymbia citriodora* – Brazil, Suriname; *Corymbia maculata* – Brazil, Suriname; *Eucalyptus angulosa* – Brazil; *Eucalyptus aromatica* – Malaysia; *Eucalyptus botryoides* – Cuba; *Eucalyptus camaldulensis* – China, Cuba, Ghana; *Eucalyptus citriodora* – Suriname; *Eucalyptus dagambae* - Ghana; *Eucalyptus deglupta* – Hawaii, Puerto Rico; *Eucalyptus grandis* – Brazil, China, Colombia, Cuba, Florida, Ghana, Hawaii, India, Mexico, South America, Venezuela; *Eucalyptus longifolia* - Brazil; *Eucalyptus maculata* - Brazil, Suriname; *Eucalyptus marginata* – Australia; *Eucalyptus microcorys* – Brazil; *Eucalyptus paniculata* Brazil; *Eucalyptus pilularis* – Brazil; *Eucalyptus propinqua* - Brazil; *Eucalyptus robusta* - Brazil; *Eucalyptus saligna* - Congo, Cuba, Hawaii; *Eucalyptus* sp. – Brazil, China, Colombia, Congo, Cuba, Hawaii, Indonesia, Mexico, Mozambique, South Africa, Venezuela, Viet Nam; *Eucalyptus tereticornis* - Brazil; *Eucalyptus trabutii* - Brazil; *Eucalyptus urophylla* - Cameroon, Colombia, Cuba; *Eucalyptus grandis-urophylla* – China; *Eugenia* sp. - Indonesia, Venezuela; *Eugenia urophylla* – Cameroon; *Lagerstroemia indica* – Cuba; *Marlierea edulis* – Brazil; *Melastoma malabathricum* - Indonesia, Indonesia, Java; *Miconia rubiginosa* - Colombia; *Miconia theaezans* - Colombia; *Psidium cattleianum* - Brazil; *Rhynchanthera mexicana* - Mexico; *Syzygium aromaticum* - Brazil, Indonesia, Malaysia, Singapore, Tanzania, Zanzibar; *Syzygium cumini* - China; *Tibouchina granulosa* - Brazil; *Tibouchina heteromalla* -

Brazil; *Tibouchina semidecandra* - Colombia; *Tibouchina* sp. - Brazil; *Tibouchina urvilleana* - Brazil, Singapore, Thailand; *Vaccinium floribundum* - Colombia (FARR; ROSSMAN, 2022).

Na madeira naturalmente infectada os estromas periteciais são valsiformes, contendo 1 – 12 peritécios com pescoços convergentes. Os peritécios são valsoides, base imersa na casca, globoso, têm 0,5 – 1 mm de diâmetro, com pescoços de 0,5 – 3 mm de comprimento e 100 – 200 μm de largura. Na parte superior das bases os peritécios são da cor laranja - amarelado, tecido estromático formando um clipeo de extensão variável, ocasionalmente visível acima da superfície da casca. Possuem com frequência uma protuberância no meio e/ou na parte de cima do pescoço. Paráfises ausentes. Os ascos são sésseis, hialinos, unitunicado, livres quando maduros, fusoides a elipsoide, com 8 esporos, 22 – 28 (24,5) μm por 5 – 6,6 (6) μm . A parede do asco não é facilmente visível. Os ascósporos são hialinos, unisseptados, geralmente centralizados, fusoides a ovais, medem 5,2 – 8 (6,8) μm por 2 – 3,5 μm .

Os picnídios ocorrem em fileiras, com grupos individuais menores. Conidiomas contêm picnídios uniloculares, superficiais a ligeiramente imersos, piriformes, individuais ou em grupos de cinco, preto-foscas, 0,5 – 1 mm de diâmetro, com pescoços de até 2 mm de comprimento. Os conidióforos hialinos ramificados, ampuliformes, com 8 – 12 μm de comprimento e 2 – 3 μm de largura. Conídios hialinos, unicelulares, oblongos, 3,4 – 5 μm de comprimento e 1,5 – 2,6 μm , exsudados formam glóbulos amarelos ou cirros marrons a amarelo-alaranjado.

No meio de cultivo BDA, a cor das colônias é geralmente alaranjada, variando de quase incolor com um leve tom ocre a uma cor de laranja escuro, a cor é mais intensa no lado inferior da cultura, cotonosa, com bordas mais suaves. Crescimento rápido, cobrindo uma placa de 9 cm de diâmetro de 3 – 6 dias com temperatura de 25 °C. Os picnídios são produzidos livremente em placas em anéis concêntricos, quando maduros expulsam massas de esporos amarelo-alaranjado. Ascoma com conidioma foram produzidos em cultura pura após 30 dias de cultivo.

Os espécimes examinados morfologicamente correspondem à descrição de Nutman e Roberts (1953), no entanto, estes autores não observaram ascósporos septados. O diâmetro dos peritécios difere das medidas relatadas por Gryzenhout

et al. (2004), quando estes, descreveram o gênero *Chrysoporthe*, para acomodar *Cryphonectria cubensis* na combinação nova *Chrysoporthe cubensis*.

O gênero *Chrysoporthe* inclui importantes patógenos de *Eucalyptus* spp. e foi relatado em vários gêneros de árvores na ordem Myrtales em áreas tropicais e subtropicais do mundo (GRYZENHOUT et al., 2004). Durante levantamentos de doenças no sul da China, estruturas de frutificação típicas de *Chrysoporthe cubensis* foram observadas em cancrios de *Eucalyptus* spp. e árvores de *Syzygium cumini* (CHEN et al., 2010).

Em 1986, Hodges et al. visitou plantações de cravo em vários locais nos estados da Bahia e Espírito Santo – Brasil. No entanto, *C. cubensis* esteve presente em apenas duas árvores e, em ambos os casos, o fungo aparentemente havia entrado no tronco através de um toco de galho cortado, assim como o fungo era relatado na Indonésia. Nenhum sintoma de morte da planta ou galho, como descrito neste estudo foi observado por Hodges et al. (1986). Assim, para à época, no Brasil, *C. cubensis* em cravo era um patógeno fraco ou oportunista.

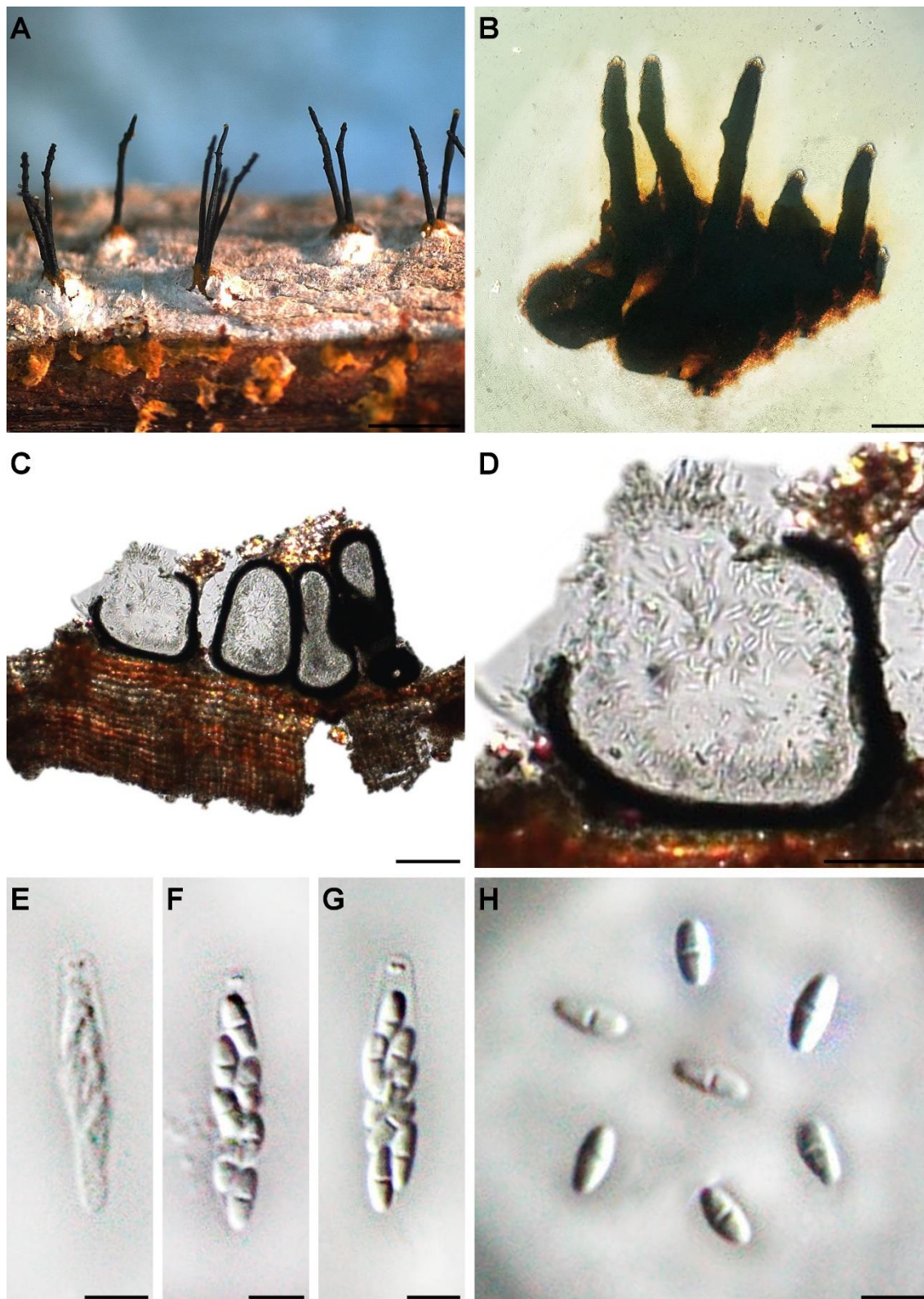


Figura 07. Micrografias de *Chrysoporthe cubensis*. (A) Pescoços periteciais pretos e tecido estromático laranja de ascostromas na casca; (B) peritécios; (C-D) corte vertical através do ascôma; (E-G) ascos; (H) ascósporos. Barras A = 2 mm; B – C = 200 μ m; D = 100 μ m; E-H = 5 μ m.

