

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
TROPICAL**

**DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA DE POPULAÇÃO
ENTRE ISOLADOS DE *Corynespora cassiicola* NO ESTADO
DO AMAZONAS**

ANA FRANCISCA TIBÚRCIA AMORIM FERREIRA E FERREIRA

MANAUS, AM

2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
TROPICAL**

ANA FRANCISCA TIBÚRCIA AMORIM FERREIRA E FERREIRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA DE POPULAÇÃO
ENTRE ISOLADOS DE *Corynespora cassiicola* NO ESTADO
DO AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia Tropical, área de concentração em Fitossanidade.

Orientadora: Prof. Dra Jânia Lília da Silva Bentes

Co-Orientador: Gilvan Ferreira da Silva

MANAUS, AM

2014

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

F383d Ferreira, Ana Francisca Tibúrcia Amorim Ferreira e
DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA DE POPULAÇÃO
ENTRE ISOLADOS DE *Corynespora cassiicola* NO ESTADO DO
AMAZONAS / Ana Francisca Tibúrcia Amorim Ferreira e Ferreira.
2014
64 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Jânia Lília da Silva Bentes
Coorientadora: Gilvan da Silva Ferreira
Dissertação (Mestrado em Agronomia Tropical) - Universidade
Federal do Amazonas.

1. estrutura de população . 2. reprodução assexuada . 3.
ascomycota . 4. diversidade . 5. variabilidade. I. Bentes, Jânia Lília
da Silva II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

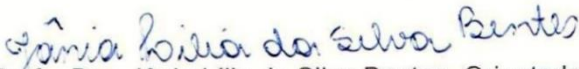
ANA FRANCISCA TIBÚRCIA AMORIM FERREIRA E FERREIRA

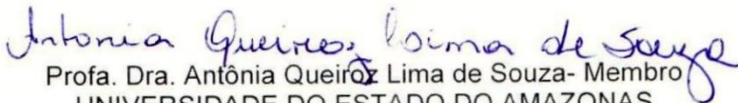
**DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA DE POPULAÇÃO
ENTRE ISOLADOS DE *Corynespora cassiicola* NO ESTADO
DO AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia Tropical, área de concentração em Produção Vegetal.

Aprovado em 28 de Fevereiro de 2014

BANCA EXAMINADORA


Profa. Dra. Jânia Lília da Silva Bentes- Orientadora
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS


Profa. Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza- Membro
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS


Prof. Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto- Membro
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

A Humberto (*in memorian*) e Graça, meus pais

Aos meus irmãos

A Ana Lima, minha avó

A todos os meus familiares e amigos

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me abençoado ao longo desta caminhada.

Aos meus pais Graça e Humberto, por todo o incentivo, apoio, compreensão e amor, e principalmente pelo exemplo de vida que me fez chegar até aqui.

A minha avó Ana Lima, por ser um exemplo de superação e por ter tido sempre o cuidado e amor de me colocar em suas orações.

A todos os meus familiares, em especial Conceição e Jackson, pela compreensão nos momentos de ausência em comemorações de família, pelo carinho e incentivo.

À Universidade Federal do Amazonas, em especial a Faculdade de Ciências Agrárias, onde obtive a minha formação como Engenheira Agrônoma.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical, pela oportunidade e apoio concedido durante a realização deste trabalho. Em especial ao Nascimento, por todo o suporte técnico-psicológico, pela sua competência, sempre disposto a ajudar e pela amizade compartilhada durante este período.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical, por todos os ensinamentos transmitidos durante esta jornada.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos durante o curso.

À Embrapa Amazônia Ocidental, em especial ao Laboratório de Biologia Molecular, pela ajuda na realização das análises moleculares.

À Universidade Federal de Viçosa (Laboratório de Biologia de Populações de Fitopatogenos), Eduardo Mizubuti, Braz, Thais e Sara, onde tive a oportunidade de obter novos conhecimentos, e também definir a linha de pesquisa em que quero trabalhar.

À eterna professora Jânia Lília da Silva Bentes, por ter me ajudado a dar meus primeiros passos na fitopatologia, pela orientação, pelo incentivo, muita paciência, pela dedicação, e pela amizade que construímos até aqui.

Ao meu Co-orientador Gilvan Ferreira, pelos muitos ensinamentos passados na área de biologia molecular, e na ajuda para execução deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia e fitopatologia/UFAM Liane, Bruno, Marcey, Amanda, pela amizade e convívio durante este tempo. E em especial a Franci Mary e Elisângela, pelo suporte na preservação dos isolados.

Aos meus amigos do Laboratório de Biologia Molecular/EMBRAPA Igor, Sandra, Andreia, Ariane, Camila, pela amizade, momentos de descontração e prazerosos do meio-dia. A Elisangela, pela amizade, carinho e dedicação, pelos sábados, domingos, feriados, dias santos e madrugada, que passávamos juntas analisando os dados, e principalmente por não deixar eu desistir no momento mais difícil desta jornada.

Ao Carlos Alberto (tirico) pela amizade construída durante a monografia, sendo consolidada durante o mestrado. Pela imensa ajuda nas coletas de campo para obtenção dos isolados.

Ao Jeferson Cruz (Jeff), amigo, a quem devo imensamente muito deste trabalho. Obrigada pela amizade, por todo o suporte e salvação dentro do laboratório.

A Lais Bentes, pela amizade desde a graduação, por ter ajudado bastante com a extração dos DNA's, por ter perdido muitos dias dentro do laboratório contribuindo com o meu trabalho.

A Anna Carolina, Rebeca, Flávia e Lays Helena, por toda a amizade, horas dedicadas a conselhos, sorrisos, coisas simples, mas que me ajudaram bastante durante este trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para execução deste trabalho.

RESUMO

O fungo ascomyceto *Corynespora cassiicola* é um fitopatógeno de ampla distribuição mundial, e já foi relatado causando doenças em folhas, frutos, ramos, ovos de nematóide, e inclusive na pele humana. No Brasil, *C. cassiicola* já causou sérios danos à soja, mamão e acerola, e na região norte do país, este patógeno tem grande importância nas culturas do mamão, pepino e tomate. Desenvolver estratégias de controle para uma doença, depende, entre outros fatores, de uma compreensão acerca da variabilidade e da estrutura genética de população do patógeno, sendo esses os objetivos desse trabalho. Foram coletados 169 isolados obtidos de mamão, tomate e pepino, oriundos dos municípios de Manaus, Iranduba e Presidente Figueiredo, do estado do Amazonas, Brasil, totalizando 9 populações. A diversidade genética de *C. cassiicola* foi analisada com 8 *primers* ISSR, obtendo 191 locus polimórficos, e o percentual de polimorfismo foi 100%. A diversidade gênica foi alta em todas as populações, onde o maior índice de diversidade gênica foi encontrado na população MA2 ($H=0,43$), e os menores em populações do município de Presidente Figueiredo: PE3 ($H=0,13$) e MA3 ($H=0,15$). Todos os genótipos tiveram frequências idênticas na população ($E_s= 1,0$). Diversidade genotípica (G_o) variou de 0.7 a 2.2, e em geral foi baixa em todas as populações, provando assim ausência de recombinação nas populações. Os testes de associação aleatória detectaram altos níveis de desequilíbrio de ligação, dispensando a hipótese nula ($I_A>0$), sendo significativo a 1% de probabilidade, os índices mais altos foram encontrados nas populações MA1 ($I_A= 6.08$) e MA2 ($I_A=5.24$). Pela análise bayesiana detectou-se 4 grupos genéticos com mistura de genótipos nos grupos 2 e 3, sugerindo fluxo gênico e com estruturação por hospedeiro no grupo 1(mamão) e 4(tomate). A população está estruturada, com grande diferenciação entre elas. Populações MA3 e TO1 apresentaram maior valor ($\theta= 0,27$), e o menor valor de foi encontrado em TO3;TO2 e PE3;PE2 ($\theta=0,05$). A análise da AMOVA mostrou que a maior variação está ocorrendo dentro das populações (84,3%), enquanto que 15.70% está ocorrendo entre as populações.

Palavras-chave: estrutura de população, reprodução assexuada, ascomycota, diversidade, variabilidade

ABSTRACT

The fungus *Corynespora cassiicola* is a plant pathogen that has worldwide distribution and has been reported causing disease on leaves, fruits, branches, nematode eggs, and even human skin. In Brazil, this pathogen has already caused serious damage to soybeans, papaya, acerola, and the northern region of the country, this pathogen has great importance in papaya, cucumber and tomato crops. Develop control strategies for a disease depends, among other factors, an understanding of the genetic variability and structure of the pathogen population, these being the goals of this work. We collected 169 isolates from papaya, tomato and cucumber, coming from the cities of Manaus, Iranduba and Presidente Figueiredo, Amazonas state, Brazil, 9 populations totaling. The genetic diversity was analyzed with 8 ISSR *primers*, 191 polymorphic locus getting, and the polymorphism rate was 100%. The genetic diversity was high in all populations, where the highest genetic diversity index was found in MA2 population ($M = 0.43$), and the smallest in population of Presidente Figueiredo: PE3 ($H = 0.13$) and MA3 ($H = 0.15$). All genotypes showed similar frequencies in the population ($E_s = 1.0$). Genotypic diversity (G_o) ranged from 0.7 to 2.2, and in general was low in all populations, thus proving the absence of recombination. Random association tests detected high levels of linkage disequilibrium, eliminating the null hypothesis ($I_A > 0$), being significant at 1% probability, the highest rates were found in MA1 populations ($I_A = 6.08$) and MA2 ($I_A = 5.24$). Bayesian analysis detected four genetic groups with mixture of genotypes in groups 2 and 3, suggesting gene flow and structure in a host in group 1 (papaya) and 4 (tomato). The population is structured with great distinction between them. MA3 and TO1 populations had higher ($\theta = 0.27$), and the lowest value was found in TO3; TO2 and PE3, PE2 ($\theta = 0.05$). Analysis of AMOVA, the biggest change is occurring within populations (84.3%), while 15.70% is occurring among populations.

Key words: structure population, asexual reproduction, Ascomycota, diversity, variability

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Atual distribuição mundial de *Corynespora cassiicola*. Foto: EOL, 2011.5
- Figura 2. Sintomas da mancha-alvo causada por *Corynespora cassiicola* em três hospedeiros. A- Tomate; B- Pepino; C-Mamão. Foto: FERREIRA, 2014.....9
- Figura 3. Gel de agarose a 1,2% com os produtos da amplificação obtidos por oito primers ISSR. A primeira faixa representa o marcador de 1 Kb DNA Ladder. As colunas de 1 a 20 representam os isolados de diferentes hospedeiros e regiões de *Corynespora cassiicola*. Amazonas, Brazil.....1
- Figura 4. Número de agrupamentos encontrados no DAPC para os 169 isolados de *Corynespora cassiicola* conforme o critério de inferência bayesiana (BIC). O menor valor de BIC representa o melhor número de grupos (K=4).8
- Figura 5. Gráfico de dispersão da análise discriminante de componentes principais (DAPC) com os 4 grupos genéticos de *Corynespora cassiicola*. Amazonas, Brasil....9

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de primers ISSR utilizados na análise da diversidade e estrutura genética de isolados de <i>Corynespora cassiicola</i>	25
Tabela 2. Número de loci e diversidade gênica por primer em cada população de <i>Corynespora cassiicola</i> . Amazonas, Brasil.....	3
Tabela 3. Índice de diversidade genética e desequilíbrio de ligação em nove populações de <i>Corynespora cassiicola</i> , Amazonas, Brasil.	5
Tabela 4. Medidas de diferenciação entre as populações de <i>Corynespora cassiicola</i> , Amazonas, Brasil.	6
Tabela 5. Análise da variância molecular entre e dentro das populações de <i>Corynespora cassiicola</i> , Amazonas, Brasil.....	7
Tabela 6. Medidas de diferenciação gênica entre os grupos de <i>Corynespora cassiicola</i> . Amazonas, Brasil.....	10

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo Geral	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1. O patógeno.....	4
3.1.1. Etiologia.....	6
3.1.2. Epidemiologia	7
3.1.3. Sintomatologia.....	9
3.1.4. Controle	10
3.2. Estrutura e diversidade genética	12
3.2.1. Marcadores ISSR (Inter simple sequence repeats)	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1. Obtenção dos isolados.....	17
4.1.1. Isolamento Indireto	18
4.1.2. Obtenção de culturas monoconidiais	18
4.2. Extração e quantificação do DNA fúngico	19
4.3. Análise da diversidade e estrutura genética por meio de marcadores ISSR	20
4.4. Análise dos dados.....	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
6. CONCLUSÕES	12
REFERENCIAS.....	13

1. INTRODUÇÃO

O fungo ascomiceto *Corynespora cassiicola* (Berk. e M.A. Curtis) C.T. Wei, é o agente causal da macha alvo, doença que afeta folhas, flores, frutos, raízes e ramos, conhecida por possuir uma ampla gama de hospedeiros, sendo relatada em mais de 530 espécies vegetais, como ornamentais, frutícolas, hortícolas (FARR et al., 2014), plantas daninhas (PEREIRA e BARRETO, 2000; SOUZA e SILVA, 2001; CUTRIM e SILVA, 2003) e também em plantas medicinais (YE et al., 2013; PARK et al., 2013). Este fitopatógeno tem extensa distribuição mundial (ELLIS e HOLLIDAY, 1971; SILVA et al., 2003), estando presente em países tropicais e subtropicais (KURT, 2005).

Por ser patógeno presente em quase todos os trópicos e por ter uma ampla gama de hospedeiros, *C. cassiicola* foi alvo de vários estudos que se concentraram principalmente em entender as relações existentes entre o patógeno e seus hospedeiros, no que diz respeito à origem, morfologia, diversidade genética, filogenia e também com a possível especialização da espécie (OLIVE et al., 1945; SPENCER e WALTERS, 1969; DUARTE et al., 1983; CUTRIM e SILVA 2003; PEREIRA et al., 2003; SILVA et al., 2003; DIXON et al., 2009; QI et al., 2011; SHIMOMOTO et al., 2011; MACEDO et al., 2013). Estes estudos conseguiram consolidar a hipótese de que *C. cassiicola* é uma espécie complexa, possuindo populações específicas do fungo.

Em relação aos estudos genéticos com a espécie, muitos autores verificaram que *C. cassiicola* possui alta diversidade genética dentro da espécie (SILVA et al., 1998; SAHA et al., 2000; SILVA et al., 2003; DIXON et al., 2009; QI et al., 2011). A resposta a essa alta diversidade genética dentro da espécie, pode estar relacionada,

entre outros fatores, com o modo reprodutivo da espécie, visto que a maioria dos fungos que possuem modo reprodutivo apenas assexuado, não sofrem recombinações regulares, e a variação genética resulta principalmente da acumulação de mutações espontâneas em linhagens clonais (TAYLOR et al., 1999; LEE et al., 2004; DIXON et al., 2009). Para inferir mais sobre este assunto, é necessário conhecer a estrutura genética da população do patógeno, pois a partir deste conhecimento podemos inferir sobre a história de vida e os processos evolutivos que moldam essas populações nos diferentes agroecossistemas (McDONALD e LINDE, 2002), assim também como investigar os mecanismos que influenciam eventual processo de especiação (GREENBERG et al., 2003; CRISCIONE et al., 2005; KOHN, 2005).