Sintomatologia

“Dieback” agudo

Chrysosporthe cubensis é um parasita grave de feridas, amplamente distribuído nas áreas de coleta do Baixo Sul da Bahia. É a principal causa de morte de ramos individuais e, eventualmente, de árvores inteiras, de todas as idades, e da chamada “morte súbita” de árvores jovens, sintomas semelhantes aos observados por Nutman e Roberts (1952).

Os peritécios ocorrem frequentemente em fissuras lineares bem definidas na casca. O fungo ramifica-se tanto na madeira como na casca, onde provoca uma descoloração castanho-avermelhada muito distinta e característica. Os sinais do patógeno podem ser detectados pelas frutificações (peritécios) que se desenvolvem na casca pouco tempo após a infecção. Os picnídios foram observados principalmente na parte da madeira sem casca ou na superfície do corte de um galho ou tronco.

Quando um grande galho ou um tronco principal é afetado, muitas vezes foi observado como sinal do patógeno, cirros amarelos-alaranjados de picnósporos que exsudam de rachaduras na casca. Assim como foi observado por Nutman e Roberts (1952), nos galhos menores com casca mais fina, os pescoços dos picnídios se projetaram dando uma aparência espinhosa, a superfície da área de frutificação assume uma cor marrom - alaranjado - opaco pelos exsudados dos picnósporos.

A infecção por *Chrysosporthe cubensis* é caracterizada pela morte súbita de um galho inteiro. Os galhos atacados podem ser de qualquer tamanho e ocasionalmente o ataque pode ser no tronco principal, caso em que a morte da árvore, é semelhante à causada por morte súbita, sendo possível ser facilmente diagnosticada erroneamente, necessitando de análises mais específicas para o correto diagnóstico. Os casos de morte da planta ou do galho, causados por *C. cubensis*, estão principalmente associados a algum tipo de lesão na árvore, ocasionadas por operações de colheita ou limpeza da área com implementos que deliberadamente ferem os troncos e raízes da planta.

Uma vez que o patógeno tenha infectado a planta, ele progride pelo galho, muitas vezes circundando-o e atingindo o tronco principal, sobretudo em árvore

jovem. Em alguns casos de infecção de árvores maduras, são cortados os galhos individuais, resultando em árvores com cabeça de veado, como nomeou essa característica Nutman e Roberts (1971), onde alguns galhos vivos ainda estão conectados ao sistema radicular por fios de tecidos saudáveis.

Testes de Patogenicidade

As mudas inoculadas, tanto por *Cytospora eugeniae* como por *Chrysosporthe cubensis*, não apresentaram sintomas de doença nem sinais dos patógenos após seis meses de observação. Da mesma forma como foi relatado por Nutman e Roberts (1954), plantas jovens/mudas de craveiros apresentam resistência/imunidade. Isto foi corroborado por Nutman e Roberts (1971), quando todas as tentativas de produzir a infecção de mudas jovens de cravo falharam, tanto nas inoculações por esporos como por micélio em crescimento ativo, no caule ou nas raízes.

Fica claro, portanto, que as árvores muito jovens são imunes à infecção por *C. eugeniae*, que as mudas jovens são resistentes, mas tornam-se progressivamente menos resistentes, e que as árvores maduras podem ser atacadas, caso em que ocorre a morte súbita. Essa resistência juvenil parece ser a razão pela qual a morte de árvores jovens, ocorre de forma mais lenta do que no caso das árvores maduras (NUTMAN; ROBERTS, 1971).

Nos testes de inoculação realizados em seções de caule de plantas sadias todos os isolados de *Cytospora eugeniae* e *Chrysosporthe cubensis* produziram lesões nas seções de galhos inoculados, enquanto que os controles permaneceram sem sintomas (figura 08) e os patógenos foram reisolados dos caules inoculados.



Figura 08. Fragmentos de caule de craveiros inoculados com *Cytospora eugeniae* (A- 10 d.a.i.*, B-30 d.a.i.) e *Chrysosporthe cubensis* (D-10 d.a.i., E-30 d.a.i.). Controle (C, F). *dias após inoculação.

Os testes de comparação de média mostraram que os comprimentos médios das lesões causadas pelos isolados de *Cytospora eugeniae* e *Chrysosporthe cubensis* foram significativamente mais longos ($p < 0,05$) do que o controle negativo e um isolado de *Phomopsis* sp. (figura 09). Uma forma de controle positivo a ser utilizado seria a comparação com *Ganoderma* sp. também, devido a ocorrência de sintomas comuns aos patógenos estudados, como seca dos ramos, por exemplo. No entanto, não se obteve durante as coletas nenhum isolado de *Ganoderma* sp. *C. cubensis* foi menos agressivo do que *C. eugeniae*.

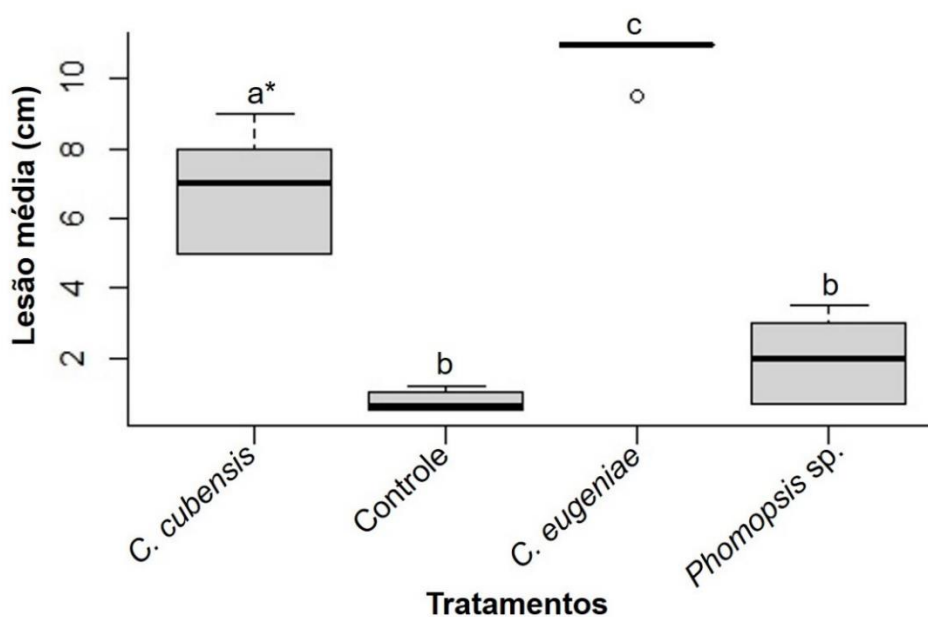


Figura 09. Histograma (Boxplot) mostrando o comprimento médio das lesões resultantes dos ensaios de inoculações em segmentos de caule de *Syzygium aromaticum*. *Médias seguidas pela mesma letra nas barras, não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey a 5 %.

Resultados semelhantes de inoculações de seções de ramos ou caules de craveiro foram obtidos por Hodges et al. (1986), onde isolados de *Chrysosporthe cubensis*, obtidos de cravo e de eucalipto, cresceram rapidamente e atingiram as extremidades das seções em um mês ou menos. Os corpos de frutificação (picnídios e/ou peritécios) foram evidentes após um mês da inoculação. No ensaio do presente estudo, os picnídios foram observados no ponto de inoculação após 10 dias da inoculação, enquanto que os peritécios foram evidentes após um mês da inoculação. Alguns isolados produziram apenas picnídios durante esse período.

Controle, inóculo e disseminação

Na literatura não são encontrados resultados de pesquisas que tenham testado algum método de controle sobre as doenças diagnosticadas anteriormente. Nutman e Roberts (1971) relatam a magnitude do problema em controlar a disseminação das doenças, uma vez que os esporos são produzidos a partir nas áreas infectadas por pelo menos nove meses, uma fonte considerável de inóculo (figura 10). Esses esporos podem ser distribuídos por respingos de água e gotejamento de água pelo tronco e galhos da mesma árvore. Além disso, como a colheita dos botões florais envolve os colhedores subindo nas árvores e manuseando a maioria dos galhos, eles atuam certamente, como transportadores de inóculo.

Dessa forma as medidas iniciais de controle, são a remoção extensiva de fontes de inóculo, retiradas das árvores mortas, aplicação de calda fungicida protetora sobre o toco quando este não for removido, seguida por um período de pousio antes do replantio (NUTMAN; ROBERTS, 1954). Todos os galhos infectados devem ser removidos, tomando-se o cuidado de cortar no ponto da madeira saudável, evitando a persistência do patógeno. Nas grandes lesões, cuja excisão às vezes exige a remoção de mais da metade do tronco principal, como foi observado nos campos onde foi feita esta pesquisa, também é necessário a aplicação de calda protetora (NUTMAN; ROBERTS, 1952).

Tomar cuidado em operações com implementos agrícolas para evitar feridas nas árvores, que servem como porta de entrada para os patógenos. Quando observados os ferimentos, realizar tratamento com calda fungicida protetora à base cobre (calda bordalesa).

Planos para testar possíveis métodos de controle estão sendo implementados, visando desenvolver medidas, principalmente químicas e biológicas, para compor um manejo integrado do complexo de doenças denominada morte-súbita (*Cytospora eugeniae*) e dieback (*Chrysosporthe cubensis*) do craveiro-da-índia na região do Baixo Sul da Bahia.



Figura 10. Fontes de inóculo. (A) Plantas mortas no campo por anos ainda de pé; (B) peritécios de *Cytospora eugeniae* (setas) no tronco de craveiro maduro que havia morrido alguns meses de morte súbita; (C) tronco de craveiro morto cortado e madeira estocada na propriedade; (D e E) extremidade cortada do tronco de craveiros mortos, mostrando picnídios de *Chrysosporthe cubensis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFFONSO, R. S.; RENNÓ, M. N.; SLANA, G. B. C. A.; FRANÇA, T. C. C. Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. **Revista Virtual Química**. Vol. 4, No. 2, 146-161p. 2012.
- ARAÚJO, A. C.; SACRAMENTO, C. K.; SILVA, P. H. **Avaliação econômica da colheita do cravo-da-índia na região Sudeste da Bahia**. CEPEC/CEPLAC. Boletim Técnico nº164. Bahia, Brasil, 1989.
- ARX, J. A; MÜLLER, E. Die Gattungen der amerosporen Pyrenomyceten. **Beiträge zur Kryptogamenflora der Schweiz, Wabern- Bern**, v.11, n.1, p.1–434. 1954.
- CHEN, S. F.; GRYZENHOUT, M.; ROUX, J.; XIE, Y. J.; WINGFIELD, M. J.; ZHOU, X. D. Identification and pathogenicity of *Chrysosporthe cubensis* on *Eucalyptus* and *Syzygium* spp. in South China. **Plant Disease**, **94**: 1143-1150, 2010.
- DALLA PRIA, M.; CAMARGO, L.E.A. Doenças do Craveiro-da-Índia (*Caryophyllus aromaticus* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia, Volume 2: Doenças das Plantas Cultivadas**. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo – SP, 1997.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. **Focus** **12**: p. 13-15, 1990.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2020. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>> Acessado em: 09/09/2022.
- FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Disponível em: < <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/> > Acessado em: 18/09/2022.
- GRYZENHOUT, M.; MYBURG, H.; VAN DER MERWE, N. A.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. *Chrysosporthe*, a new genus to accommodate *Cryphonectria cubensis*. **Studies in Mycology**. 50(1):119-142, 2004.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic Biology** **52 (5)**: 696–704, 2003.

HODGES, C. S.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A. The conspecificity of *Cryphonectria cubensis* and *Endothia eugeniae*. **Mycologia**, **78**:343-350, 1986.

HODGES, C. S. The taxonomy of *Diaporthe cubensis*. **Mycologia** **72**: 542-548, 1980.

IBGE. Produção Agrícola Municipal. **Área colhida e área plantada da lavoura permanente**. 2017. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/6616#resultado>> Acessado em: 21 de maio de 2019.

KEPLEY, J. B.; REEVES, F. B.; JACOBI, W. R.; ADAMS, G. C. Species associated with Cytospora canker on *Populus tremuloides*. **Mycotaxon** **130(3)**: 783-805, 2015.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution** **33**:1870-1874, 2016.

LAWRENCE, D. P.; HOLLAND, L. A.; NOURI, M. T.; TRAVADON, R.; ABRAMIAN, A.; MICHAILIDES, T. J.; TROUILLAS, F. P. Molecular phylogeny of *Cytospora* species associated with canker diseases of fruit and nut crops in California, with the description of ten new species and one new combination. **IMA Fungus** **9(2)**: 333-370, 2018.

MILNE, I.; WRIGHT, E.; ROWE, G.; MARSHALL, D. F.; HUSMEIER, D.; McGUIRE, G. TOPALi: Software for Automatic Identification of Recombinant Sequences within DNA Multiple Alignments. **Bioinformatics**, v. **20**, n. **11**, p. 1806-1807, 2004.

NUTMAN, F. J.; ROBERTS, F. M. Acute die-back of clove trees in the Zanzibar Protectorate. **Ann. appl. Biol.** **39**, 599-608, 1952.

NUTMAN, F. J.; ROBERTS, F. M. The clove industry and diseases of the clove tree. **Pest Articles & News Summaries – PANS**, **17 (2)**: 147-165, 1971.

NUTMAN, F. J.; ROBERTS, F. M. Two New Species of Fungi on Clove Trees in the Zanzibar Protectorate. **Trans. Brit. Mycol. Soc.** 36:29. 1953.

NUTMAN, F. J.; ROBERTS, F. M. *Valsa eugeniae* in Relation to the Sudden-Death Disease of the Clove Tree (*Eugenia aromatica*). **Ann. Appl. Biol.** **41 (1)**, 23-44, 1954.

OLIVEIRA, M.L.; MELO, G.L.; NIELLA, A.R.R.; SILVA, V.R. Black root rot caused by *Rosellinea pepo*, a new disease of the clove tree in Brasil. **Tropical Plant Pathology**, Vol. 33, 2, 90-95 p, 2008.

OLIVEIRA, R. J. V.; BEZERRA, J. L.; LIMA, T. E. F.; SILVA, G. A.; CAVALCANTI, M. A. Q. *Phaeosphaeria nodulispora*, a new endophytic coelomycete isolated from tropical palm (*Cocos nucifera*) in Brazil. **Nova Hedwigia**, v. **103**, n. **1**, p. 185–192, 2016.

OLIVEIRA, R. J. V.; LIMA, T. E. F.; CUNHA, I. B.; COIMBRA, V. R. M.; SILVA, G. A.; BEZERRA, J. L.; CAVALCANTI, M. A. Q. *Corniculariella brasiliensis*, a new species of coelomycetes in the rhizosphere of *Caesalpinia echinata* (Fabaceae, Caesalpinioideae). Brazil. **Phytotaxa** **178 (3)**: 197–204, 2014.

PAN, M.; ZHU, H.-Y.; TIAN, C. -M.; ALVAREZ, L. V.; FAN, X. -L. *Cytospora piceae* sp. nov. associated with canker disease of *Picea crassifolia* in China. **Phytotaxa** **383(2)**: 181-196, 2018.

ROSSMAN, A. Y.; ADAMS, G. C.; CANNON, P. F.; CASTLEBURY, L. A.; CROUS, P. W.; GRYZENHOUT, M.; JAKLITSCH, W. M.; MEJIA, L. C.; STOYKOV, D.; UDAYANGA, D.; VOGLMAYR, H.; WALKER, D. M. Recommendations of generic names in Diaporthales competing for protection or use. **IMA Fungus** 6:145. 2015.

SEIFERT, K. A. et al. **The Genera of Hyphomycetes**. (CBS Biodiversity Series no. 9). utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2011.

SILVA, J. S.; BEZERRA, J. L.; BRAGANÇA, C. A. D.; VILELA, R. J. O.; COSTA, A. Z. M.; NIELLA, G. R.; MARTINS, C. Y. S. First Report of Sudden Death of Clove Trees Caused by *Cytospora eugeniae* in Brazil. **Plant Disease**, v. **104**, p. PDIS-10-19-2126-1868, 2020.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Eds.) PCR protocols: a guide to methods and applications. **Academic Press**, San Diego, pp. 315–322, 1990.