Atualmente, não existem trabalhos envolvendo a estrutura genética de *C. cassiicola*, e os trabalhos referentes à diversidade genética, em sua maioria foram limitados à cultura da seringueira (*Hevea brasiliensis*), com isolados obtidos do continente Asiático e Africano, e baseados na técnica envolvendo o marcador molecular RAPD, que é uma técnica considerada problemática no que diz respeito à reprodutibilidade, para mensurar tanto a diversidade genética quanto a estrutura de genética em fungos (XU, 2006; BENALI et al., 2011).

Diante disso, o presente trabalho propôs avaliar a diversidade e a estrutura genética de isolados de *C. cassiicola*, obtidos de três hospedeiros e oriundos de três municípios do Estado do Amazonas, utilizando marcadores ISSR.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Analisar a diversidade e estrutura genética de isolados de *Corynespora cassiicola*.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar a diversidade genética de isolados de *C. cassiicola* obtidos de três hospedeiros (mamão, pepino e tomate), oriundos dos Municípios de Iranduba, Manaus e Presidente Figueiredo por meio do marcador ISSR;
- Determinar a estrutura genética de *C. cassiicola*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. O patógeno

O agente etiológico da mancha-alvo é o fungo *Corynespora cassiicola* (Berk. e M.A. Curtis) C.T. Wei, que apresenta extensa distribuição em países tropicais e subtropicais (Figura 1) (ELLIS e HOLLIDAY, 1971; SILVA et al., 2003; KURT, 2005) atacando uma ampla gama de plantas hospedeiras (BLAZQUEZ, 1993) como a soja (YORINORI e HOMECHIN, 1977), cacauzeiro (DUARTE et al., 1978), mamoeiro (DUARTE et al., 1983), seringueira (GASPAROTTO et al., 1988), tomate (LEROY e LOURD, 1989), algodão (LAKSHMANAN et al., 1990), gergelim (WULFF e PASCHOLATI, 1997), acerola (SILVA et al., 1997), hortênsia (LEITE e BARRETO, 1997), pimenta-longa (POLTRONIERI et al., 1997), pepino (VERZIGNASSI et al., 2003), falso-boldo (FERNANDES e BARRETO, 2003), e o alface (SANTOS et al., 2007), pimentão (SHIMOMOTO et al., 2008), café (SOUZA et al., 2009) entre outros.

A cultura mais afetada atualmente no mundo por *C. cassiicola* é a seringueira. O primeiro relato nesta cultura foi em Serra Leoa em 1936 (DEIGHTON, 1936), seguido da Índia em 1958 (RAMAKRISHNAN e PILLAY, 1961), Malásia em 1960 (NEWSAM, 1962), Nigéria em 1969 (AWODERU, 1969), Indonésia em 1980 (TEOH, 1983), Brasil (JUNQUEIRA et al., 1985), Sri Lanka e Camarões (LIYANAGE et al., 1986), Tailândia em 1985 (PONGTHEP, 1987), Bangladesh (RAHMAN, 1988), Vietnã em 1998 (DUNG e HOAN, 1999) e recentemente China em 2006 (JINJI et al., 2007). Em 1985, *C. cassiicola* praticamente eliminou o maior clone rendimento da indústria da borracha, devastando mais de 3.000 hectares do clone RRIC 103 (SILVA et al., 1998). No Brasil, este patógeno já foi relatado causando grandes prejuízos em culturas de grande expressão econômica, como soja (YORINORI e

HOMECHIN, 1977), cacau (DUARTE et al., 1978), seringueira (GASPAROTTO et al., 1988) e acerola (SILVA et al., 1997).

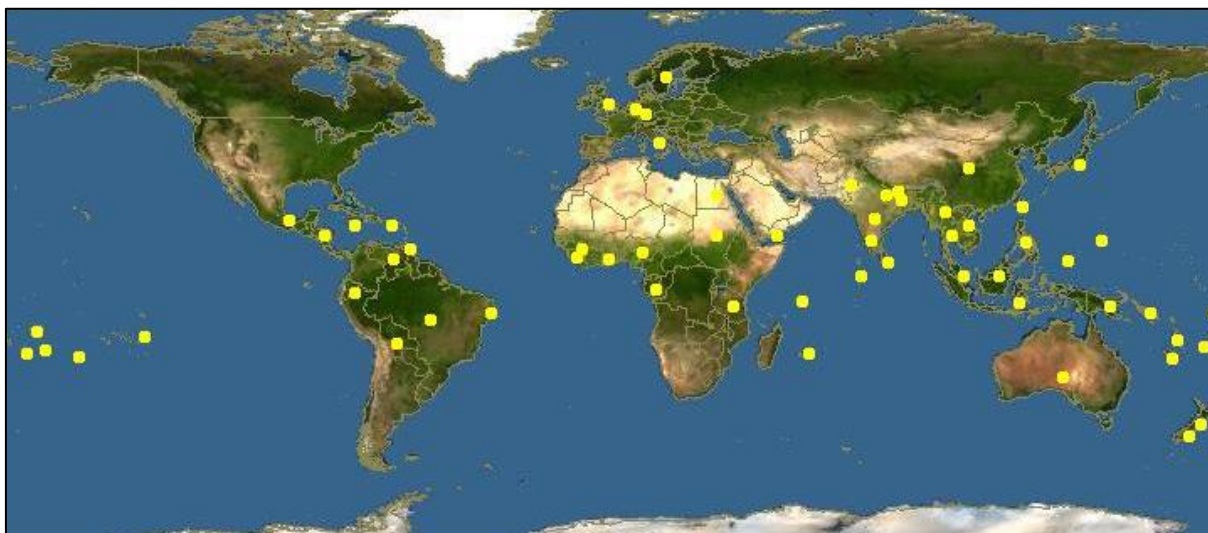


Figura 1. Atual distribuição mundial de *Corynespora cassiicola*. Foto: EOL, 2011.

Na região Norte a mancha alvo está entre as doenças mais importantes que atacam a parte aérea do tomateiro (LOPES et al., 2005). Devido ao clima normalmente muito quente e úmido nesta região, a doença vem causando surtos severos nas lavouras, e as cultivares se tornam muito suscetíveis quando medidas de controle não são aplicadas corretamente. Em outras partes do país tem sido relatadas epidemias de mancha alvo ocasionando perdas expressivas no cultivo do mamão em campo e do tomate e pepino em ambiente protegido. Nestas epidemias, o patógeno tem atacado preferencialmente os frutos, depreciando-os para o comércio, levando os produtores a grandes prejuízos na ausência de controle preventivo (VERZIGNASSI et al., 2003; REIS e BOITEUX, 2007).

3.1.1. Etiologia

Corynespora cassicola foi primeiramente classificado como *Cercospora melonis* Cooke, *C. vignicola* Kawamura, *Helminthosporium vignae* Olive, e *H. vignicola* (Kawamura) Olive (SNOW e BERGGREN JR., 1989), podendo ser encontrado com outras sinonímias (WEI, 1950; ELLIS, 1971). A etiologia do gênero vem do latim, onde *coryne* significa massa clava e *spora* significa esporo, ou seja, esporo clavado. Já a espécie, refere-se à planta do gênero *Cassia* sp., na qual o patógeno foi isolado pela primeira vez, e a terminação *icola* significa viver ou se desenvolver (VIÉGAS, 1979; ULLOA e HANLIN, 2000).

Atualmente, *C. cassicola* está posicionado dentro Reino Fungi, filo Ascomycota, classe Dothideomycetes, ordem Pleosporales e gênero *Corynespora* (AGRIOS, 2005). A fase teleomórfica da espécie ainda não foi descrita, embora já tenham descoberto esta fase para o gênero *Corynespora*, sendo então representada pela espécie *Pleomassaria swidae* (TANAKA et al., 2005). Quanto à família, este fungo vem sofrendo algumas modificações ao longo dos anos. Em estudos iniciais, *C. cassicola* foi classificado dentro da família Dematiaceae (BARNET e HUNTER, 1998), porém estudos filogenéticos envolvendo os genes nucSSU, nucLSU rDNA, TEF1, RPB1 e RPB2 dentro da classe Dothideomycetes, revelaram que espécies atualmente classificadas dentro do gênero *Corynespora*, incluindo *C. cassicola*, não são monofiléticas, sendo posicionadas na família Massarinaceae e dentro de um Clado genético k (SCHOCH et al., 2009).

De acordo com a primeira descrição da espécie por Ellis e Holliday (1971), *C. cassicola* apresenta conidióforos de coloração marrom-clara ou escura, com comprimento variando de 110 a 850 µm e largura de 4-11 µm. Estes por sua vez podem ser simples, individuais e livres conforme as características descritas da

subclasse Hyphomycetidae (KRUGNER e BACCHI, 1995). Os conídios que são os esporos assexuados do fungo são de coloração hialina, suab-hialina ou marrom clara, com um hilo pronunciado na base (PERNEZNY e SIMONE, 1993). Os mesmos podem estar isolados ou em cadeia, retos ou levemente curvos. Apresentam de três a 20 pseudoseptos, que medem 39 -520 x 7- 22 mm (ELLIS, 1971; SNOW e BERGGREN JR., 1989). A presença de clamidósporos também foi observada para a espécie, em geral são de coloração hialina, com comprimento de 13.86-15 µm e largura de 13.12- 14.38 µm (DEMIDOVA, 1962; SARMA e NAYUDU, 1971; HARTMAN et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2012).

De modo geral, o crescimento e a esporulação de *C. cassiicola* apresentam exigências diferentes em relação ao meio de cultura. Alguns trabalhos demonstraram que máximo do crescimento micelial ocorre em meios de cultura como CA (cenoura-ágar), V8, Alimento Infantil, extrato de soja e em meio BDA (batata-dextrose-ágar). Já em relação à esporulação, os meios mais indicados são BDA, BSA (batata-sacarose-ágar), V8, alimento infantil e Czapeck-ágar (OLIVE et al., 1945; ALMEIDA E YAMASHITA, 1976; SILVA et al., 1995; ROIM, 2001; SOUZA e BENTES, 2014).

3.1.2. Epidemiologia

C. cassiicola é um patógeno necrotrófico, podendo sobreviver em restos culturais por longos períodos (PERNEZNY e SIMONE, 1993; CARDOSO et al., 2001) em hospedeiros alternativos (PEREIRA e BARRETO, 2001; SOUZA e SILVA, 2001; CUTRIM e SILVA, 2003;) e em sementes (ROIM, 2001). A forma endofítica e saprofítica da espécie já foram descritas em alguns hospedeiros (KINGSLAND, 1986; COLLADO et al., 1999; HYDE et al., 2001; PHOTITA et al., 2003;

SURYANARAYANAN et al., 2002; LEE et al., 2004; GOND et al., 2007 PROMPUTTHA et al., 2007; DÉON et al., 2012; EBRAHIM et al., 2012).

A disseminação do patógeno ocorre principalmente por gotas de chuva e através do vento (ALMEIDA et al., 2005), sendo este último o responsável pela disseminação do patógeno a curtas distâncias. (PERNEZNY e SIMONE, 1993), Já a longas distâncias, a disseminação ocorre preferencialmente via sementes (BLAZQUEZ, 1993).

A fase necrotrófica do fungo tem início após os esporos atingirem à superfície da planta hospedeira, uma vez aderidos à superfície da planta hospedeira e sob condições de molhamento foliar, estes esporos germinarão, e através do apressório irão lançar seu tubo germinativo, começando assim a relação parasitaria patógeno-hospedeiro. Por ser um patógeno necrotrófico, *C. cassicola* precisa inicialmente matar as células do hospedeiro para poder retirar seus nutrientes. Para isso, o fungo libera sob a planta uma série de toxinas, uma delas é a *cassicolina*, que é uma toxina seletiva do hospedeiro, considerada como um agente primário de infecção, sendo indispensável ao estabelecimento inicial do fungo (BRETON et al., 2000; BARTHE et al., 2007). Esta toxina ao atingir a epiderme da planta, causa a morte celular, e a partir deste momento o fungo inicia sua fase saprofítica, retirando nutrientes das células mortas e em seguida, começa a se reproduzir dando início a um novo ciclo da doença (FORCELINI, 2010).

As grandes epidemias da macha alvo são geralmente desencadeadas em ambientes que apresentam temperaturas elevadas, variando de 20°C a 32°C, e longos períodos de alta umidade relativa de aproximadamente 16 a 44 horas. Estas faixas são consideradas ótimas ao desenvolvimento do patógeno (BLAZQUEZ, 1993).

3.1.3. Sintomatologia

Os sintomas da mancha alvo variam de acordo com o hospedeiro, condições climáticas e do órgão da planta infectado (Figura 2), mas, em geral eles são expressos através de manchas foliares na forma de anéis concêntricos, mais escuros no centro e com halos amarelos, que lembram o formato de um alvo. Em virtude destas características, foi atribuído o nome da doença (SNOW e BERGGREN JR., 1989).

Em mamão a infecção ocorre principalmente na fase abaxial (OLUMA e AMUTA, 1999), e as lesões são geralmente pequenas, medindo de 2 a 3 mm, circulares, brancas e circundadas por um halo amarelado. No pecíolo, caule e frutos, as lesões são de coloração marrom-avermelhadas, com centro escuro, com formato elíptico, medindo de 3 a 5 mm de comprimento, com largura constante de 2 mm (OLIVEIRA e SANTOS FILHO, 2006).



Figura 2. Sintomas da mancha-alvo causada por *Corynespora cassiicola* em três hospedeiros. A- Tomate; B- Pepino; C-Mamão. Foto: FERREIRA, 2014.

Em tomateiro, as lesões foliares têm início com pequenas manchas aquosas na superfície da folha. Estas aumentam gradualmente em tamanho, e se tornam circulares com coloração marrom clara, circundadas por halos amarelos (BLAZQUEZ, 1993). Em ramos e pecíolos os sintomas são caracterizados por manchas marrons e alongadas. Nos frutos jovens e maduros, os sintomas iniciais são representados por

pontuações marrom-escuras e circulares. Estas ao aumentarem em tamanho tornam-se marrons com um centro mais claro, que pode rachar formando uma espécie de “cratera” nos frutos (REIS e BOITEUX, 2007). Os ataques sobre frutos traduzem-se por uma alteração da qualidade do produto comercial, além de uma redução de produtividade.

Segundo Verzignassi et al. (2003), em pepino os sintomas surgem a partir do transplântio, sendo caracterizados pelo aparecimento de pequenas manchas angulares, com o centro de cor palha com halo claro, que vão se expandindo admitindo um formato arredondado, com centro marrom claro e bordos encharcados de coloração olivácea. Em casos de alta severidade da doença, ocorre o coalescimento das manchas provocando a seca do limbo foliar.

3.1.4. Controle

O controle genético da doença pode ser feito através de cultivares resistentes e/ou tolerantes, as quais já foram desenvolvidas para alguns patossistemas. Na cultura do pepino, o uso de plantas resistentes para controlar a mancha-alvo tem sido uma prática de controle na Europa há mais de 15 anos. A resistência de plantas a este patógeno também foi documentada na cultura da soja, e algumas fontes de resistência já foram identificadas para o tomate (PERNEZNY e SIMONE, 1993). A soja possui 325 cultivares registradas, porém a reação à mancha-alvo é conhecida apenas para 97 cultivares. Destas 3,7% são resistentes e 12% são consideradas moderadamente resistentes.

O controle com uso de fungicidas específicos ou a mistura entre eles tem apresentado bons resultados no controle da doença (JONES, 1978; CASTRO, 1979; KINGSLAND e SITTERLY, 1986; ARIAS et al., 1987; GASPAROTTO et al., 1988; GONZÁLEZ, 1990; CARDOSO et al., 2001; VENTURA et al., 2003).

Estudando o controle da mancha alvo em tomateiro, Kingsland e Sitterly (1986), observaram que o fungicida captafol isoladamente ou em combinação com oxiclureto de cobre, e zineb, tiveram bom efeito no controle da doença. Jones e Jones (1984) com o mesmo patossistema, observaram que o uso do clorotalonil em combinações de mancozeb e outros compostos cúpricos, conseguiram controlar a doença. Pernezny et al. (2002), no Estado da Flórida, obteve um bom resultado no controle da doença utilizando Acibenzolar-S-Metil, que é um indutor de resistência adquirida. Neste trabalho, este composto reduziu a desfolha das plantas de tomate em 42%. Em mamão, a utilização de fungicidas do grupo de ditiocarbamatos e de fitalonitrilas, têm apresentado eficiência no controle da doença (VENTURA et al., 2003).

No país, o controle da doença em tomateiro é feito com a maioria dos fungicidas utilizados para o controle da pinta-preta com registro no Ministério da Agricultura (BLAZQUEZ, 1993; LOPES et al., 2005). Práticas culturais como rotação de cultura, destruição de lavouras velhas, eliminação de folhas com alto grau de senescência altamente infectadas podem auxiliar positivamente no controle da doença (REIS e BOITEUX, 2007).

Na região Norte do país, o controle da mancha alvo é o principal gargalo que limita a produção de várias solanáceas, cucurbitáceas e espécies frutíferas hospedeiras do patógeno. A ausência de produtos químicos eficientes registrados para cada patossistema, juntamente com pesquisas sobre o patógeno nas condições ambientais locais, faz com que haja poucas ou inexistentes estratégias de manejo da doença na região (REIS e MADEIRA, 2009).

3.2. Estrutura e diversidade genética

A estrutura genética de população é definida como a quantidade e distribuição da variação genética dentro e entre populações, este atributo é determinado pela história evolutiva e pelo potencial de alteração dos organismos de uma população, sendo um resultado da interação entre os processos evolucionários como mutação, migração, seleção, deriva e recombinação (McDONALD, 1997; McDONALD e LINDE, 2002).

A mutação é uma alteração na sequência de nucleotídeos e é um dos principais fatores evolutivos que influenciam uma população. Dentro da população a mutação atua introduzindo novos alelos em linhagens clonais. A mutação em uma população é influenciada diretamente pelo tamanho, visto que populações que apresentam tamanho grande tendem a ter um maior número de indivíduos mutantes em relação a populações pequenas (McDONALD e LINDE, 2002).

A recombinação assim como a mutação é uma das principais fontes de variação genética em fungos. A recombinação tem por função reordenar as sequências do genoma aleatoriamente, podendo ocorrer através da reprodução sexual ou por hibridização somática, sendo que neste ultimo exemplo pode ocorrer concomitantemente fusão e recombinação (ciclo parassexual) (BURDON e SILK, 1997). Esses mecanismos tem a capacidade de aumentar a diversidade genotípica em populações do patógeno, mas sua importância varia dentro e entre as espécies. A recombinação do ponto de vista evolutivo é importante, pois pode gerar novos genótipos que permitam melhor adaptação às mudanças no ambiente, resistência a fungicidas ou a cultivares (MILGROOM, 1996).

A migração é o movimento de indivíduos entre populações e sub-populações. A semelhança de alelos em populações separadas geograficamente evidencia a

presença de fluxo gênico entre as populações, e as populações podem divergir entre si por deriva genética ou por seleção. No caso de populações em que o modo reprodutivo é em sua maioria assexuado, observa-se que genótipos inteiros podem ser trocados entre as populações, visto que esses organismos raramente há recombinação de genes. Populações com alto nível de fluxo gênico geralmente apresentam muita diversidade genética (BOEGER et al., 1993; McDONALD e LINDE, 2002).

A seleção conforme citado por McDonald e Linde (2002) é um processo direcional que leva a um aumento ou uma diminuição na frequência de genes ou genótipos, ou seja, atua selecionando genes ou genótipos que tenham vantagens adaptativas para a população. Este processo não é capaz de gerar variabilidade na população, porém pode estar atuando no aumento da variação genética, através da seleção de um gene ou na combinação de vários, ou pode atuar também na especiação através da acumulação de diferenças genéticas adaptativas entre as populações isoladas, e também impedir tal especiação, homogeneizando a estrutura genética da população em todos os locais (ZHAN et al., 2002).

A deriva genética pode ser definida como mudança nos alelos aleatoriamente dentro da população, podendo ocorrer com ou sem ação do processo de seleção. Dentro da deriva genética temos dois fatores atuando o efeito gargalo e o fundador. O primeiro corresponde à redução no tamanho da população aleatoriamente, devido a alguma condição desfavorável, e o segundo é quando uma população pequena é formada de forma aleatória, e coloniza uma nova população. A frequência de alelos na população sobrevivente (efeito gargalo) ou da nova população (efeito fundador) pode diferir significativamente da frequência dos alelos na população original (McDONALD e McDERMOTT, 1993; McDONALD e LINDE, 2002).

Em linhas gerais, o conhecimento da acerca da diversidade genética é considerada vantajosa para a sobrevivência de uma espécie, por contribuir para a diversidade fenotípica e também por determinar a forma como indivíduos da espécie interagem com o ambiente e com outros organismos (PESSOA FILHO, 2008). Essencialmente existem tipos de diversidade contribuindo para a estrutura genética: gênica e genotípica. A Diversidade gênica refere-se ao número e as frequências de alelos em loci individuais numa população, que aumenta à medida que o número de alelos aumenta as frequências relativas dos alelos mais semelhantes (McDONALD e LINDE, 2002). Diversidade genotípica refere-se ao número e frequências dos genótipos multilocos, ou indivíduos geneticamente distintos numa população (ANDERSON e KOHN, 1995; TAYLOR et al., 1999; McDONALD e LINDE, 2002; HALKETT et al., 2005). Entendendo a diversidade e a estrutura genética do patógeno, podemos inferir sobre o seu potencial de risco no ambiente e também aplicar medidas de controle.

3.2.1. Marcadores ISSR (*Inter simple sequence repeats*)

Os estudos que abrangem a diversidade e estrutura genética em fungos tem usado com frequência a biologia molecular como ferramenta, principalmente os marcadores moleculares que são baseados nas reações de PCR. Dentre eles destaca-se o marcador ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*). Este marcador é considerado eficiente para diversos estudos, como por exemplo, em estudos de hibridação e especiação híbrida (WOLFE e LISTON, 1998; ARCHIBALD et al., 2004), genética de populações e conservação (CULLEY e WOLFE, 2001) investigações sistemáticas em populações naturais (CRAWFORD et al., 2001;

WOLFE e RANDLE, 2001) e em estudos populacionais de fungos (KERRIGAN et al., 2003; SAWYER et al., 2003).

A técnica é baseada em PCR e envolve a amplificações de segmentos de DNA presente numa região de distância amplificável entre duas regiões repetidas de microssatélites idênticas orientadas em direções opostas. Os fragmentos amplificáveis são geralmente de 200-2000 pb de comprimento, e apresentam alta reprodutibilidade possivelmente devido ao uso de *primers* longos na qual permite um subsequente uso de alta temperatura de anelamento. As amplificações não requerem informação previa da seqüência do genoma e conduz a multilocos e altos padrões polimórficos (BORNET e BRANCHARD, 2001; REDDY et al., 2002). As bandas visíveis são definidas como marcadores dominantes, e são atribuídos a *loci* genéticos com dois alelos: 1 considerado a presença e 0 a ausência (TSUMURA et al., 1996).

Marcadores ISSR e caracteres morfológicos foram usados por Nghia et al. (2008), para diferenciar 21 isolados de *C. cassiicola* obtidos de diferentes clones de seringueira em plantios da Malásia. Neste estudo verificaram que os caracteres morfológicos foram insuficientes para diferenciar os isolados, e que com auxilio de 8 primers ISSR foram obteve-se um total de 91,5% de bandas polimórficas, o que reflete o nível elevado de variação genética existente entre os diferentes isolados. Além disso, foi observado a existência de pelo menos 2 grupos distintos de *C. cassiicola* infectando plantações de seringueira na Malásia.

Qi et al. (2011), utilizaram 22 isolados de *C. cassiicola* obtidos de pepino, mamão, berinjela, tomate, feijão-caupi, gergelim e seringueira, oriundos da China, para avaliar diferenças em características morfológicas e a variabilidade genética através do rDNA-ITS e de marcadores ISSR. Um total de 114 fragmentos de DNA

foram amplificados com os 16 *primers* ISSR, dos quais 102 eram polimórficos (89,5%). Os 22 isolados foram agrupados em três grupos genéticos distintos, mostrando a alta diversidade genética entre os isolados testados, indicando também que esses marcadores são úteis para o estudo da população intra-espécies em *C. cassiicola*.

A alta variabilidade genética de *C. cassiicola* através do rDNA-ITS e de marcadores ISSR foram confirmadas por (QI et al., 2011), com 22 isolados de *C. cassiicola* obtidos de pepino, mamão, berinjela, tomate, feijão-caupi, gergelim e seringueira, oriundos da China, onde 114 fragmentos de DNA foram amplificados pelos *primers* ISSR, destes, 102 tiveram 89,5% de polimorfismo.

Estudos com *C. cassiicola* em relação a estrutura genética são inexistentes e quanto à diversidade genética, foram feitos em sua maioria com marcadores RAPD e limitados à isolados da seringueira (*Hevea brasiliensis*) obtidos do continente Asiático e Africano, o que abre caminho para que sejam feitos novos trabalhos com marcadores ISSR, e que possibilitem verificar esses estes parâmetros em diferentes locais de amostragem e também em diferentes hospedeiros.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção dos isolados

Os isolados utilizados neste trabalho foram obtidos a partir de folhas e frutos de plantas de tomate, pepino e mamão com sintomas típicos da mancha-alvo. As coletas foram realizadas em áreas de produção comercial e em cultivo protegido durante o período de agosto a novembro de 2012, em três municípios do Estado do Amazonas (Manaus, Presidente Figueiredo e Iranduba), que foram escolhidos por serem os mais importantes produtores de hortaliças no Estado (REIS e MADEIRA, 2009). Em cada município foram coletados aproximadamente 20 isolados de cada hospedeiro, obedecendo a uma distância mínima entre eles. Os isolados coletados foram georeferenciados utilizando GPS (Garmin GPSmap 60CSx, Kansas, USA) para a análise de autocorrelação espacial através do programa R (R Core Team, 2014). Ao final, obteve-se 9 populações com os 169 isolados de *C. cassicola* (3 hospedeiros e 3 municípios) que estão organizados na Tabela 1. E a identificação de cada isolado bem como procedência está apresentado em anexo.

Tabela 1. Identificação das populações de *Corynespora cassicola* coletadas no Amazonas.

Local	Hospedeiro	Populações	Nº de isolados	Ano da coleta
Manaus	Tomate	TO1	21	2012
	Pepino	PE1	22	2012
	Mamão	MA1	18	2012
Iranduba	Tomate	TO2	21	2013
	Pepino	PE2	18	2013
	Mamão	MA2	25	2012
Presidente Figueiredo	Tomate	TO3	7	2012
	Pepino	PE3	18	2012
	Mamão	MA3	19	2013

Isolamento Indireto

As amostras coletadas foram levadas ao Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da Universidade Federal Amazonas, onde foi confirmada a etiologia da doença por meio da observação das estruturas do patógeno em microscópio estereoscópio. Após confirmar a presença de *C. cassicola*, as partes vegetais coletadas foram lavadas em água corrente, visando reduzir a presença de microrganismos saprofíticos. De cada parte vegetal selecionada foi retirado um pequeno fragmento da região limítrofe entre a área lesionada e a área sadia de aproximadamente 5 mm, os quais foram submetidos à desinfestação superficial em álcool 70% (30 segundos), hipoclorito de sódio 2% (30 segundos), seguidos de tríplex lavagem em água destilada. Em seguida, os fragmentos desinfestados foram depositados equidistantemente em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (200 g de batata; 20 g de Dextrose; 17g de Ágar; 1000 mL de água destilada), e posteriormente incubadas em câmaras de crescimento do tipo BOD a 27 e 28 °C com fotoperíodo de 12 horas durante 24-48 horas, até o surgimento de estruturas do fungo (DHINGRA e SINCLAIR, 1985). Após este período, as hifas crescidas a partir dos fragmentos foram repicadas para novas placas contendo o mesmo meio de cultura utilizado anteriormente para individualização das colônias. A preservação dos isolados foi feita utilizando o método Castelani, óleo mineral e glicerina 2%, em microtubos de plástico de 1,5 mL, onde para cada isolado foi feito duplicata.

4.1.2. Obtenção de culturas monoconidiais

A obtenção de culturas monoconidiais foi realizada adicionando-se em cada placa de Petri contendo colônias do fungo 10 mL de água destilada esterilizada. Em seguida, com auxílio de um pincel de cerdas macias foi feita a remoção dos propágulos do fungo, e o sobrenadante foi coletado em um béquer. Desta

suspensão, foram retirados 100 µL e adicionados em microtubos contendo 900 µL de água destilada esterilizada, os quais foram submetidos a diluições fracionadas até a concentração 10^{-3} , onde foi retirado uma alíquota de 100 µL, e distribuído uniformemente em placas de Petri contendo o meio BDA, e espalhadas com o auxílio de uma alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a 27 °C durante 24 horas. Após este período, as placas foram observadas sob lupa para a repicagem dos fragmentos de hifa originados a partir de um único conídio para novas placas.

4.2.Extração e quantificação do DNA fúngico

Para obtenção do DNA fúngico, pequenos fragmentos de culturas monoconidiais (item 4.1.2) foram depositados em meio líquido BD (batata-dextrose) em Erlenmeyers de 250 mL, onde permaneceram sob agitação moderada (150 rpm) contínua durante cinco dias em temperatura ambiente. O micélio produzido foi coletado por filtração em papel de filtro esterilizado, em ambiente asséptico (câmara de fluxo laminar), e em seguida, armazenados a temperatura -20 °C até o momento da extração.