CAPÍTULO 2**FIRST REPORT OF SUDDEN DEATH OF CLOVE TREES CAUSED BY
Cytospora eugeniae IN BRAZIL¹**

¹ Published Online: 25 Mar 2020 < <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-19-2126-PDN> >

First Report of Sudden Death of Clove Trees Caused by *Cytospora eugeniae* in Brazil*

Julielton Santos da Silva¹; José Luiz Bezerra¹; Carlos Augusto Dórea Bragança¹; Rafael José Vilela de Oliveira²; Antônio Zózimo de Matos Costa³, Givaldo Rocha Niella³; Carolina Yamamoto Santos Martins¹

¹Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, R. Rui Barbosa, 710 – 44380-000 – Cruz das Almas, BA – Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos (PPG-BF), Departamento de Micologia Prof. Chaves Batista, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Centro de Biociências, Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife, PE, Brazil.

³Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira – CEPLAC/CEPEC, Caixa Postal 07, 45.600-970, Itabuna, Bahia, Brasil.

Published Online: 25 Mar 2020 | <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-19-2126-PDN>

Clove (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry) is grown worldwide for its aromatic flower buds, which are used as a spice and pharmaceutical ingredient. It is a large tree that can reach 15 m in height and live for over 100 years. In 2017, tree losses of 10 to 90% were observed among clove plantations in the region of Baixo Sul - Bahia (13° 21'27.11 "S 39° 8'25.19" E), main clove producing region of Brazil's center of production for the crop. The losses were attributed to "sudden death", first reported by Nutman and Roberts (1953) to be devastating clove plantations in the Zanzibar Archipelago of Tanzania. There, the causal agent was identified as *Valsa eugeniae* Nutman & Roberts, which was renamed *Cytospora eugeniae* (Nutman & F.M. Roberts) G. C. Adams & Rossman (2015). In Brazil, as in Tanzania, symptom progression on affected trees consisted of a sudden shedding of green leaves and wilting of the remaining leaves, which acquired a reddish-brown color while still in the tree. Concurrent with defoliation, the young roots on affected trees exhibited decay, and the wood just under the bark on tree trunks developed an intense yellow color. Canopy symptoms (rapid or delayed leaf fall) varied, depending on air humidity during disease onset. On the affected clove trees in Brazil, we observed ascostromata (n=30) typical of *C. eugeniae* immersed in the bark, valsoid, with black perithecia commonly in groups of 4 to 12, occasionally found alone or in groups of 50 or more. Perithecia globose, 240–335 µm, with long ostioles of 600–4,000 µm

* Plant Disease | <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-10-19-2126-PDN>

above surfaces (n=50); asci sessile, unitunicate, subclavate, apex rounded, 8-spored, 16–21 (19) x 3.6–5.7 (4,5) μm ; ascospores hyaline, allantoid, aseptate, 4.5–6.3 (5,2) x 1.4–2.2 (1,9) μm . We isolated *C. eugeniae* from symptomatic stem and root fragments, collected from clove trees affected by sudden death. The tissue pieces, surface sterilized and rinsed in sterile water, were cultured on PDA and incubated at 25°C with a 12h photoperiod. Subcultures of the fungus on PDA produced pycnidia dark, unilocular, globose or ovoid, 250–330 μm in diameter (n=50); conidiophores hyaline, branched, 10–40 x 1–2 μm ; conidiogenous cells enteroblastic, phialidic, 7–18 x 1–1,8 μm ; conidia hyaline, allantoid, aseptate, 2–4 (3.1) x 0.7–1.6 (1.1) μm . Morphological identification was confirmed by DNA sequencing. The DNA was extracted from pure culture and ITS sequences were obtained using ITS1/ITS4 primers (White et al., 1990). The sequence obtained (527-bp) (GenBank number MN460826) was 100% similar to *C. eugeniae* (KY051813, KY051811, KY051810). For inoculation tests, a 20 μL aliquot of a suspension of six isolates from pathogen (10^6 conidia/ml) was pipetted on a wound (1 cm long) made with a knife in the bark of clove stem fragments (20 cm long, 2–4 cm diam.). Was used distilled water only and non-pathogen fungus (*Phomopsis* sp.) to provide negative controls. The fragments were incubated in a humid chamber at 25 °C. Each treatment was replicated 6 times. Fifteen days after inoculation, all isolates produced lesions on the inoculated fragments (mean infected area=15,33cm²), while controls showed no symptoms. Cultures reisolated from lesions exhibited morphological characteristics identical to those of *C. eugeniae*. To our knowledge, this is the first report of *C. eugeniae* causing sudden death disease in Brazil. Elucidation of the cause of sudden death may provide a foundation for development of management strategies for the disease.

Literature Cited

Nutman, F. J.; Roberts, F. M. 1953. **Trans. Brit. Mycol. Soc. 36:29.**
[https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(53\)80007-0](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(53)80007-0).

Rossmann, A. Y., et al. 2015. **IMA Fungus 6:145.**
Doi:10.5598/imafungus.2015.06.01.09.

White, T. J., et al. 1990. In: Innis, M.A., et al. (Eds.) Academic Press, San Diego, pp. 315–322. <https://nature.berkeley.edu/brunslab/papers/white1990.pdf>.

CAPÍTULO 3**FIRST REPORT OF *Chrysoporthe cubensis* CAUSING ACUTE DIEBECK
DISEASE IN CLOVES (*Syzygium aromaticum*) IN BRAZIL ¹**

¹Artigo a ser ajustado para submissão ao periódico científico – Plant Disease.

First Report of *Chrysoporthe cubensis* Causing Acute Dieback disease in Cloves (*Syzygium aromaticum*) in Brazil

Julielton Santos da Silva¹; José Luiz Bezerra¹; Carlos Augusto Dórea Bragança¹; Rafael José Vilela de Oliveira²

¹Federal University of Recôncavo da Bahia – Center for Agricultural, Environmental and Biological Sciences, R. Rui Barbosa, 710 – 44380-000 – Cruz das Almas, BA – Brazil

Clove (*Syzygium aromaticum* (L) Merr. & Perry) is mainly used as a spice or in the manufacture of medicines. It is a large tree that can reach 15 meters in height and live for more than 100 years. In 2017, plantations with losses of 10 to 90% of trees in full production were observed due to the incidence of Sudden Death (Silva et al., 2020), as well as dead and diseased plants with suspicious symptoms of acute Dieback, in the Low Southern – Bahia (13°19'36.76"S 39°15'56.19"W), main clove producing region in Brazil. In order to establish the causal relationship between the disease and the pathogen, research was initiated at the Phytosanitary Clinic of the Federal University of Recôncavo da Bahia – UFRB. The observed symptoms consist of the death of a part of the tree, and before this happens perithecia can be found. Perithecial necks protrude from the bark around the entry point of the fungus, usually a wound caused by harvesting and/or using agricultural implements (mainly brush cutters). General symptoms are similar in trees of all ages, but the effect of infection varies with the fungus entry point. When it occurs in young clove trees (8 – 10 years old), the invasion occurs in the lower part of the trunk, the whole plant dies suddenly with most of the leaves still attached. These symptoms are similar to sudden death illness and therefore the attack was misdiagnosed as sudden death by Nutman & Sheffield in 1949 (Nutman & Roberts, 1952). In mature trees, the infection causes clove tree to appear almost dead, skeletal trees with no commercial production value. This happens when the girdling of the main trunk by the pathogen is incomplete, leaving one or two live branches connected to the roots with a band of healthy tissues, common in almost all observed plantations. Acute dieback in cloves was first reported by Nutman and Roberts (1952) causing death of cloves on the island of Zanzibar in Tanzania. The causal agent was identified as *Cryptosporella eugeniae* Nutman and Roberts

(1952), which was renamed *Chrysosporthe cubensis* (Bruner) Gryzenh. & M.J. Wingf. (2004). Hodges et al. (1986) visited clove plantations in several locations in the states of Bahia and Espírito Santo – Brazil, however, *C. cubensis* was present in only two trees and no symptoms of plant or branch death, as described in this study was observed by these authors. Eighteen stem, branch and root isolates were obtained, cultivated in PDA at 25 °C and a 12-hour photoperiod. In infected clove tree in Brazil, we observed ascostromas embedded in the bark (n = 50) typical of *C. cubensis*, containing 1 – 12 perithecia with converging black necks. Perithecia are valsoid, base immersed in the bark, globose, 0.5 – 1 mm in diameter, with necks 0.5 – 3 mm long and 100 – 200 µm wide (n = 50). Asci sessile, hyaline, unitunicate, free when mature, fusiform to ellipsoid, with 8 spores, 22 – 28 (24.5) µm by 5 – 6.6 (6) µm (n = 50). Ascospores hyaline, uniseptate, usually centralized, fusiform to oval, 5.2 – 8 (6.8) µm by 2 – 3.5 µm (n = 50). Conidiomata contain unilocular, superficial to slightly immersed, pear-shaped, single or in groups of five, dull black, 0.5–1 mm in diameter, with necks up to 2 mm in length (n = 50). Hyaline conidiophores branched, ampulliform, 8 – 12 µm long and 2 – 3 µm wide (n = 20). Conidia hyaline, unicellular, oblong, 3.4 – 5 µm long and 1.5 – 2.6 µm, exudates form brown to yellow-orange yellow globules or cirrus (n = 50). Morphological confirmation will be confirmed by DNA sequencing. DNA sequence data from the ribosomal ITS region and β-tubulin regions, which are available from previously characterized *C. cubensis* (Soares et al., 2018), will be included in this study. For the inoculation tests, a 20 µl aliquot of a pathogen suspension (10⁶ conidia/ml) was pipetted into a small wound (0.5 cm long) made in the bark of common clove tree stem fragments (20 cm long, 2 to 4 cm in diameter), kept in a humid chamber at 25°C in BOD. Six isolates of the pathogen were used. Fifteen days later, all isolates produced lesions in the inoculated fragments, while the controls remained without symptoms. Distilled water and an isolate of *Phomopsis* sp. were used as controls, and *Cytospora eugeniae* as a positive control. The fragments were incubated in a humid chamber at 25 °C in BOD. Each treatment was repeated six times. Fifteen days after inoculation, all isolates produced lesions on the inoculated fragments (average lesion length 68 mm), while the controls did not show symptoms. Cultures re-isolated from the lesions exhibited morphological characteristics identical to those of *Chrysosporthe cubensis*. To the best of our knowledge, this is the first report of *C. cubensis* causing acute Dieback disease in Brazil. Elucidating the cause of death of clove trees with

acute Dieback symptoms may provide a basis for developing disease management strategies.