O DNA foi extraído de acordo com o protocolo de rotina do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental, baseado no protocolo de Doyle e Doyle (1987). Amostras de aproximadamente 3 g de micélio foram maceradas com nitrogênio líquido até a completa homogeneização do material. Em seguida o macerado foi transferido para tubos de 15 mL, nos quais foram adicionados 7 µL do tampão de extração CTAB (2 g de CTAB-cetyl trimethyl ammonium bromide, 8,18 g NaCl, 0,74 g EDTA, 1,5 g Tris- HCL, 100 mL de água destilada, pH 8,0) e 2 µL/mL de 2-β-mercaptoetanol. Após a homogeneização, o material foi incubado em banho-maria a 65 °C durante 30 minutos, sendo agitado a cada 10 minutos. Após este

período, adicionou-se 7 mL de CIA (24 partes de clorofórmio e uma parte de álcool isoamílico), e os tubos foram homogeneizados e centrifugados a velocidade de 14.000 rpm por 10 minutos. Após este período, os tubos foram retirados cuidadosamente a fim de não perturbar a interface, e o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo de 15 mL, onde foi adicionado isopropanol resfriado na mesma quantidade. Para haver a precipitação do ácido nucléico, os tubos foram colocados a temperatura de -20 °C por duas horas, e após este período foram novamente centrifugados a 14000 rpm por sete minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado duas vezes com etanol na concentração 70% por três minutos, e por último lavado com álcool absoluto. Após esta última lavagem, os tubos foram postos a secar em temperatura ambiente, e o precipitado foi ressuspendido em 300 mL TE (Tris 10 mM e EDTA 5 mM pH 8,0). O produto final foi mantido a -20 °C para uso nas reações de PCR.

A quantificação foi mensurada em espectrofotômetro NanoDrop® 2000 Thermo Scientific, e também em eletroforese em gel de agarose (0,8%) corados com brometo de etídio, e utilizando o marcador lambda (λ). A visualização dos fragmentos amplificados foi feita em transiluminador de luz ultravioleta da marca Loccus Biotecnologia.

4.3. Análise da diversidade e estrutura genética por meio de marcadores ISSR

Para selecionar quais *primers* seriam usados em estudo, inicialmente foi realizada uma triagem com 30 *primers* ISSR, destes foram selecionados oito *primers* que apresentaram maior polimorfismo (Tabela 2), um *primer* obtido de regiões microsatélites de *Ganoderma* spp. (NGHIA et al., 2008) e os demais UBC (UBC *primer* set No. 9, Biotechnology Laboratory, University of British Columbia,

Vancouver, Canada, <http://www.ubc.ca/>) (QI et al., 2011). A amplificação foi feita para um volume final de 15 μ L, com 1X do Tampão da Taq DNA polimerase KAPA Biosystems, 0,2 mM $MgCl_2$, 0,25 mM de dNTPs, 0,4 μ M de *primer*, 1U de Taq DNA polimerase KAPA Biosystems. As condições para amplificação foram desnaturação inicial a 94 °C/3 min, seguido de 40 ciclos de 94 °C/30 s, temperatura de anelamento variou de acordo com cada *primer*, 72°C /1 s, e extensão final de 72 °C/10 min. O tamanho relativo dos fragmentos foi avaliado com o auxílio do marcador 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen by Life Technologies). Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1,2% e corados com brometo de etídio, e o gel foi analisado em transiluminador com luz ultravioleta (Loccus Biotecnologia®).

4.4. Análise dos dados

As bandas geradas pela amplificação com os oito *primers* ISSR foram analisadas por meio de contagem visual, e os fragmentos de DNA amplificados foram transformados em uma matriz de caráter binário atribuindo 1 para presença de banda e 0 para ausência. Através dessa matriz binária foram feitas as demais análises.

A estrutura genética da população foi inferida através da Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC) (JOMBART et al. 2010) pelo pacote *adegenet* (v. 1.3-0) implementado pelo programa R versão 3.1.2 (R Core Team, 2014). O método multivariado DAPC permite identificar agrupamentos de indivíduos geneticamente relacionados independente de modelos de genética de populações. O número de agrupamentos (K) variou de 1 a 10 e o número de agrupamentos, que é o melhor valor de K foi determinado de acordo com o Critério de Informação Bayesiana (BIC).

A diversidade genotípica foi feita conforme o índice G de Stoddart e Taylor (1998) para cada local de amostragem, com *bootstrap* com 1000 permutações utilizando o programa R versão 3.1.2 através do pacote *vegan* e *vegetarian* (R Core Team, 2014). Foram também calculados os índices de riqueza genotípica $E(gn)$, utilizando curvas de rarefação (GRÜNWARD et al. 2003) para diminuir as diferenças no tamanho das populações, e a equitabilidade entre as populações através do índice E_5 ($E_5 = G-1/N1-1$) (ZHAN et al. 2002). A diversidade genética de Nei (H_E) (NEI, 1978) para cada subpopulação foi inferida através do programa GENEPOP versão 4.2.2 (ROUSSET, 2008) com 1.000 permutações.

Para detectar se há associação não aleatória de alelos em diferentes *loci*, foi realizado o teste de desequilíbrio de ligação através do programa Multilocus 2.3 (AGAPOW e BURT, 2003) com *bootstrap* de 1000 permutações, e foram avaliados os índices I_A e rd , trabalhando com a hipótese nula de que existe associação aleatório em diferentes *loci* ($I_A=0$), sendo rejeitada quando I_A for >0 .

Por meio da estatística θ , foram feitas as análise de diferenciação genética entre e dentro das populações (WEIR e COKERHAM 1984; WEIR, 1990), calculada com o programa Multilocus, com *bootstrap* de 1000 permutações. A estatística θ varia de 0 (sem diferenciação população) a 1 (diferenciação completa, onde as populações são fixadas para diferentes alelos). E para os grupos determinados de acordo com a inferência bayesiana a diferenciação genética foi mensurada de acordo com o índice de diferenciação gênica (G_{ST}), calculado usando o programa GENODIVE (MEIRMANS e VAN TIENDEREN, 2004). A análise da variância molecular (AMOVA) foi realizada para estimar a distribuição da variação genética entre e dentro das populações através do programa Arlequin ver. 3.5.1.2 (EXCOFFIER e LISCHER, 2010).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Marcadores ISSR foram utilizados para analisar a variabilidade e a estrutura genética de 169 isolados de *C. cassiicola* coletados em pepino, tomate e mamão nas cidades de Manaus, Iranduba e Presidente Figueiredo no estado do Amazonas. Os oito *primers* ISSR testados amplificaram 191 fragmentos, sendo todos polimórficos. O número de fragmentos amplificados polimórficos variou de 18 (UBC12) a 36 (UBC890) (Tabela 2). O fragmento das bandas amplificadas variou de 300 a 5000 pb (Figura 3).

Apesar de serem desenvolvidos recentemente, marcadores ISSR tem sido usados em estudos de diversidade genética por apresentarem uma série de vantagens em relação às outras classes de marcadores genéticos. Segundo Borner e Branchard (2001), esse marcador possui alta resolução, revelando elevado polimorfismo, o que é interessante para diferenciar indivíduos intra-específicos, não precisam do conhecimento prévio da sequência, além de possuírem alta estabilidade, baixo custo e serem passíveis de reprodução.

A análise da variabilidade genética de isolados de *C. cassiicola* foi estudada na década passada utilizando em sua maioria marcadores de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) e com polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), e com isolados coletados em seringueiras (*Hevea brasiliensis*) no continente asiático e africano (SILVA et al., 1995, SILVA et al., 2003). Este é o primeiro trabalho com isolados da região Amazônica utilizando marcadores ISSR.

Tabela 2. Lista de primers ISSR utilizados na análise da diversidade e estrutura genética de isolados de *Corynespora cassiicola*.

<i>Primer</i>	Sequência (5'- 3')	Repetição	T° anelamento	Fragmentos amplificados	Fragmentos polimórficos	Referências
Mj5	CCGTCACCGTCAA <u>A</u>	(CCGTCA) ₂ ^a	49	21	21	Nghia et al., 2008
UBC807	AGAGAGAGAGAGAGAGAG <u>I</u>	(AG) ₈ T	51	25	25	Qi et al., 2011
UBC834	AGAGAGAGAGAGAGAGAGY <u>T</u>	(AG) ₈ YT	49	24	24	Qi et al., 2011
UBC841	GAGAGAGAGAGAGAGAGAY <u>C</u>	(GA) ₈ YC	48	25	25	Qi et al., 2011
UBC842	GAGAGAGAGAGAGAGAGAY <u>G</u>	(GA) ₈ YG	49	21	21	Qi et al., 2011
UBC890	<u>V</u> HVGTGTGTGTGTGTGT	VHV(GT) ₇	49	36	36	Qi et al., 2011
UBC812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	(GA) ₇ GAA	51	18	18	Qi et al., 2011
UBC864	ATGATGATGATGATGATG	(ATG) ₆	45	21	21	Qi et al., 2011
Número total de fragmentos amplificados				191	191	

MJ: *primers* ISSR desenvolvidos a partir de regiões microssatélite de *Ganoderma spp.*

UBC: *primers* ISSR do set No. 9, desenvolvidos pelo Laboratório de Biotecnologia da University of British Columbia, Vancouver, Canada, <http://www.ubc.ca/>)

Nomenclatura utilizada: Y=C/T, V=A/G/C, H=A/C/T

Neste estudo, marcadores ISSR tiveram boa resolução para analisar a variabilidade intra-específica em *C. cassiicola*, revelando a elevada variabilidade genética existente nas populações estudadas. Esta alta variabilidade genética possivelmente esta por processos de mutações espontâneas dentro das populações, visto que fungo que se reproduzem apenas assexuadamente não sofrem recombinação regular e a fonte de variabilidade genética resulta de acumulações de mutações no genoma, o que é interessante do ponto de vista evolutivo, pois o genoma desses organismos é ligado, e qualquer alteração é passada de uma geração pra outra (TAYLOR et al., 1999)

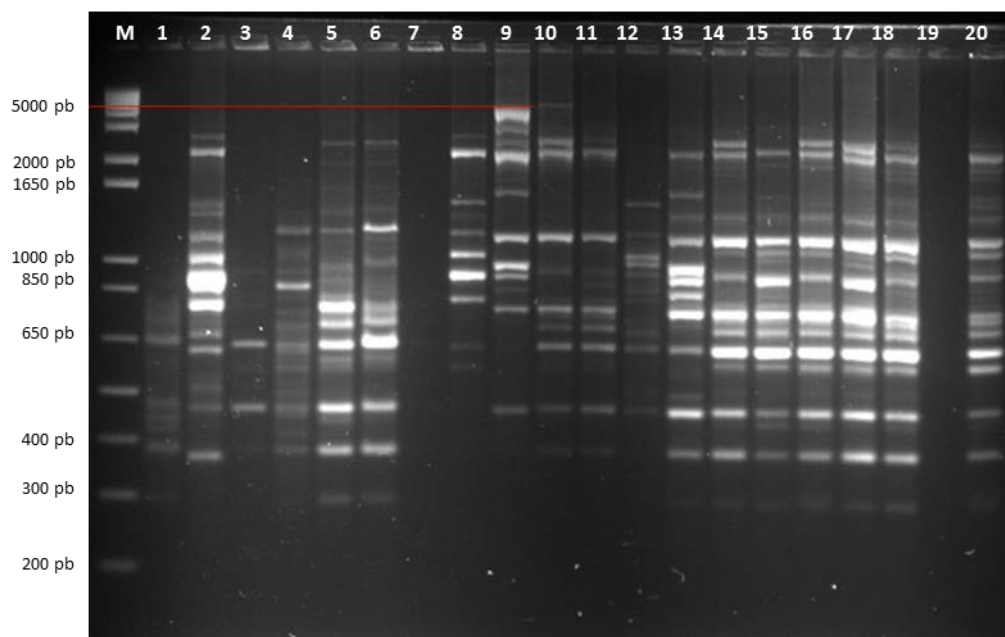


Figura 3. Gel de agarose a 1,2% com os produtos da amplificação obtidos por oito primers ISSR. A primeira faixa representa o marcador de 1 Kb DNA Ladder. As colunas de 1 a 20 representam os isolados de diferentes hospedeiros e regiões de *Corynespora cassiicola*, Amazonas, Brazil.

Resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho foram demonstrados diversos autores. Nghia et al. (2008), avaliou características morfológicas de 21 isolados de *C. cassiicola* obtidos de diferentes clones e plantios de seringueira na Malásia utilizando 8 primers ISSR, e obteve 106 fragmentos amplificados, destes,

91,5% eram polimórficos. Qi et al. (2011), utilizaram 16 *primers* ISSR e a região ITS para analisar as características morfológicas e moleculares de 22 isolados de *C. cassiicola* obtidos de pepino, mamão, berinjela, tomate, feijão, soja, gergelim e seringueira oriundos da China, e obtiveram 114 fragmentos amplificados, sendo 102 polimórficos. Esses resultados demonstram que a alta diversidade genética encontrada, independe de populações de diferentes regiões e/ou hospedeiro do fungo, ou seja, é unicamente vinculada a uma característica intra-específica da espécie.

Marcadores ISSR já foram aplicados para importantes grupos de fitopatógenos como *Fusarium graminearum* (MISHRA, et al., 2004), *Fusarium poae* (DINOLFO et al., 2010), *Colletotrichum gloeosporioides* (RAMPERSAD, 2013) e em todos apresentou boa resolução.

A diversidade gênica (H) encontrada em cada população de *C. cassiicola* esta representada na Tabela 3. De maneira geral, a diversidade gênica foi relativamente alta em todas as populações estudadas. O número de *loci* variou de 0 a 26, e o *primer* em que se obteve maior valor de diversidade gênica foi UBC 807. O maior índice de diversidade gênica foi encontrado na população MA2 (H=0,43), e os menores valores foram observados para as populações do município de Presidente Figueiredo, PE3 (H=0,13) e MA3 (H=0,15), indicando que há menor diversidade neste município, independente do hospedeiro.

Analisando a população com maior diversidade gênica (MA2) comparando com as outras populações deste mesmo hospedeiro, podemos observar que as populações obtidas do mamoeiro apresentaram os maiores índices de diversidade gênica quando comparados com as populações dos demais hospedeiros estudados. A presença do hospedeiro (mamão) por longos períodos em campo faz com que a

população do patógeno possa evoluir, aumentando seu número de alelos, além da contribuição da mutação introduzindo novas variantes na população (MC DONALD, 1997).

Tabela 3. Número de loci e diversidade gênica por primer em cada população de *Corynespora cassiicola*, Amazonas, Brasil.

Primer	Nº de loci	Diversidade Gênica (H)								
		TO1	TO2	TO3	PE1	PE2	PE3	MA1	MA2	MA3
Mj5	2-15	0.26	0.29	0.23	0.24	0.21	0.13	0.23	0.31	0.15
UBC807	0-24	0.37	0.39	0.39	0.31	0.37	0.40	0.35	0.43	0.42
UBC834	0-16	0.23	0.33	0.22	0.26	0.28	0.31	0.21	0.28	0.24
UBC841	3-21	0.21	0.30	0.26	0.37	0.35	0.30	0.39	0.32	0.30
UBC842	2-16	0.25	0.16	0.21	0.25	0.29	0.31	0.30	0.36	0.29
UBC890	0-25	0.27	0.28	0.24	0.34	0.30	0.31	0.27	0.33	0.27
UBC812	1-16	0.35	0.32	0.39	0.35	0.40	0.29	0.38	0.36	0.35
UBC864	1-15	0.31	0.28	0.29	0.35	0.30	0.27	0.31	0.30	0.23
Total		2,25	2,35	2,23	2,47	2,5	2,32	2,44	2,69	2,25

As populações de pepino (PE3) e mamão (MA3) oriundas deste município, se comportam como populações recém formadas, que ainda estão se estruturando, visto que a diversidade gênica observada com os isolados deste município é baixa. Entretanto, as populações oriundas do município de Presidente Figueiredo apresentaram menor diversidade gênica quando comparadas com as demais populações.

Uma das explicações pode estar relacionada a alterações do tamanho populacional, visto que quando ocorrem reduções no tamanho efetivo da população, tanto por efeito fundador ou gargalo, há uma diminuição no número de alelos daquela população, e conseqüentemente ocorre deriva genética, resultando em uma baixa diversidade gênica (MC DONALD, 1997). Isto pode ter acontecido com as

populações de tomate e pepino, que apresentaram menor diversidade gênica, visto que estas obedecem a um regime sazonal de plantio e são constantemente renovadas. Além disso, a ausência do hospedeiro e condições climáticas adversas, podem também causar a redução do tamanho da população, fazendo com que algumas populações sejam menos diversificadas que aquelas que mantêm altas populações durante todo o ano (MCDONALD e LINDE, 2002).

Os valores de diversidade genotípica (G_0), equitabilidade (E_5) e desequilíbrio de ligação (I_A e r_d) das 9 populações de *C. cassicola* estão dispostos na Tabela 4. Todos os genótipos tiveram frequências idênticas na população ($E_5 = 1,0$). Diversidade genotípica foi baixa em todas as populações, principalmente em populações do município de Presidente Figueiredo, semelhante aos resultados obtidos de diversidade gênica apresentados na Tabela 3. A população PE3 teve o menor valor de diversidade genotípica ($G_0 = 0.7$).

Diversidade genotípica baixa nas populações de *C. cassicola* demonstra ausência de recombinação nessas populações, o que já é esperado para fungos que se reproduzem assexuadamente. Diferentemente, populações que possuem modo reprodutivo sexuado tem maior diversidade genotípica, devido à produção de genótipos recombinantes ao longo do tempo recombinação (McDONALD e LINDE, 2002; MILGROOM, 1996).

Os testes de associação aleatória detectaram altos níveis de desequilíbrio de ligação, dispensando a hipótese nula ($I_A > 0$), sendo significativo a 1% de probabilidade, mostrando ausência de recombinação entre as populações (Tabela 4). Quando os valores de I_A são iguais a 0, entende-se que nesta população esteja acontecendo acasalamento aleatório, ou seja, a população está sob efeito da recombinação. Neste estudo, os valores de I_A foram maiores que zero, descartando

a hipótese de acasalamento aleatório. As populações apresentaram de modo geral altos níveis de desequilíbrio de ligação, entretanto este índice foi mais alto nas populações MA1 ($I_A = 6.08$) e MA2 ($I_A = 5.24$).

Tabela 4. Índice de diversidade genética e desequilíbrio de ligação em nove populações de *Corynespora cassiicola*, Amazonas, Brasil.

População	N ₁	MLG	E(g _n)	E ₅	G _o	I _A	r _d
TO1	21	21	18	1	2.1 (0.37 – 3.55)	3.29*	0.022**
PE1	22	22	18	1	2.2 (0.38 - 3.54)	4.53*	0.029**
MA1	18	18	18	1	1.8 (0.55 - 3.37)	6.08*	0.040**
Total	61	61	18	1			0.022**
TO2	21	21	18	1	2.1 (0.37 – 3.55)	4.47*	0.031**
PE2	18	18	18	1	1.8 (0.55 - 3.37)	4.72*	0.031**
MA2	21	21	18	1	2.1 (0.37 – 3.55)	5.24*	0.032**
Total	60	60	18	1			0.017**
TO3	7	7	7	1	0.7 (1.1 – 2.82)	2.62*	0.020**
PE3	18	18	7	1	1.8 (0.55 - 3.37)	3.32*	0.022**
MA3	19	19	7	1	1.9 (0.47 - 3.49)	3.32*	0.023**
Total	44	44	7	1			0.018**

N₁ Tamanho da amostra

MLG Número de genótipos multilocos observados

E(g_n) Número de MLG esperados para o menor tamanho da amostra baseado em métodos de rarefação

E₅ Índice *Evenness*

G_o índice de diversidade genotípica escalonado (GRÜNWALD et al., 2003)

I_A Índice de associação

r_d Índice padronizado de associação de desequilíbrio de ligação

*significativo quando $\alpha = 0.5$ ** altamente significativo $\alpha = 0.05$

Diversos fatores podem causar desequilíbrio de ligação em uma população, como por exemplo a seleção, ligação entre locos, mistura populacional, fluxo gênico e deriva (MILGROON, 1996). O modo reprodutivo da espécie, também pode afetar o desequilíbrio de ligação, logo, estes altos valores no índice de associação podem ter sido gerados pelo modo reprodutivo da espécie, visto que *C. cassiicola* é um fungo

de reprodução tipicamente assexuada, e fungos que apresentam este tipo de reprodução geralmente não são submetidos recombinação regulares (ciclo parassexual), e a variação genética resulta principalmente da acumulação de mutações espontâneas (TAYLOR et al., 1999). Desta forma, a mutação é a principal fonte de variabilidade genética em fungos que apresentam esse modo reprodutivo.

A diferenciação genética entre as populações de *C. cassicola* através do estimador θ (Weir e Cokerham 1984) é apresentado na Tabela 5. As populações apresentaram níveis moderados e altos de diferenciação genética, onde valores de $\theta > 0$ indicaram essa diferenciação. As maiores diferenciações genéticas foram observadas em populações de hospedeiro e municípios distintos como as populações MA3 e TO1 ($\theta = 0,27$), mostrando assim que a distância geográfica e o hospedeiro exerceram um papel fundamental na diferenciação das populações. As populações TO3;TO2 e PE3;PE2 apresentaram o menor valor de θ (0,05), seguidos da população de MA3 e MA2 (0,08).

Tabela 5. Medidas de diferenciação entre as populações de *Corynespora cassicola*, Amazonas, Brasil.

População	Diferenciação da população								
	TO1	TO2	TO3	PE1	PE2	PF3	MA1	MA2	MA3
TO1									
TO2	0.14 ^a								
TO3	0.13 ^a	0.05 ^a							
PE1	0.20 ^a	0.12 ^a	0.12 ^a						
PE2	0.21 ^a	0.16 ^a	0.15 ^a	0.12 ^a					
PE3	0.22 ^a	0.18 ^a	0.19 ^a	0.12 ^a	0.05 ^a				
MA1	0.24 ^a	0.20 ^a	0.22 ^a	0.14 ^a	0.11 ^a	0.17 ^a			
MA2	0.19 ^a	0.15 ^a	0.15 ^a	0.14 ^a	0.12 ^a	0.19 ^a	0.13 ^a		
MA3	0.27 ^a	0.19 ^a	0.22 ^a	0.14 ^a	0.14 ^a	0.19 ^a	0.10 ^a	0.08 ^a	

^a valor de theta significativo quando $p < 0.001$

Populações do mesmo hospedeiro porém de municípios diferentes fornecem indícios de que possivelmente a estrutura populacional esteja sendo moldada de acordo com o hospedeiro, descartando também a hipótese de que a diferenciação genética esteja acontecendo por isolamento geográfico, entretanto não podemos afirmar esta hipótese.

A análise de variância molecular (AMOVA) com as 9 populações de *C. cassiicola* esta representada na Tabela 6. Os resultados da AMOVA para as populações mostrou que a maior variação esta ocorrendo dentro das populações (84,3%), enquanto que 15.70% esta ocorrendo entre as populações.

Tabela 6. Análise da variância molecular entre e dentro das populações de *Corynespora cassiicola*, Amazonas, Brasil.

F.V	G.L	S.Q	Componente de Variância	Porcentagem de Variação
Entre populações	3	1946.267	648.756	19.80
Dentro de populações	161	9811.430	60.941	80.20
Total	164	11757.697	709.697	100

A estrutura de população inferida pela Análise discriminante de componentes principais (DAPC), conforme o critério de Informação Bayesiana (BIC) e o número de agrupamentos (K) estão representados na Figura 4. Os 169 isolados de *C. cassiicola* obtidos dos hospedeiros tomate, pepino e mamão, oriundos dos municípios de Manaus, Iranduba e Presidente Figueiredo, através dessa análise se estruturaram em 4 grupos genéticos distintos.

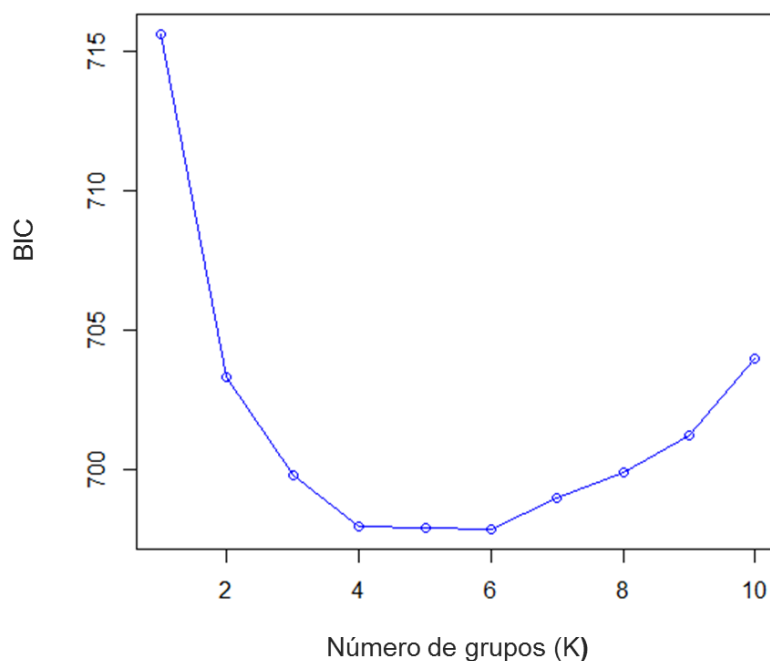


Figura 4. Número de agrupamentos encontrados no DAPC para os 169 isolados de *Corynespora cassiicola* conforme o critério de inferência bayesiana (BIC). O menor valor de BIC representa o melhor número de grupos (K=4).

Pela análise bayesiana detectaram-se 4 agrupamentos de indivíduos, e com ocorrência de mistura entre eles (Figura 5). O grupo 1 (verde) foi composto apenas por isolados obtidos de mamão dos municípios de Iranduba e Presidente Figueiredo. O grupo 2 (amarelo) e 3 (vermelho) apresentaram mistura entre eles, onde o grupo 2 foi composto por isolados de todos os hospedeiros, e o grupo 3 por isolados de pepino e mamão, ambos os grupos com representantes dos 3 municípios. O grupo 4 (azul) foi composto somente por isolados de tomate de todos os municípios amostrados.

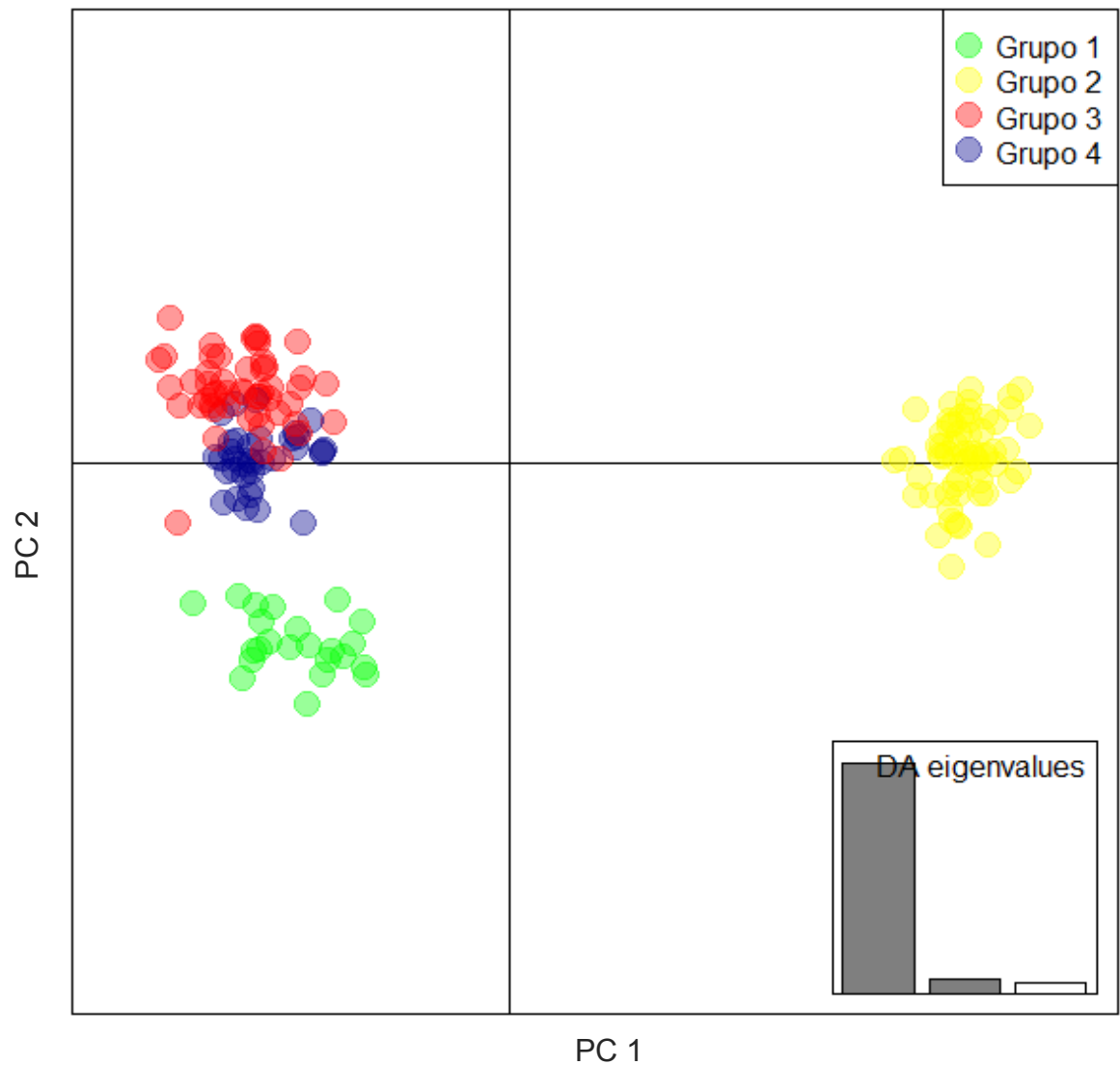


Figura 5. Gráfico de dispersão da análise discriminante de componentes principais (DAPC) com os 4 grupos genéticos de *Corynespora cassiicola*. Amazonas, Brasil.