Keywords: Pathogen, *Cryptosporella eugeniae*, phytopathogen.

Literature Cited

GRYZENHOUT, M.; MYBURG, H.; VAN DER MERWE, N. A.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. *Chrysosporthe*, a new genus to accommodate *Cryphonectria cubensis*. **Studies in Mycology**. **50(1)**:119-142, 2004.

HODGES, C. S.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A. The conspecificity of *Cryphonectria cubensis* and *Endothia eugeniae*. **Mycologia**, **78**:343-350, 1986.

NUTMAN, F. J.; ROBERTS, F. M. Acute die-back of clove trees in the Zanzibar Protectorate. **Ann. appl. Biol.** **39**, 599-608, 1952.

NUTMAN, F. J.; SHEFFIELD, F. M. L. The sudden-death disease and its epidemiology. **Ann. appl. Biol.** **36 (4)**, p19-39, 1949.

SILVA, J. S.; BEZERRA, J. L.; BRAGANÇA, C. A. D.; VILELA, R. J. O.; COSTA, A. Z. M.; NIELLA, G. R.; MARTINS, C. Y. S. First Report of Sudden Death of Clove Trees Caused by *Cytospora eugeniae* in Brazil. **Plant Disease**, v. **104**, p. PDIS-10-19-2126-1868, 2020.

SOARES, T. P. F.; FERREIRA, M. A.; MAFIA, R. G.; OLIVEIRA, L. S. S.; HODGES, C. S.; ALFENAS, A. C. Canker disease caused by *Chrysosporthe doradensis* and *C. cubensis* on *Eucalyptus* sp. and *Tibouchina* spp. in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. **43**, p. 314-322, 2018.

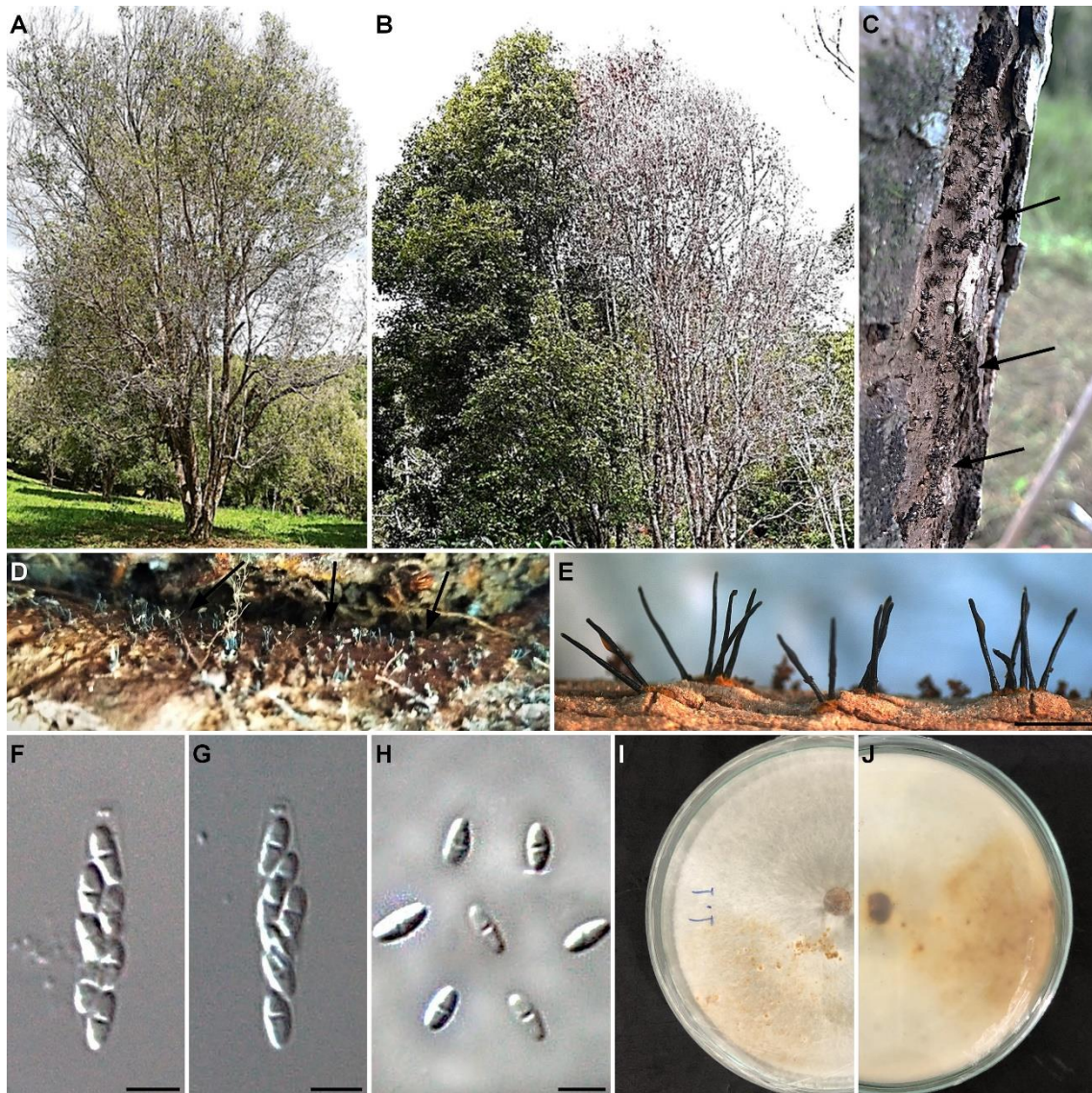


Figure 01. *Chrysosporthe cubensis*. (A-B) Clove trees with symptoms of acute dieback. (C) Perithecia on the trunk. (D) Perithecia in the root near the neck. (E) Perithecia on a branch. (F-G) Asci. (H) Ascospores. (I-J) Colony on PDA medium. Bars: E = 2 mm; F-H = 5 μ m.