Esta claro a presença de estruturação em função do hospedeiro nos grupos 1(mamão) e 4(tomate) com altos valores de *Gst* (Tabela 7). O grupo 3 também demonstra essa possível estruturação por hospedeiro em pepino, visto que 87,7% dos isolados presentes nesse grupo são de pepino, e apenas 12,3% são de mamão.

Tabela 7. Medidas de diferenciação gênica entre os grupos de *Corynespora cassiicola*, Amazonas, Brasil.

População	Diferenciação ($G''st$)			
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Grupo 1				
Grupo 2	0.333			
Grupo 3	0.205	0.298		
Grupo 4	0.302	0.353	0.199	

Uma das explicações dessa estruturação seria a especialização do hospedeiro ao longo do tempo através de mecanismos co-evolutivos. *C. cassiicola* se comportava como um patógeno generalista, e vem se especializando por hospedeiro, o que explicaria, por exemplo, o fato de que populações de um hospedeiro de diferentes regiões encontram-se agrupadas.

A especialização por hospedeiro em *C. cassiicola* já foi relatada em alguns estudos (ONESIROSAN et al., 1974; PEREIRA et al., 2003; TOSHIKO et al., 2008; DIXON et al., 2009;) e inclusive mostrando a mesma especialização em mamão como o proposto por este trabalho.

Nos trabalhos de Onesirosan et al. (1974), verificaram a especialização por hospedeiro em mamoeiro. Neste estudo um isolado obtido de mamão da Nigéria causou doença apenas em mamoeiro. Outro exemplo dessa especialização por hospedeiro em mamão é o trabalho de Dixon et al. (2009), onde em estudos com inoculação cruzada e também com análises moleculares, verificou a especialização de isolados de *C. cassiicola* pelo hospedeiro mamão, visto que os isolados quando inoculados em diversas plantas só manifestaram sintomas em plantas de mamão. Além disso, verificou que esses isolados, apesar de pertencerem a regiões geográficas distintas, apresentavam o mesmo padrão genético.

O processo de especiação geralmente está associado com mudanças ecológicas, como por exemplo, temperatura e umidade (STUKENBROCK, 2013). Estes fatores podem estar influenciando a especialização por hospedeiro nas populações de *C. cassicola*.

A mistura de genótipos geograficamente separados, como o grupo 2 e 3 fornece informações da possível ocorrência de fluxo gênico. O fluxo gênico é um mecanismo que permite a troca de indivíduos separados geograficamente. No caso de *C. cassicola* genótipos inteiros podem ser trocados entre populações, devido ao seu modo reprodutivo (McDONALD e LINDE, 2002).

O fluxo gênico pode ser causado de forma aleatória na população ou induzida através de atividades antrópicas, como o movimento e troca de sementes e outros materiais de plantios infectadas, regimes sazonais de plantio, e a ocorrência de hospedeiros alternativos (MCDERMOTT e MCDONALD, 1993; MCDONALD, 1997; MCDONALD, 2004). Na região norte, o compartilhamento de sementes de tomate e pepino, além de material propagativo é uma prática comum entre os produtores rurais, desta forma alguns genótipos acabam sendo introduzidos em áreas onde não ocorriam anteriormente.

6. CONCLUSÕES

- Marcadores ISSR tiveram boa resolução para avaliar a variabilidade de *C. cassicola*.
- As populações tiveram alta diversidade gênica e desequilíbrio de ligação, e baixa diversidade genotípica, demonstrando ausência de recombinação.
- Quatro grupos genéticos foram detectados. Houve especialização por hospedeiro nos grupos 1(mamão) e 4 (tomate), e evidências de fluxo gênico nos grupos 2 e 3.
- *C. cassicola* pode ser considerado um patógeno de médio risco.

REFERENCIAS

- AGAPOW, P.; BURT, A. **Multilocus**. London: University of London 2003.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. Burlington, MA, USA: Elsevier Academic Press, 2005. 922
- ALMEIDA, A. et al. Doenças da soja (*Glycine max*). In: KIMATI, H. A. L.; REZENDE, J. A. M., et al (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, 2005. p.569-588.
- ALMEIDA, A.; YAMASHITA, J. Crescimento e esporulação de *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia brasileira**, 1976.
- ANDERSON, J. B.; KOHN, L. M. Clonality in soilborne, plant-pathogenic fungi. **Annual review of phytopathology**, v. 33, n. 1, p. 369-391, 1995.
- ARCHIBALD, J. K.; WOLFE, A. D.; JOHNSON, S. D. Hybridization and gene flow between a day-and night-flowering species of *Zaluzianskya* (Scrophulariaceae ss, tribe Manuleeae). **American Journal of Botany**, v. 91, n. 9, p. 1333-1344, 2004.
- ARIAS RIVAS, B. et al. Control químico de manchas foliares en ajonjolí (*Sesamum indicum* L.) en los llanos de Monagas. 10. **Seminario Nacional de Fitopatología**, 10, Maracay (Venezuela), 11-16 Oct 1987. Sociedad Venezolana de Fitopatología. 1987
- AWODERU, V. New leaf spot of para rubber (*Hevea brasiliensis*) in Nigeria. **Plant Disease Reporter**, v. 53, p. 406-408, 1969.
- BARNETT, H.; HUNTER, B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4. St Paul, Minnesota: American Phytopathological Society, 1998.
- BARTHE, P. et al. Structural analysis of cassiicolin, a host-selective protein toxin from *Corynespora cassiicola*. **Journal of molecular biology**, v. 367, n. 1, p. 89-101, 2007.
- BENALI, S. et al. Advances of molecular markers application in plant pathology research. **European Journal of Scientific Research**, v. 50, p. 110-123, 2011.
- BLAZQUEZ, C. Target spot. In: JONES, J. B.; JONES, J. P., et al (Ed.). **Compendium of Tomato Diseases**. 2. St. Paul, Minnesota, USA: APS Press, v.23, 1993.
- BOEGER, J.; CHEN, R.; MCDONALD, B. Gene flow between geographic populations of *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) detected with restriction fragment length polymorphism markers. **Phytopathology**, v. 83, n. 11, p. 1148-1154, 1993.

BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant molecular biology reporter**, v. 19, n. 3, p. 209-215, 2001.

BRETON, F.; SANIER, C.; D'AUZAC, J. Role of cassiicolin, a host-selective toxin, in pathogenicity of *Corynespora cassiicola*, causal agent of a leaf fall disease of *Hevea*. **Journal of Rubber Research**, v. 3, n. 2, p. 115-128, 2000.

BURDON, J.; SILK, J. Sources and patterns of diversity in plant-pathogenic fungi. **Phytopathology**, v. 87, n. 7, p. 664-669, 1997.

CARDOSO, M. O. et al. **Doenças das cucurbitáceas no estado do Amazonas**. Circular Técnica: Embrapa Amazônia Ocidental. 9, 2001.

CASTRO, S. Leaf blight caused by *Corynespora*: a new disease on cucumber (*Cucumis sativus*) in the Valley of Culiacan, Sinaloa, Mexico and its chemical control. **Plant Disease Reporter**, 1979.

COLLADO, J. et al. Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex*. **New Phytologist**, v. 144, n. 3, p. 525-532, 1999.

CRAWFORD, D. et al. Intersimple sequence repeat (ISSR) variation in *Lactoris fernandeziana* (Lactoridaceae), a rare endemic of the Juan Fernández Archipelago, Chile. **Plant Species Biology**, v. 16, n. 3, p. 185-192, 2001.

CRISCIONE, C. D.; POULIN, R.; BLOUIN, M. S. Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. **Molecular ecology**, v. 14, n. 8, p. 2247-2257, 2005.

CULLEY, T. M.; WOLFE, A. D. Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers. **Heredity**, v. 86, n. 5, p. 545-556, 2001.

CUTRIM, F. A.; SILVA, G. S. Patogenicidade de *Corynespora cassiicola* a diferentes espécies de plantas. **Fitopatologia brasileira**, v. 28, n. 2, 2003.

DEIGHTON, F. Preliminary list of fungi and diseases of plants in Sierra Leone. **Bulletin of Miscellaneous Information (Royal Botanic Gardens, Kew)**, p. 397-424, 1936.

DEMIDOVA, L. **Some problems of biology of fungus *C. cassiicola*, the causal agent of black mold of cucumber**. Mem. Institute of Agronomy. Leningrad. 87: 91-95 p. 1962.

DÉON, M. et al. First characterization of endophytic *Corynespora cassiicola* isolates with variant cassiicolin genes recovered from rubber trees in Brazil. **Fungal diversity**, v. 54, n. 1, p. 87-99, 2012.

DHINGRA, O.; SINCLAIR, J. **Basic Plant Pathology Methods**. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, 1985. 355

DINOLFO, M. I. et al. ISSR markers detect high genetic variation among *Fusarium poae* isolates from Argentina and England. **European Journal of Plant Pathology**, v. 127, n. 4, p. 483-491, 2010.

DIXON, L. et al. Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*. **Phytopathology**, v. 99, n. 9, p. 1015-1027, 2009.

DOYLE, J.; DOYLE, J. Genomic plant DNA preparation from fresh tissue-CTAB method. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, n. 11, p. 11-15, 1987.

DUARTE, M.; ALBUQUERQUE, F.; PRABHU, A. Uma nova enfermidade foliar do cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) causada pelo fungo *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt) Wei. **Fitopatologia brasileira**, 1978.

DUARTE, M.; ASANO, S.; ALBUQUERQUE, F. D. Estudo comparativo das características morfológicas e fisiológicas de dois isolamentos de *Corynespora cassiicola*. **Fitopatologia brasileira**, 1983.

DUNG, P. T.; HOAN, N. T. *Corynespora* leaf fall on rubber in Vietnam, a New record. **Proceeding of IRRDB Symposium**, p.273-275, 1999.

EBRAHIM, W. et al. Decalactone derivatives from *Corynespora cassiicola*, an endophytic fungus of the mangrove plant *Laguncularia racemosa*. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2012, n. 18, p. 3476-3484, 2012.

ELLIS, M.; HOLLIDAY, P. *Corynespora cassiicola*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria. 303: 1-2 p. 1971.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular ecology resources**, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.

FARR, D. et al. Fungal databases. **Systematic Botany & Mycology Laboratory, ARS, USDA.**, 2014. Disponível em: < <http://nt.arsgrin.gov/sbmlweb/fungi/index.cfm> >.

FERNANDES, R.; BARRETO, R. *Corynespora cassiicola* causing leaf spots on *Coleus barbatulus*. **Plant pathology**, v. 52, n. 6, p. 786-786, 2003.

FORCELINI, C. A. **Doenças em soja: entendendo as diferenças entre biotróficos e necrotróficos**. Revista Plantio Direto. 120: 7-10 p. 2010.

GASPAROTTO, L.; FERREIRA, F.; JUNQUEIRA, N. Mancha de *Corynespora* em folhas de seringueira (*Hevea brasiliensis*) no Brasil. **Fitopatologia brasileira**, v. 13, n. 3, p. 278-280, 1988.

GOND, S. et al. Study of endophytic fungal community from different parts of *Aegle marmelos* Correae (Rutaceae) from Varanasi (India). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 10, p. 1371-1375, 2007.

GONZÁLEZ, M. *Corynespora cassiicola* (Berk e Curt.) Wei en semilla de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.): Distribución geográfica, ubicación y control. 1990. 34 (Ingeniero agrónomo). Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela.

GREENBERG, A. J. et al. Ecological adaptation during incipient speciation revealed by precise gene replacement. **Science**, v. 302, n. 5651, p. 1754-1757, 2003.

GRÜNWARD, N. J. et al. Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. **Phytopathology**, v. 93, n. 6, p. 738-746, 2003.

HALKETT, F.; SIMON, J.-C.; BALLOUX, F. Tackling the population genetics of clonal and partially clonal organisms. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 20, n. 4, p. 194-201, 2005.

HARTMAN, G.; SINCLAIR, J.; RUPE, J. Target spot. In: SINCLAIR, J. (Ed.). **Compendium os soybean diseases**. St. Paul, Minnesota, USA, v.4, 1999.

HYDE, K. et al. Saprobian fungi on bamboo culms. **Fungal diversity**, v. 7, p. 35-48, 2001.

JINJI, P. et al. First record of *Corynespora* leaf fall disease of *Hevea* rubber tree in China. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 2, n. 1, p. 35-36, 2007.

JOMBART, T.; DEVILLARD, S.; BALLOUX, F. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. **BMC genetics**, v. 11, n. 1, p. 94, 2010.

JONES, J. P. Disease thresholds for downy mildew and target leafspot of cucurbits and late blight of tomato. **Plant Disease Reporter**, 1978.

JONES, J. P.; JONES, J. B. Target spot of tomato: Epidemiology and control. **Proceedings l'la State Horticulture Society**, v. 97, p. 216-218, 1984.

JUNQUEIRA, N. T. et al. New diseases caused by virus, fungi and also a bacterium on rubber from Brazil and their impact on international quarantine. **Proceedings of the regional conference on plant quarantine support for agricultural development**. Kuala Lumpur, Malaysia. ASEAN Plant Quarantine Centre and Training Institute. 1985.

KERRIGAN, J. et al. *Ascobotryozyma cognata* sp. nov., a new ascomycetous yeast associated with nematodes from wood-boring beetle galleries. **Mycological research**, v. 107, n. 09, p. 1110-1120, 2003.

KINGSLAND, G.; SITTERLY, W. Studies on fungicides for control of *Corynespora cassiicola* leafspot of tomatoes in the Republic of Seychelles. **International Journal of Pest Management**, v. 32, n. 1, p. 31-34, 1986.

KINGSLAND, G. C. Pathogenicity and epidemiology of *Corynespora cassiicola* in the

Republic of Seychelles. **International Journal of Pest Management**, v. 32, n. 4, p. 283-287, 1986.

KOHN, L. M. Mechanisms of fungal speciation. **Annual Revision Phytopathological**, v. 43, p. 279-308, 2005.

KRUGNER, T.; BACCHI, L. Fungos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H., *et al* (Ed.). **Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos**. São Paulo, Brasi: Ceres Agronomica, 1995. p.46-95.

KURT, S. Genetic variation in *Corynespora cassiicola*, the target leaf spot pathogen. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 4, p. 618-621, 2005.

LAKSHMANAN, P.; JEYARAJAN, R.; VIDHYASEKARAN, P. A boll rot of cotton caused by *Corynespora cassiicola* in Tamil Nadu, India. **Phytoparasitica**, v. 18, n. 2, p. 171-173, 1990.