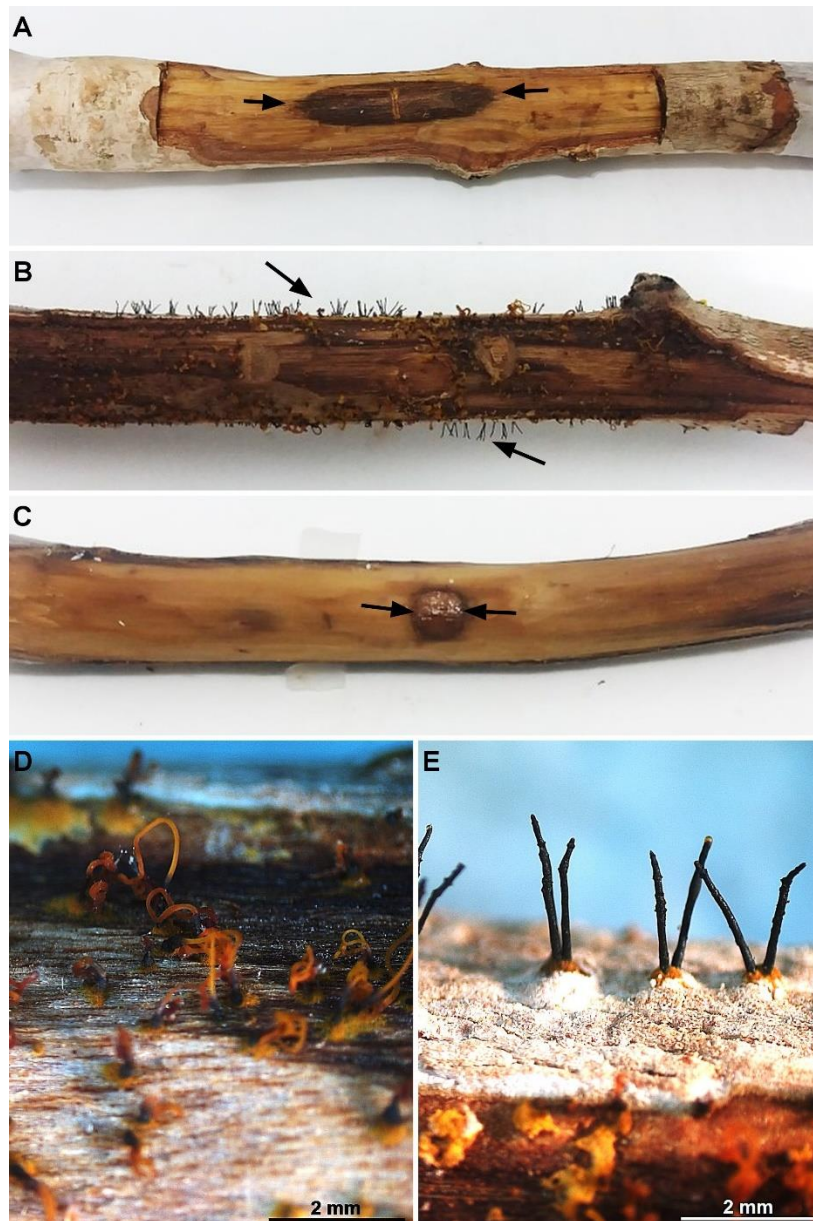


Figure 02. *Chrysosporthe cubensis*. (A-E) Pathogenicity test on stem segments. (A) Lesion 10 DAI. (B) Production of pycnidia and perithecia 30 DAI. (C) Control. (D) Pycnidia expelling mass of conidia (circus). (E) Perithecia produced in the inoculated stem segment.

CAPÍTULO 4**Alguns Fungos Associados a Craveiros no Baixo Sul da Bahia e
Novos Registros¹**

¹Artigo a ser ajustado para submissão ao Comitê Editorial de periódico científico.

Fungos Associados a Craveiros no Baixo Sul da Bahia e Novos Registros

Julielton Santos da Silva¹, José Luiz Bezerra¹, Carlos Augusto Dórea Bragança¹

¹Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, R. Rui Barbosa, 710 – 44380-000 – Cruz das Almas, BA – Brazil.

RESUMO

As plantas de modo geral, são colonizadas por microrganismos epifíticos e endofíticos, em grande parte representados por fungos. No cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) já foram registradas 45 espécies de fungos, incluindo espécies patogênicas e não patogênicas. No entanto, no Brasil, um país rico em biodiversidade, a microbiota presente no craveiro ainda não foi estudada. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo contribuir para o conhecimento dos fungos associados a *Syzygium aromaticum* na região do Baixo Sul da Bahia, Brasil, bem como relatar novos registros para a cultura do craveiro. Para isso, foram realizadas coletas em duas propriedades de cinco municípios nos anos de 2017 a 2019. Foram isolados e identificados 25 fungos associados ao cravo-da-índia no Baixo Sul da Bahia, destes 20 foram identificados por características morfológicas visualizadas ao microscópio ao nível de gênero e 5 a nível de espécies. São novos registros para *Syzygium aromaticum*: *Acremonium* sp., *Cytospora brevispora*, *Gliocladiopsis tenuis*, *Idriella* sp., *Pestalotia* sp., *Rhizopus* sp., *Septoria* sp., *Trichoderma* sp. e *Trichoderma longibrachiatum*.

Palavras chaves: *Syzygium aromaticum*, microbiota, diversidade.

Fungos Associados a Craveiros no Baixo Sul da Bahia e Novos Registros

ABSTRACT

Plants in general are colonized by epiphytic and endophytic microorganisms, largely represented by fungi. In clove (*Syzygium aromaticum*) 45 species of fungi have been recorded, including pathogenic and non-pathogenic species. However, in Brazil, a country rich in biodiversity, the mycobiota present in the clove tree has not yet been studied. Thus, this work aimed to contribute to the knowledge of the fungi associated with *Syzygium aromaticum* in the Baixo Sul region of Bahia, Brazil, as well as to report new records for the clove crop. For this, collections were carried out on two properties in five municipalities in the years from 2017 to 2019. Twenty-five fungi associated with cloves were isolated and identified in the Southern Lowlands of Bahia, of these 20 were identified by morphological analysis, with the aid of a microscope at the level genus and 5 at species level. There are new records for *Syzygium aromaticum*: *Acremonium* sp., *Cytospora brevispora*, *Gliocladiopsis tenuis*, *Idriella* sp., *Pestalotia* sp., *Rhizopus* sp., *Septoria* sp., *Trichoderma* sp., *Trichoderma longibrachiatum*.

Key words: *Syzygium aromaticum*, mycobiota, diversity.

INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos eucariotos, heterotróficos unicelulares, como exemplo as leveduras, ou pluricelulares (filamentosos), caracterizados pela formação de hifas que constituem o micélio. Na fase reprodutiva, o micélio forma estruturas assexuadas e/ou sexuadas que originam esporos, principais responsáveis pela propagação das espécies. Estes organismos vivem nos mais diversos ambientes terrestres e aquáticos, dos trópicos às regiões árticas e antárticas. Muitos fungos são capazes de formar estruturas visíveis a olho nu e facilmente reconhecíveis (mofos, bolores, orelhas-de-pau, dedos-de-defunto, estrelas-da-terra, ninhos-de-passarinho, cogumelos etc.), enquanto que a maior parte só pode ser observada ao microscópio, sendo denominados microfungos. Os fungos podem ser sapróbios, simbiontes ou parasitas, nutrem-se por absorção, após digestão parcial dos alimentos por meio de enzimas. Possuem parede celular contendo glucanas e quitina que os diferenciam dos Oomycota (reino Straminipila) que possuem glucanas e celulose na parede (MAIA; CARVALHO JUNIOR, 2010).

Aproximadamente 99.000 espécies de fungos estão descritas, o que representa apenas 6,6% de 1,5 milhão de espécies estimadas no mundo, das quais cerca de 13.800 existiriam no Brasil, ou seja, aproximadamente 14% da diversidade mundial já descrita (KIRK et al., 2008; MAIA; CARVALHO JUNIOR, 2010). Pela classificação de Hibbett et al., (2007), baseada em estudos filogenéticos e proposta por um grupo representativo de micologistas especialistas nos diversos grupos, são considerados os seguintes filos: Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Neocallimastigomycota, Microsporidia, Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota. Esses autores não reconhecem Zygomycota e o separam em quatro subfilos (Mucoromycotina, Kickxellomycotina, Zoopagomycotina e Entomophthoromycotina). Assim, na nova classificação no reino fungi, são considerados sete filos, 10 subfilos, 35 classes, 12 subclasses e 129 ordens.

No Brasil, Maia e Carvalho Junior (2010) conseguiram catalogar apenas 3,7% das espécies descritas mundialmente, correspondendo a 78 ordens, 924 gêneros e 3.608 espécies. Uma fração muito pequena da estimativa dos 14% de espécies descritas que ocorrem no Brasil. Os estados que apresentam maior diversidade de espécies descritas são: São Paulo (1.161 spp.), Pernambuco

(937 spp.), Rio Grande do Sul (856 spp.), Bahia (584 spp.), Paraná (529 spp.), Santa Catarina (482 spp.), Rio de Janeiro (443 spp.), Amazonas (408 spp.), Minas Gerais (399 spp.) e Pará (302 spp.). Os estados que possuem maior número de espécies correspondem àqueles onde há mais tradição de pesquisa micológica e mais grupos ativos de micologistas.

A maior parte dos fungos é constituída de espécies sapróbias que desempenham a importante função ecológica de decomposição na biosfera, degradando produtos orgânicos liberando carbono, e devolvendo nitrogênio e outros elementos ao solo, tornando-os disponíveis às plantas. Cerca de 100 espécies de fungos produzem doenças no homem e quase o mesmo número em animais, a maioria das quais incidem sobre a pele. No entanto, mais de 8.000 espécies de fungos causam doenças em plantas, sendo que todas as plantas são atacadas por algum tipo de fungo, e cada um dos fungos parasitas atacam um ou mais hospedeiros (MICHEREFF, 2001).

Quarenta e cinco espécies de fungos e oomicetos já foram registradas em craveiros no mundo (tabela 01), incluindo espécies patogênicas e não patogênicas (FARR; ROSSMAN, 2019).

Tabela 01. Fungos e oomicetos associados ao cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry) no mundo.

Fungos	País de ocorrência
<i>Allophoma minor</i>	Indonesia
<i>Ascochyta eugeniae</i>	China
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Malaysia
<i>Aspergillus niger</i>	Malaysia
<i>Beltrania rhombica</i>	Indonesia
<i>Calonectria colhounii</i>	EUA
<i>Calonectria indonesiae</i>	Indonesia
<i>Calonectria kyotensis</i>	Malaysia
<i>Calonectria leguminum</i>	Brasil
<i>Calonectria reteaudii</i>	Indonesia

Continua...