LEE, S. *et al*. Diversity of saprobic hyphomycetes on Proteaceae and Restionaceae from South Africa. **Fungal diversity**, v. 17, n. 91, p. 114, 2004.

LEITE, R.; BARRETO, R. Mancha foliar de hortênsia (*Hydrangea* sp.) causada por *Corynespora cassiicola*. **Fitopatologia brasileira**, v. 22, p. 276, 1997.

LEROY, M.; LOURD, M. Doença foliar do tomateiro causada por *Corynespora cassiicola* em Manaus. **Fitopatologia brasileira**, v. 14, n. 1, p. 32-36, 1989.

LIYANAGE, A. D. S. *et al*. *Corynespora* Leaf spot disease of rubber (*Hevea brasiliensis*)—a new report. **Journal of Rubber Research Institute in Sri Lanka**, v. 65, p. 47-50, 1986.

LOPES, C. *et al*. Doenças fúngicas. In: LOPES, C. e ÁVILA, A. (Ed.). **Doenças do tomateiro**. Brasília Embrapa Hortaliças, 2005. p.17-52.

MACEDO, D. M. *et al*. *Corynespora cassiicola* f. sp. *schinii*, a Potential Biocontrol Agent for the Weed *Schinus terebinthifolius* in the United States. **Plant Disease**, v. 97, n. 4, p. 496-500, 2013.

MCDERMOTT, J. M.; MCDONALD, B. A. Gene flow in plant pathosystems. **Annual review of phytopathology**, v. 31, n. 1, p. 353-373, 1993.

MCDONALD, B. A. The population genetics of fungi: tools and techniques. **Phytopathology**, v. 87, n. 4, p. 448-453, 1997.

MCDONALD, B. A. **Population Genetics of Plant Pathogens**. The Plant Health Instructor: APS 2004.

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual review of phytopathology**, v. 40, n. 1, p. 349-379, 2002. (a)

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. **Euphytica**, v. 124, n. 2, p. 163-180, 2002. (b)

MCDONALD, B. A.; MCDERMOTT, J. M. Population genetics of plant pathogenic fungi. **Bioscience**, p. 311-319, 1993.

MEIRMANS, P.G.; VAN TIENDEREN, P.H. GENOTYPE and GENODIVE: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. **Molecular Ecology Notes** 4, 792-4. 2004.

MILGROOM, M. G. Recombination and the multilocus structure of fungal populations. **Annual review of phytopathology**, v. 34, n. 1, p. 457-477, 1996.

MISHRA, P. K. et al. Molecular genetic variation and geographical structuring in *Fusarium graminearum*. **Annals of applied biology**, v. 145, n. 3, p. 299-307, 2004.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1973. p.3321-3323.

NEWSAM, A. Plant Pathology Division Report. **Rubber Research Institute of Malaysia, Kuala Lumpur, Malaysia.**, 1960.

NGHIA, N. A. et al. Morphological and inter simple sequence repeat (ISSR) markers analyses of *Corynespora cassiicola* isolates from rubber plantations in Malaysia. **Mycopathologia**, v. 166, n. 4, p. 189-201, 2008.

OLIVE, L. S.; BAIN, D.; LEFEBVRE, C. A leaf spot of Cowpea and Soybean caused by an undescribed species of Helminthosporium. **Phytopathology**, v. 35, n. 10, p. 822-831. 1945.

OLIVEIRA, A.; SANTOS FILHO, H. Mancha de *Corynespora*. Cruz das Almas, 2006. Disponível em: http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/produto_em_foco/mamao_23.pdf Acesso em: 10 agosto.

OLIVEIRA, R. R. et al. Chlamydospore formation by *Corynespora cassiicola*. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, n. 6, p. 415-418, 2012.

OLUMA, H.; AMUTA, E. *Corynespora cassiicola* leaf spot of pawpaw (*Carica papaya* L.) in Nigeria. **Mycopathologia**, v. 145, n. 1, p. 23-27, 1999.

ONESIROSAN, P. T.; ARNY, D. C., e DURBIN, R. D. Hostspecificity of Nigerian and North American isolates of *Corynespora cassiicola*. **Phytopathology**, 64, 1364-1367. 1974.

PARK, J. et al. First Report of *Corynespora* Leaf Spot on Beach Vitex Caused by *Corynespora cassiicola* in Korea. **Plant Disease**, v. 97, n. 11, p. 1512-1512, 2013.

PEREIRA, J. M.; BARRETO, R. W. Additions to the mycobiota of the weed *Lantana camara* (Verbenaceae) in southeastern Brazil. **Mycopathologia**, v. 151, n. 2, p. 71-80, 2001.

PEREIRA, J. M. C. et al. *Corynespora cassiicola* f. sp. *lantanae*: a potential biocontrol agent from Brazil for *Lantana camara*. **Biological Control**, v. 26, n. 1, p. 21-31, 2003.

PERNEZNY, K.; SIMONE, G. W. Target spot of several vegetable crops. 1993. Disponível em: < <http://edis.ifas.ufl.edu/VH052> >.

PERNEZNY, K. et al. Control of target spot of tomato with fungicides, systemic acquired resistance activators, and a biocontrol agent. **Plant Protection Science - Prague**, v. 38, n. 3, p. 81-88, 2002.

PESSOA FILHO, M. **Identificação de regiões genômicas associadas ao controle de tolerância à seca em variedades tradicionais de arroz de sequeiro (*Oryza sativa* spp. *japonica*)**. 2008. 249 (Doutorado). Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

PHOTITA, W. et al. Saprobic fungi on dead wild banana. **Mycotaxon**, v. 85, p. 345-356, 2003.

POLTRONIERI, L. et al. Incidência de doenças em pimenta longa (*Piper hispidinervium*) nos estados do Acre e Pará. **Fitopatologia brasileira**, v. 22, p. 4, 1997.

PONGTHEP, K. *Corynespora* disease of Hevea in Thailand. Proceedings of the IRRDB Symposium. Chiang Mai, Thailand, 1987. p.1-17.

PROMPUTTHA, I. et al. A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. **Microbial Ecology**, v. 53, n. 4, p. 579-590, 2007.

QI, Y.-X. et al. Morphological and molecular analysis of genetic variability within isolates of *Corynespora cassiicola* from different hosts. **European Journal of Plant Pathology**, v. 130, n. 1, p. 83-95, 2011.

RAHMAN, M. Disease of *Hevea brasiliensis* in Bangladesh. **Bano Biggyan Patrika**, v. 17, n. 1-2, p. 73-79, 1988.

RAMAKRISHNAN, T.; PILLAY, P. Leaf spot of rubber caused by *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei. **Rubber Board Bulletin**, v. 5, n. 1, p. 32-35, 1961.

RAMPERSAD, S. N. Genetic structure of *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato isolates infecting papaya inferred by multilocus ISSR markers. **Phytopathology**, v. 103, n. 2, p. 182-189, 2013.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, n. 1, p. 9-17, 2002.

REIS, A.; MADEIRA, N. **Diagnóstico dos principais problemas no cultivo de hortaliças no Estado do Amazonas.** . Circular Técnica. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças: 12 p. 2009.

REIS, A. R.; BOITEUX, L. **Mancha-de-corinéspora do tomateiro.** Comunicado Técnico. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças 2007.

ROIM, F. **Comportamento de cultivares e caracterização cultural, morfologia e patogênica de isolados de *Corynespora cassiicola* obtidos de soja [*Glycine max* (L.) Merrill].** 2001. 72 (Mestrado). Agronomia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

ROUSSET, F. genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. **Molecular ecology resources**, v. 8, n. 1, p. 103-106, 2008.

SAHA, T. et al. Genetic variability of *Corynespora cassiicola* infecting *Hevea brasiliensis* isolated from the traditional rubber growing areas in India. **Indian Journal of Natural Rubber Research**, v. 13, n. 1/2, p. 1-10, 2000.

SANTOS, I. P. D. et al. Ocorrência de mancha alvo, causada por *Corynespora cassiicola*, em alface cultivado em hidroponia no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 4, p. 420-420, 2007.

SARMA, Y.; NAYUDU, M. *Corynespora* leaf spot of brinjal. **Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Section B**, 1971. Springer. p.92-97.

SAWYER, N. A.; CHAMBERS, S. M.; CAIRNEY, J. W. Distribution of *Amanita* spp. genotypes under eastern Australian sclerophyll vegetation. **Mycological research**, v. 107, n. 10, p. 1157-1162, 2003.

SCHOCH, C. et al. A class-wide phylogenetic assessment of Dothideomycetes. **Studies in Mycology**, v. 64, p. 1-15, 2009.

SHIMOMOTO, Y. et al. *Corynespora* blight of sweet pepper (*Capsicum annuum*) caused by *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei. **Journal of general plant pathology**, v. 74, n. 4, p. 335-337, 2008.

SHIMOMOTO, Y. et al. Pathogenic and genetic variation among isolates of *Corynespora cassiicola* in Japan. **Plant pathology**, v. 60, n. 2, p. 253-260, 2011.

SILVA, G.; RODRIGUES, A. A.; SOARES JÚNIOR, A. Mancha de *Corynespora* em acerola (*Malpighia glabra*). **Fitopatologia brasileira**, v. 22, p. 452, 1997.

SILVA, W.; DEVERALL, B.; LYON, B. Molecular, physiological and pathological characterization of *Corynespora* leaf spot fungi from rubber plantations in Sri Lanka. **Plant pathology**, v. 47, n. 3, p. 267-277, 1998.

SILVA, W. et al. RFLP and RAPD analyses in the identification and differentiation of isolates of the leaf spot fungus *Corynespora cassiicola*. **Australian Journal of**

Botany, v. 43, n. 6, p. 609-618, 1995.

SILVA, W. P. et al. Genetic variation in *Corynespora cassiicola*: a possible relationship between host origin and virulence. **Mycological research**, v. 107, n. 05, p. 567-571, 2003.

SNOW, J.; BERGGREN JÚNIOR, G. Target spot. In: SINCLAIR, J. e BACKMAN, P. (Ed.). **Compendium of Soy bean Diseases**. 3. St. Paul, Minnesota, USA: American Phytopathological Society, 1989. p.106.

SOUSA, F. M. G.; BENTES, J. L. D. S. Variabilidade de isolados de *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei procedentes do Amazonas, em meios de cultura. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 1, p. 84-87, 2014.

SOUZA, A. et al. First report of *Corynespora cassiicola* causing leaf and berry spots on *Coffea canephora* in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 4, n. 1, p. 72-74, 2009.

SOUZA, I.; SILVA, G. Fungos associados a plantas daninhas na ilha de São Luiz, Maranhão. **Summa Phytopathologica**, v. 27, n. 2, p. 267-268, 2001.

SPENCER, J.; WALTERS, H. Variations in certain isolates of *Corynespora cassiicola*. **Phytopathology**, v. 59, n. 1, p. 58, 1969.

STODDART, J. A.; TAYLOR, J. F. Genotypic diversity: estimation and prediction in samples. **Genetics**, v. 118, n. 4, p. 705-711, 1988.

STUKENBROCK, E. H. Evolution, selection and isolation: a genomic view of speciation in fungal plant pathogens. **New Phytologist**, v. 199, n. 4, p. 895-907, 2013.

SURYANARAYANAN, T.; MURALI, T.; VENKATESAN, G. Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical forests across a rainfall gradient. **Canadian Journal of Botany**, v. 80, n. 8, p. 818-826, 2002.

TANAKA, K. et al. Pleosporales in Japan (5): *Pleomassaria*, *Asteromassaria*, and *Splanchnonema*. **Mycoscience**, v. 46, n. 4, p. 248-260, 2005.

TAYLOR, J.; JACOBSON, D.; FISHER, M. The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification. **Annual review of phytopathology**, v. 37, n. 1, p. 197-246, 1999.

TEAM, R. C. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing 2013.

TEOH, C. **Corynespora leaf fall of Hevea in West Java**. **Malaysian Plant Protection Society**. Malaysian Plant Protection Society. Malaysia: Newsletter. 7: 12-3 p. 1983.

TOSHIKO, F.; KINJIM, U.; KUNIHEI, K. *Corynespora* leaf spot of scarlet sage caused

by *Corynespora cassiicola*. **Journal of General Plant Pathology**, 74, 117–119. 2008.

TSUMURA, Y.; OHBA, K.; STRAUSS, S. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 92, n. 1, p. 40-45, 1996.

ULLOA, M.; HANLIN, R. T. **Illustrated dictionary of mycology**. American Phytopathological Society (APS Press), 2000.

VENTURA, J. et al. **Manejo das doenças do mamoeiro**. A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção. Vitória: Incaper: 231-308 p. 2003.

VERZIGNASSI, J. R.; VIDA, J. B.; TESSMANN, D. J. Epidemias de mancha de corinespora em pepino" tipo japonês" sob cultivo protegido na Região Norte do Estado do Paraná. **Fitopatologia brasileira**, v. 28, p. 570, 2003.

VIÉGAS, A. P. **Dicionário de fitopatologia e micologia**. Ceres Agronomica, 1979.

WEI, C. Notes on *Corynespora*. **Mycological papers**, v. 34, 1950.

WEIR, B. S. **Genetic data analysis. Methods for discrete population genetic data**. Sinauer Associates, Inc. Publishers, 1990.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **evolution**, p. 1358-1370, 1984.

WOLFE, A. D.; LISTON, A. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: (Ed.). **Molecular systematics of plants II**: Springer, 1998. p.43-86

WOLFE, A. D.; RANDLE, C. P. Relationships within and among species of the holoparasitic genus *Hyobanche* (Orobanchaceae) inferred from ISSR banding patterns and nucleotide sequences. **Systematic Botany**, v. 26, n. 1, p. 120-130, 2001.

WULFF, N.; PASCHOLATI, S. Doenças do Gergelim. In: KIMATI, H.; AMORIM, L., et al (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo, SP: Agronômica Ceres, 1997. p. 427-435.

XU, J. Fundamentals of fungal molecular population genetic analyses. **Current issues in molecular biology**, v. 8, n. 2, p. 75, 2006.

YE, Y. et al. First Report of *Corynespora cassiicola* Causing Leaf Spot on *Akebia trifoliata*. **Plant Disease**, v. 97, n. 12, p. 1659-1659, 2013.

YORINORI, J.; HOMECHIN, M. Doenças de soja identificadas no Estado do Paraná no período de 1971 a 1976. **Fitopatologia brasileira**, v. 2, n. 1, p. 108, 1977.

ZHAN, J. et al. Local adaptation and effect of host genotype on the rate of pathogen evolution: an experimental test in a plant pathosystem. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 15, n. 4, p. 634-647, 2002.

ANEXO

Tabela 1

Nº de isolados	População	Município	Hospedeiro	Local de coleta/Proprietário
1	ToMAO	Manaus	Tomate	Estação Experimental de Hortaliças Alejovon der Pahlen-INPA
2	ToMAO	Manaus	Tomate	Estação Experimental de Hortaliças Alejovon der Pahlen-INPA
3	ToMAO	Manaus	Tomate	Estação Experimental de Hortaliças Alejovon der Pahlen-INPA
4	ToMAO	Manaus	Tomate	Estação Experimental de Hortaliças Alejovon der Pahlen-INPA
5	ToMAO	Manaus	Tomate	Estação Experimental de Hortaliças Alejovon der Pahlen-INPA
6	ToMAO	Manaus	Tomate	Universidade Federal do Amazonas
7	ToMAO	Manaus	Tomate	Universidade Federal do Amazonas
8	ToMAO	Manaus	Tomate	Universidade Federal do Amazonas
9	ToMAO	Manaus	Tomate	Universidade Federal do Amazonas
10	ToMAO	Manaus	Tomate	Universidade Federal do Amazonas
11	ToMAO	Manaus	Tomate	Universidade Federal do Amazonas
12	ToMAO	Manaus	Tomate	Universidade Federal do Amazonas
13	ToMAO	Manaus	Tomate	Universidade Federal do Amazonas
14	ToMAO	Manaus	Tomate	Escola Agrícola Rainha dos Apóstolos
15	ToMAO	Manaus	Tomate	Escola Agrícola Rainha dos Apóstolos
16	ToMAO	Manaus	Tomate	Escola Agrícola Rainha dos Apóstolos
17	ToMAO	Manaus	Tomate	Escola Agrícola Rainha dos Apóstolos
18	ToMAO	Manaus	Tomate	Escola Agrícola Rainha dos Apóstolos
19	ToMAO	Manaus	Tomate	Escola Agrícola Rainha dos Apóstolos
20	ToMAO	Manaus	Tomate	Escola Agrícola Rainha dos Apóstolos
21	ToMAO	Manaus	Tomate	Escola Agrícola Rainha dos Apóstolos
22	PeMAO	Manaus	Pepino	Ramal do Dantas
23	PeMAO	Manaus	Pepino	Ramal do Dantas
24	PeMAO	Manaus	Pepino	Ramal do Dantas
25	PeMAO	Manaus	Pepino	Ramal do Dantas
26	PeMAO	Manaus	Pepino	Ramal do Dantas
27	PeMAO	Manaus	Pepino	Ramal do Dantas
28	PeMAO	Manaus	Pepino	Ramal do Dantas
29	PeMAO	Manaus	Pepino	Ramal do Dantas

Tabela

Nº de isolados	População	Município	Hospedeiro	Local de coleta/Proprietário
30	PeMAO	Manaus	Pepino	Ramal do Dantas
31	PeMAO	Manaus	Pepino	Universidade Federal do Amazonas
32	PeMAO	Manaus	Pepino	Universidade Federal do Amazonas
33	PeMAO	Manaus	Pepino	Universidade Federal do Amazonas
34	PeMAO	Manaus	Pepino	Universidade Federal do Amazonas
35	PeMAO	Manaus	Pepino	Universidade Federal do Amazonas
36	PeMAO	Manaus	Pepino	Universidade Federal do Amazonas
37	PeMAO	Manaus	Pepino	Ramal do Dantas
38	PeMAO	Manaus	Pepino	Ramal do Dantas
39	PeMAO	Manaus	Pepino	Ramal do Dantas
40	PeMAO	Manaus	Pepino	Ramal do Dantas
41	PeMAO	Manaus	Pepino	Universidade Federal do Amazonas
42	PeMAO	Manaus	Pepino	Universidade Federal do Amazonas
43	PeMAO	Manaus	Pepino	Universidade Federal do Amazonas
44	MaMAO	Manaus	Mamão	Ramal Brasileirinho, km 10, Francinor Raimundo Araújo de Souza
45	MaMAO	Manaus	Mamão	Ramal Brasileirinho, km 10, Francinor Raimundo Araújo de Souza
46	MaMAO	Manaus	Mamão	Ramal Brasileirinho, km 10, Francinor Raimundo Araújo de Souza
47	MaMAO	Manaus	Mamão	Ramal Brasileirinho, km 10, Francinor Raimundo Araújo de Souza
48	MaMAO	Manaus	Mamão	Ramal Brasileirinho, km 10, Francinor Raimundo Araújo de Souza
49	MaMAO	Manaus	Mamão	Ramal do Pau Rosa
50	MaMAO	Manaus	Mamão	Ramal do Pau Rosa
51	MaMAO	Manaus	Mamão	Escola Agrícola Rainha dos Apóstolos
52	MaMAO	Manaus	Mamão	Escola Agrícola Rainha dos Apóstolos
53	MaMAO	Manaus	Mamão	Ramal do Pau Rosa
54	MaMAO	Manaus	Mamão	Escola Agrícola Rainha dos Apóstolos
55	MaMAO	Manaus	Mamão	Ramal do Pau Rosa
56	MaMAO	Manaus	Mamão	Ramal Brasileirinho, km 10, Francinor Raimundo Araújo de Souza
57	MaMAO	Manaus	Mamão	Ramal do Pau Rosa
58	MaMAO	Manaus	Mamão	Escola Agrícola Rainha dos Apóstolos
59	MaMAO	Manaus	Mamão	Escola Agrícola Rainha dos Apóstolos
60	MaMAO	Manaus	Mamão	Ramal Brasileirinho, km 10, Francinor Raimundo Araújo de Souza

Tabela 00000

Nº de isolados	População	Município	Hospedeiro	Local de coleta/Proprietário
61	MaMAO	Manaus	Mamão	Ramal do Pau Rosa
62	ToIRA	Irاندوبا	Tomate	Sítio do Gaúcho
63	ToIRA	Irاندوبا	Tomate	Sítio do Gaúcho
64	ToIRA	Irاندوبا	Tomate	Sítio do Gaúcho
65	ToIRA	Irاندوبا	Tomate	Sítio do Gaúcho
66	ToIRA	Irاندوبا	Tomate	Sítio do Gaúcho
67	ToIRA	Irاندوبا	Tomate	Sítio do Gaúcho
68	ToIRA	Irاندوبا	Tomate	Sítio do Galego
69	ToIRA	Irاندوبا	Tomate	Sítio do Galego
70	ToIRA	Irاندوبا	Tomate	Sítio do Galego
71	ToIRA	Irاندوبا	Tomate	Sítio do Galego
72	ToIRA	Irاندوبا	Tomate	Maria do Carmo Pacheco de Souza
73	ToIRA	Irاندوبا	Tomate	Sebastião Pereira
74	ToIRA	Irاندوبا	Tomate	Maria do Carmo Pacheco de Souza
75	ToIRA	Irاندوبا	Tomate	Maria do Carmo Pacheco de Souza
76	ToIRA	Irاندوبا	Tomate	Sítio do Gaúcho
77	ToIRA	Irاندوبا	Tomate	Sítio do Galego
78	ToIRA	Irاندوبا	Tomate	Sítio do Galego
79	ToIRA	Irاندوبا	Tomate	Maria do Carmo Pacheco de Souza
80	ToIRA	Irاندوبا	Tomate	Sítio do Galego
81	ToIRA	Irاندوبا	Tomate	Sítio do Gaúcho
82	ToIRA	Irاندوبا	Tomate	Maria do Carmo Pacheco de Souza
83	PeIRA	Irاندوبا	Pepino	Sítio do Catarino, Jaime
84	PeIRA	Irاندوبا	Pepino	Maria do Carmo Pacheco de Souza
85	PeIRA	Irاندوبا	Pepino	Maria do Carmo Pacheco de Souza
86	PeIRA	Irاندوبا	Pepino	Sítio do Catarino, Jaime
87	PeIRA	Irاندوبا	Pepino	Sítio do Rayol
88	PeIRA	Irاندوبا	Pepino	Sítio do Rayol
89	PeIRA	Irاندوبا	Pepino	Sebastião Pereira

Tabela

Nº de isolados	População	Município	Hospedeiro	Local de coleta/Proprietário
90	PeIRA	Irاندوبا	Pepino	Sebastião Pereira
91	PeIRA	Irاندوبا	Pepino	Maria do Carmo Pacheco de Souza
92	PeIRA	Irاندوبا	Pepino	Maria do Carmo Pacheco de Souza
93	PeIRA	Irاندوبا	Pepino	Maria do Carmo Pacheco de Souza
94	PeIRA	Irاندوبا	Pepino	Sebastião Pereira
95	PeIRA	Irاندوبا	Pepino	Sebastião Pereira
96	PeIRA	Irاندوبا	Pepino	Maria do Carmo Pacheco de Souza
97	PeIRA	Irاندوبا	Pepino	Sítio do Rayol
98	PeIRA	Irاندوبا	Pepino	Sítio do Rayol
99	PeIRA	Irاندوبا	Pepino	Sítio do Rayol
100	PeIRA	Irاندوبا	Pepino	Sítio do Catarino, Jaime
101	MaIRA	Irاندوبا	Mamão	Sítio do Gaúcho
102	MaIRA	Irاندوبا	Mamão	Sítio do Galego
103	MaIRA	Irاندوبا	Mamão	Sítio do Catarino, Jaime
104	MaIRA	Irاندوبا	Mamão	Sítio do Catarino, Jaime
105	MaIRA	Irاندوبا	Mamão	Sítio do Macaco
106	MaIRA	Irاندوبا	Mamão	Jose Lopes de Souza
107	MaIRA	Irاندوبا	Mamão	Jose Lopes de Souza
108	MaIRA	Irاندوبا	Mamão	Antonio Paulo
109	MaIRA	Irاندوبا	Mamão	Maria do Carmo Pacheco de Souza
110	MaIRA	Irاندوبا	Mamão	Sítio do Macaco
111	MaIRA	Irاندوبا	Mamão	Sítio do Macaco
112	MaIRA	Irاندوبا	Mamão	Jose Lopes de Souza
113	MaIRA	Irاندوبا	Mamão	Sítio do Gaúcho
114	MaIRA	Irاندوبا	Mamão	Jose Lopes de Souza
115	MaIRA	Irاندوبا	Mamão	Sítio do Gaúcho
116	MaIRA	Irاندوبا	Mamão	Sítio do Galego
117	MaIRA	Irاندوبا	Mamão	Luis Braga
118	MaIRA	Irاندوبا	Mamão	Luis Braga

Tabela

Nº de isolados	População	Município	Hospedeiro	Local de coleta/Proprietário
119	MaIRA	Iranduba	Mamão	Jose Lopes de Souza
120	MaIRA	Iranduba	Mamão	Jose Lopes de Souza
121	MaIRA	Iranduba	Mamão	Jose Lopes de Souza
122	MaIRA	Iranduba	Mamão	Jose Lopes de Souza
123	MaIRA	Iranduba	Mamão	Jose Lopes de Souza
124	MaIRA	Iranduba	Mamão	Jose Lopes de Souza
125	MaIRA	Iranduba	Mamão	Jose Lopes de Souza
126	ToPF	Presidente Figueiredo	Tomate	Lino Alves Lira Lira
127	ToPF	Presidente Figueiredo	Tomate	Lino Alves Lira Lira
128	ToPF	Presidente Figueiredo	Tomate	Lino Alves Lira Lira
129	ToPF	Presidente Figueiredo	Tomate	Lino Alves Lira Lira
130	ToPF	Presidente Figueiredo	Tomate	Lino Alves Lira Lira
131	ToPF	Presidente Figueiredo	Tomate	Lino Alves Lira Lira
132	ToPF	Presidente Figueiredo	Tomate	Lino Alves Lira Lira
133	PePF	Presidente Figueiredo	Pepino	Ramal boa esperança, sítio do Marcelo
134	PePF	Presidente Figueiredo	Pepino	Ramal boa esperança, sítio do Marcelo
135	PePF	Presidente Figueiredo	Pepino	Ramal boa esperança, sítio do Marcelo
136	PePF	Presidente Figueiredo	Pepino	Ramal boa esperança, sítio do Marcelo
137	PePF	Presidente Figueiredo	Pepino	Ramal boa esperança, sítio do Marcelo
138	PePF	Presidente Figueiredo	Pepino	Ramal boa esperança, sítio do Adão
139	PePF	Presidente Figueiredo	Pepino	Ramal boa esperança, sítio do Adão
140	PePF	Presidente Figueiredo	Pepino	Ramal boa esperança, sítio do Marcelo
141	PePF	Presidente Figueiredo	Pepino	Ramal boa esperança, sítio do Adão
142	PePF	Presidente Figueiredo	Pepino	Ramal boa esperança, sítio do Adão
143	PePF	Presidente Figueiredo	Pepino	Ramal boa esperança, sítio do Marcelo
144	PePF	Presidente Figueiredo	Pepino	Ramal boa esperança, sítio do Adão
145	PePF	Presidente Figueiredo	Pepino	Ramal boa esperança, sítio do Adão
146	PePF	Presidente Figueiredo	Pepino	Ramal boa esperança, sítio do Adão
147	PePF	Presidente Figueiredo	Pepino	Ramal boa esperança, sítio do Marcelo
148	PePF	Presidente Figueiredo	Pepino	Ramal boa esperança, sítio do Adão
149	PePF	Presidente Figueiredo	Pepino	Ramal boa esperança, sítio do Marcelo

Tabela

Nº de isolados	População	Município	Hospedeiro	Local de coleta/Proprietário
150	PePF	Presidente Figueiredo	Pepino	Ramal boa esperança, sítio do Marcelo
151	MaPF	Presidente Figueiredo	Mamão	Ramal boa esperança, sítio do ariel
152	MaPF	Presidente Figueiredo	Mamão	Ramal boa esperança, sítio do ariel
153	MaPF	Presidente Figueiredo	Mamão	Ramal boa esperança, sítio do ariel
154	MaPF	Presidente Figueiredo	Mamão	Jose Ribamar Alves Gouveia
155	MaPF	Presidente Figueiredo	Mamão	Lino Alves Lira Lira
156	MaPF	Presidente Figueiredo	Mamão	Ramal boa esperança, sítio do ariel
157	MaPF	Presidente Figueiredo	Mamão	Jose Ribamar Alves Gouveia
158	MaPF	Presidente Figueiredo	Mamão	Jose Ribamar Alves Gouveia
159	MaPF	Presidente Figueiredo	Mamão	Lino Alves Lira
160	MaPF	Presidente Figueiredo	Mamão	Ramal boa esperança, sítio do ariel
161	MaPF	Presidente Figueiredo	Mamão	Jose Ribamar Alves Gouveia
162	MaPF	Presidente Figueiredo	Mamão	Jose Ribamar Alves Gouveia
163	MaPF	Presidente Figueiredo	Mamão	Lino Alves Lira Lira
164	MaPF	Presidente Figueiredo	Mamão	Ramal boa esperança, sítio do ariel
165	MaPF	Presidente Figueiredo	Mamão	Jose Ribamar Alves Gouveia
166	MaPF	Presidente Figueiredo	Mamão	Lino Alves Lira
167	MaPF	Presidente Figueiredo	Mamão	Lino Alves Lira
168	MaPF	Presidente Figueiredo	Mamão	Lino Alves Lira
169	MaPF	Presidente Figueiredo	Mamão	Ramal boa esperança, sítio do Ariel