...Continuação Tabela 1.

<i>Calonectria syzygiicola</i>	Indonesia
<i>Celoporthes indonesiensis</i>	Indonesia
<i>Celoporthes</i> sp.	Indonesia
<i>Ceratocystis polychroma</i>	Indonesia
<i>Chrysoporthes cubensis</i>	Brasil, Indonesia, Malaysia, Singapore, Tanzania Zanzibar
<i>Chrysoporthes deuterocubensis</i>	Indonesia, Malaysia
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	China, Indonesia, Mauritius
<i>Coniella castaneicola</i>	Indonesia
<i>Corticium koleroga</i>	Brasil
<i>Cryphonectria</i> sp.	Indonesia
<i>Curvularia lunata</i>	Malaysia
<i>Cytospora eugeniae</i>	Brasil, Malásia, Tanzania
<i>Cytospora pruinosa</i>	China
<i>Diaporthe eugeniae</i>	Indonesia
<i>Didymella eucalyptica</i>	Indonesia
<i>Gliocladiopsis curvata</i>	Indonesia
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Indonesia, Malaysia
<i>Lecanostictopsis kamatii</i>	India
<i>Leptosphaeria australis</i>	Indonesia
<i>Leptosphaerulina australis</i>	Indonesia
<i>Limacinula samoensis</i>	Indonesia
<i>Mycosphaerella vexans</i>	Tanzania
<i>Oidium</i> sp.	Cuba, Panama
<i>Paecilomyces variotii</i>	Malaysia
<i>Pestalotiopsis eugeniae</i>	China, Mauritius
<i>Pestalotiopsis versicolor</i>	China, Brasil
<i>Phyllosticta eugeniae</i>	Indonesia
<i>Phyllosticta syzygii</i>	Indonesia
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	Malaysia
<i>Phytophthora palmivora</i>	Malaysia
<i>Phytophthora</i> sp.	Indonesia
<i>Phytopythium vexans</i>	Malaysia

Continua...

...Continuação Tabela 1.

<i>Pseudopithomyces chartarum</i>	China
<i>Rhizoctonia solani</i>	Malaysia
<i>Tripospermum</i> sp.	Malaysia

O Brasil por ser um país tropical tem uma rica diversidade de fungos. Em se tratando da cultura do cravo da Índia, é relatada a ocorrência de apenas nove fungos no Brasil (tabela 02), incluindo as espécies patogênicas e não patogênicas (MENDES; HURBEN, 2019; FARR & ROSSMAN, 2019). De certo, que esses dados não retratam a riqueza de espécies fúngicas existentes no Brasil associada a plantas de cravo da Índia.

Tabela 02. Fungos associados a craveiros (*Syzygium aromaticum* (L) Merr. & Perry) no Brasil.

Fungos	Estado de ocorrência
<i>Calonectria leguminum</i>	---
<i>Chrysosporthe cubensis</i>	Bahia
<i>Colletotrichum</i> sp.	---
<i>Corticium koleroga</i>	Bahia
<i>Ganoderma philippii</i>	Bahia
<i>Pestalotiopsis versicolor</i>	---
<i>Phomopsis</i> sp.	---
<i>Rosellinia pepo</i>	Bahia
<i>Valsa eugeniae</i>	Bahia

Diante do exposto, este trabalho visa contribuir para o conhecimento dos fungos associados a *Syzygium aromaticum* na região do Baixo Sul da Bahia, Brasil, bem como relatar novos registros para a cultura do craveiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de Coleta

As coletas foram realizadas nos períodos de inverno e verão, nos anos de 2017, 2018 e 2019, em cinco municípios (figura 01), importantes produtores de cravo da índia na região do Baixo Sul da Bahia. Sendo estes Valença, Taperoá, Camamu, Ituberá e Teolândia. Foram coletadas amostras de raízes, caule e ramos de cinco plantas doentes e/ou saudáveis em duas propriedades de cada município.

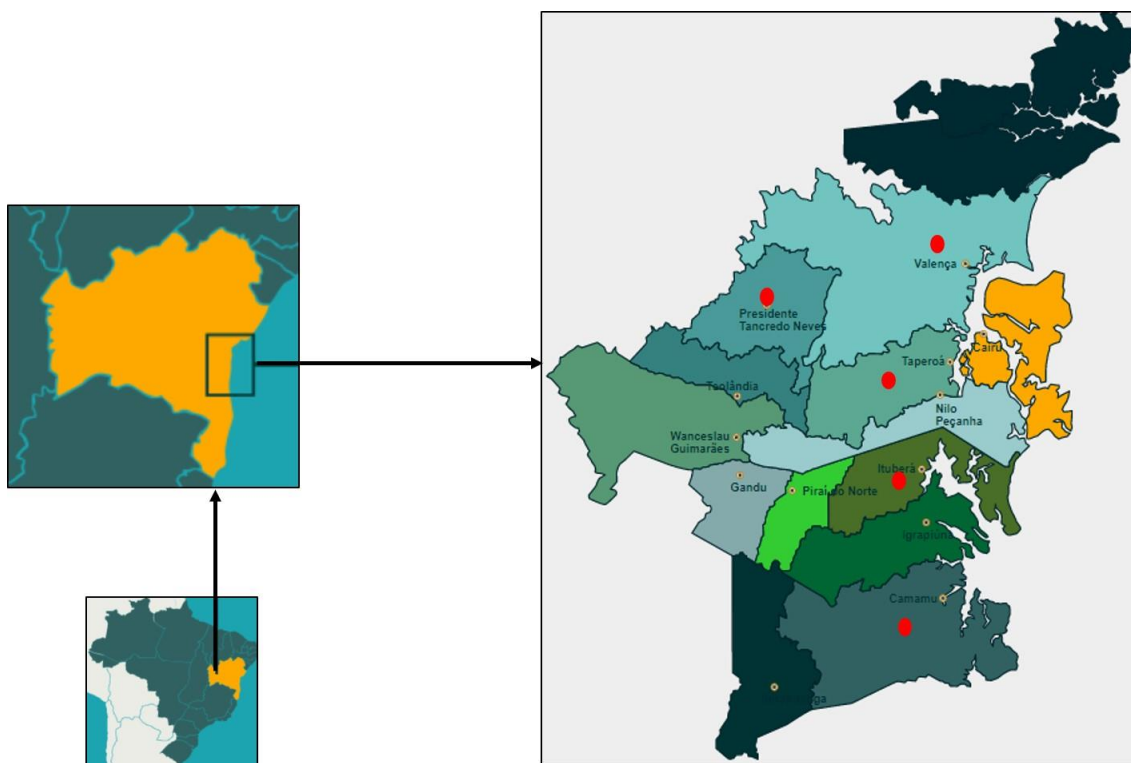


Figura 01. Mapas do Brasil, Bahia e da Região do Baixo Sul, destacando os cinco municípios onde foram realizadas as coletas (CIAPRA, 2022).

Isolamento

As amostras foram levadas para a Clínica Fitossanitária Professor Edgar Santos Filho do Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas – CCAAB da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, onde foram lavadas com sabão neutro em água corrente e em seguida foram cortadas em fragmentos de 5 milímetros. Os fragmentos foram desinfestados, para isolamento indireto, em álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio a 2% por 1 minuto, lavados por 3 vezes em água destilada e esterilizada (ADE) e transferidos para placas de Petri com meio de batata-dextrose-ágar (BDA). Para o isolamento direto, após a desinfestação prévia, as amostras que continham os sinais da doença, foram mantidas em

câmaras úmidas, possibilitando a produção de estruturas reprodutivas, bem como a exsudação da massa de esporos das estruturas dos fungos já existentes no momento da coleta. Com um estéreo-microscópio (Zeiss® Stemi 2000-C) e agulha, a massa de esporos exsudada foi transferida para placas de Petri contendo meio BDA. As placas foram colocadas em incubadora do tipo BOD a temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Após o crescimento inicial, as colônias foram purificadas e preservadas, utilizando-se o método de Castellani, colocando-se discos contendo micélio das colônias fúngicas em microtubos de 2 mL, contendo água destilada estéril hermeticamente fechados. O mesmo processo foi repetido, usando Glicerol em lugar da água. Duplicatas de cada espécime foram preparadas.

Identificação

Após a incubação e purificação das colônias, o material foi observado em estéreo-microscópio. As estruturas fúngicas foram retiradas com uma agulha fina e colocadas em lâminas e lamínulas com meio de montagem temporários (lactofenol azul de algodão e KOH 3%). Lâminas permanentes foram montadas com resina PVLG (Polivinil-Lacto-Glicerol) para a caracterização morfológica. Observou-se características macroscópicas das colônias e microscópicas das estruturas reprodutivas. Com ajuda de chaves taxonômicas existentes na literatura especializada foi feita a identificação em nível de gênero, enquanto que em nível de espécie foram usadas descrições mais específicas.

Extração de DNA, Sequenciamento e Análise Filogenética

Para confirmar a identificação morfológica foi usado o sequenciamento de DNA. Os fungos isolados foram transferidos para meio BDA e incubados por 8 dias a 25 °C. O DNA foi extraído de cada cultura pura de acordo com Doyle e Doyle (1990) e amplificados por “Polymerase Chain Reaction” (PCR) da sequência “Internal Transcribed Spacer” (ITS1-5.8S-ITS2; ITS rDNA) usando os “primers” iniciadores ITS1/ITS4 (WHITE et al., 1990). As sequências foram depositadas no banco de dados GenBank.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificados 23 fungos associados ao cravo-da-índia no Baixo Sul da Bahia, destes foram identificados por análises morfológicas, com auxílio de microscópio ao nível de gênero: *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Aureobasidium* sp., *Ceratocystis* sp., *Chaetosphaeria* sp., *Colletotrichum* spp., *Colletotrichum* sp., *Cylindrocladium* sp., *Desertella* sp., *Exserohilum* sp., *Hamigera* sp., *Idriella* sp., *Lasiodiplodia* sp., *Pestalotia* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Phomopsis* sp., *Phyllosticta* sp., *Rhizopus* sp., *Sphaerulina* sp., *Trichoderma* sp., e ao nível de espécie: *Chrysosporthe cubensis*, *Gliocladiopsis tenuis*, *T. longibrachiatum*.

Os fungos listados a seguir representam mais nove novos registros para a planta *Syzygium aromaticum*:

Acremonium sp.

Material examinado: BRASIL, BAHIA: Presidente Tancredo Neves, Sítio Boa Fé, em raiz de *Syzygium aromaticum*; Valença, Fazenda Três Barras, em raiz de *Syzygium aromaticum*.

Cytospora brevispora (G. C. Adams & Jol. Roux) G.C. Adams & Rossman (2015)

Material examinado: BRASIL, BAHIA: Valença, Fazenda Três Barras, em tronco e raiz de *Syzygium aromaticum*.

Gliocladiopsis tenuis (Bugnic.) Crous & M.J. Wingf. (1993)

Material examinado: BRASIL, BAHIA: Presidente Tancredo Neves, Sítio Boa Fé, em raiz de *Syzygium aromaticum*.

Idriella sp.

Material examinado: BRASIL, BAHIA: Presidente Tancredo Neves, Sítio Boa Fé, Sítio da Paz, em raiz de *Syzygium aromaticum*.

Pestalotia sp.

Material examinado: BRASIL, BAHIA: Valença, Sítio Bahia, em tronco e raiz de *Syzygium aromaticum*.

Rhizopus sp.

Material examinado: BRASIL, BAHIA: Presidente Tancredo Neves, Sítio Boa Fé, em raiz e casca do colo de *Syzygium aromaticum*; Valença, Fazenda Três Barras, em raiz e casca colo de *Syzygium aromaticum*.

Septoria sp.

Material examinado: BRASIL, BAHIA: Valença, Sítio Bahia, em casca do tronco de *Syzygium aromaticum*.

Trichoderma sp.

Material examinado: BRASIL, BAHIA: Presidente Tancredo Neves, Sítio Boa Fé, Sítio da Paz, em raiz de *Syzygium aromaticum*; Valença, Sítio Bahia, em tronco e raiz *Syzygium aromaticum*.

Trichoderma longibrachiatum Rifai (1969)

Material examinado: BRASIL, BAHIA: Presidente Tancredo Neves, Sítio Boa Fé, em raiz de *Syzygium aromaticum*.

Dessa forma é notório que tem sido encontradas muitas espécies de fungos associados ao craveiro-da-índia que podem ter papel ecológico importante no ecossistema. Novos testes poderão ser realizados em outros trabalhos de pesquisas futuras. Com os fungos não patogênicos ao craveiro-da-índia, futuramente poderão ser realizados experimentos em laboratório visando encontrar espécies antagônicas aos patógenos do craveiro, visando possível uso como agentes de controle biológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BROWER, J.E.; ZAR, J.H.; VON ENDE, C.A. **Field and laboratory methods for general ecology**. 4 ed. Boston: WCB McGraw-Hill, p.273, 1998.

CIAPRA BAIXO SUL. Disponível em: < <http://ciapra.ba.gov.br/o-ciapra> >
Acessado em: 24/05/2022.

DAJOZ, R. **Ecologia Geral**. Petrópolis: Ed. Vozes, p.472, 1983.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. **Focus 12**: p. 13-15, 1990.

FARR, D.F.; ROSSMAN, A.Y. FUNGAL DATABASES, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Disponível em: <<https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/Retrieved>> Acessado em: 14/12/2019.

GOOGLE IMAGENS. Disponível em:
<https://pt.slideshare.net/romeutemporal/bahia-politicas-pblicas-baixo-sul>. Acessado em: 13 de dezembro de 2019.

HIBBETT, D. S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J. F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P.; ERIKSSON, O.; HUHDORF, S.; JAMES, T.; KIRK, P. M.; LUCKING, R.; THORSTEN, H.; LUTZONI, F.; MATHENY, P.; MCLAUGHLIN, D.; POWELL, M.; REDHEAD, S.; SCHOCH, C. L.; SPATAFORA, J.; STALPERS, J.; VILGALYS, R.; AIME, M.; APTROOT, A.; BAUER, R.; BEGEROW, D.; BENNY, G.; CASTLEBURY, L.; CROUS, P.; DAI, Y-W.; GAMS, W.; GEISER, D.; GRIFFITH, G.; GUEIDAN, C.; HAWKSWORTH, D.; HESTMARK, G.; HOSAKA, K.; HUMBER, R.; HYDE, K.; IRONSIDE, J.; KO LJALG, U.; KURTZMAN, C.; LARSSON, K. H.; LICHTWARDT, R.; LONGCORE, J.; DLIKOWSKA, M.; MILLER, A.; MON-CALVO, J-M.; MOZLEYSTANDRIDGE, S.; OBERWINKLER, F.; PARMASTO, E.; REEB, V.; ROGERS, J.; ROUX, C.; RYVARDEN, L.; SAMPAIO, J. P.; SCHUBLER, A.; SUGIYAMA, J.; THORN, R.; TIBELL, L.; UNTEREINER, W.; WALKER, C.; WANG, Z.; WEIR, A.; WEISS, M. WHITE, M.; WINKA, K.; YAO, Y-J.; ZHANG, N. A Higher-level Phylogenetic Classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, p. 509-547, 2007.

KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; DAVID, J.C.; STALPERS, J.A. **Dictionary of the Fungi**. 11 ed. Wallingford: CABI Publishing. (eds.) 2008.

MAIA, L.C., CARVALHO JUNIOR, A.A. Introdução: os fungos do Brasil. In: FORZZA, R.C., org., *et al.* **Catálogo de plantas e fungos do Brasil** [online]. Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. p. 43-48. Vol. 1. ISBN 978-85-8874-242-0. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.

MENDES, M. A. S.; HURBEN, A. F.; **Fungos relatados em plantas no Brasil**. Laboratório de Quarentena Vegetal. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Disponível em: <<http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/fgbanco01.asp>> Acesso em: 13 de dezembro de 2019.

MICHEREFF, S. J. **Fundamentos de Fitopatologia**. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade, Laboratório de Doenças de Plantas. Recife - PE, 2001.

MULLER-DOMBOIS, D. Ecological measurements and microbial populations. In: D.T. Wicklow e G.C. Carroll (eds.). **The fungal community: its organization and role in the ecosystem**. New York: Marcel Derker, p. 173-184, 1981.

SILVEIRA NETO, N. S, NAKANO, O. BARBIN, D; VILLA NOVA, N. A. **Manual de Ecologia dos Insetos**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, p.419, 1976.

THOMAZINI, M. J.; A. P. B. W. THOMAZINI. Diversidade de abelhas (Hymenoptera: Apoidea) em inflorescências de *Piper hispidinervum* (C.D.C.). **Neotropical entomology**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 27-34, 2002.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Eds.) **PCR protocols: a guide to methods and applications**. Academic Press, San Diego, pp. 315–322, 1990.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho sobre a etiologia da morte de cravo-da-índia na região do Baixo Sul da Bahia, possibilitou diagnosticar as doenças de morte súbita e dieback, tendo como agentes causais *Cytospora eugeniae* e *Chrysosporthe cubensis*, respectivamente.

A elucidação das causas de doença e morte dos craveiros, pode fornecer uma base para o desenvolvimento de estratégias de manejo da doença, conseqüentemente, diminuir os prejuízos econômicos que os produtores de cravo-da-Índia vêm sofrendo.

Com a classificação dos fungos realizados nesta pesquisa, foi possível contribuir para o conhecimento dos fungos associados a *Syzygium aromaticum* na região do Baixo Sul da Bahia, Brasil. Destes, nove são novos registros para esta cultura, que poderão ser utilizados para experimentos, visando encontrar espécies antagonicas aos dois patógenos da morte súbita e dieback, apontando para um possível uso como agentes de controle biológico.