



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM AGRONOMIA



**Análise de espécies de *Curvularia* associadas à cultura do
inhame no estado de Alagoas**

EDLENE MARIA DA SILVA MORAES

RIO LARGO - AL

2009

EDLENE MARIA DA SILVA MORAES

**Análise de espécies de *Curvularia* associadas à cultura do
inhame no estado de Alagoas**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre à Coordenação do Curso de Mestrado em Agronomia (Área de Concentração em Proteção de Plantas), do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas.

Orientação:

Prof. Dr. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti

RIO LARGO - AL

2009

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária: Janaina Xisto de Barros Lima

- M727a Moraes, Edlene Maria da Silva.
Análise de espécies de *Curvalaria* associadas à cultura do inhame no Estado de Alagoas. – 2009.
75 f. : il.
- Dissertação (mestrado em Agronomia : Produção Vegetal e Proteção de Plantas) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias, Rio Largo, 2009.
- Inclui bibliografia.
1. Inhame – Doenças – Alagoas. 2. *Dioscorea cayenensis* Lam.
3. *Curvalaria*. Variabilidade genética. I. Título.

CDU: 633.496

TERMO DE APROVAÇÃO
RIO LARGO, ESTADO DE ALAGOAS
SETEMBRO DE 2009

EDLENE MARIA DA SILVA MORAES
0710M03

**Análise de espécies de *Curvularia* associadas à cultura do
inhame no estado de Alagoas**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre do Curso de Pós-graduação em Agronomia, Área de Concentração em Proteção de Plantas, da Universidade Federal de Alagoas, pela seguinte banca examinadora:

Orientador:


Prof. Dr. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti
DFP, UFV / CECA, UFAL

Examinadores:


Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima
Laboratório de Fitopatologia, CECA, UFAL


Prof.ª Dr.ª Maria de Fátima Silva Muniz
Laboratório de Fitopatologia, CECA, UFAL

Prof. Dr. Marcos Câmara
UFRPE

25 de Setembro de 2009

*A Deus,
Pela dádiva da vida e por seu cuidado
e amor por mim.*

OFEREÇO

*A Geová Ferreira de Moraes e
Maria Edileuza da Silva Moraes, meus pais,
Ao Geraldo Filho, meu companheiro,
E a toda minha família,
Pela força, paciência e compreensão durante minha ausência.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Alagoas (UFAL), através do Centro de Ciências Agrárias (CECA), por me possibilitar a realização desse mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) pelo financiamento da bolsa de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão das bolsas de Produtividade em Pesquisa de Eduardo S.G. Mizubuti e Gaus S.A. Lima.

Ao Prof. Dr. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti, pela orientação na condução deste trabalho, e pelo exemplo de profissionalismo e ética.

Ao Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima, pela co-orientação e principalmente pela confiança em mim depositada ao me proporcionar a oportunidade de desenvolver esse trabalho em outra instituição de ensino.

A todos os Professores que compõem o curso de mestrado em Agronomia da Universidade Federal de Alagoas, pela contribuição na minha formação profissional.

Ao secretário do Curso de Pós-Graduação em Agronomia Geraldo Lima, pela paciência, amizade e dedicação.

Aos membros da banca examinadora, que se dispuseram a participar da avaliação dessa dissertação, contribuindo com sugestões para o aprimoramento do trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Fitopatologia do CECA/UFAL, em especial a Leonardo Barbosa e Mariote Netto pelo companheirismo e auxílio.

A todos os funcionários do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa (DFP/UFV) pela contribuição concedida.

Ao Prof. Dr. Olinto Liparini (UFV), pela amizade e pela colaboração neste trabalho.

A todos os membros do BIOPOP/UFV (Laboratório de Biologia de Populações de Fitopatógenos): Braz Júnior, Camila Santana, Carine Rezende, Carlos Bragança, Lahyre Gomes, Leonardo Miranda, Robson Nascimento, Sarah Galvão e Saulo Oliveira, por todo auxílio para realização deste trabalho, pela companhia, amizade, por cada momento e por terem se constituído verdadeiros irmãos. Vocês conquistaram um lugar especial no meu coração.

Ao Dr. Valdir Lourenço Júnior e à Dr^a Tatiana Tozzi, pela amizade e auxílio profissional. Sucesso!

E a todos que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

*Sinceros votos de gratidão a todos: sem vocês esse trabalho não seria possível.
Amo vocês!*

*"Bem-aventurado o homem que acha
sabedoria, e o homem que adquire conhecimento."*

Provérbios 3. 13

RESUMO

MORAES, Edlene Maria da Silva, Universidade Federal de Alagoas, setembro de 2009. **Análise de espécies de *Curvularia* associadas à cultura do inhame no estado de Alagoas.** Orientador: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti. Co-orientador: Gaus Silvestre de Andrade Lima.

O inhame (*Dioscorea cayennensis* Lam.) é cultura importante no Nordeste do Brasil, principalmente nos estados de Alagoas, Pernambuco e Paraíba, que se destacam como os maiores produtores. A cultura é afetada por patógenos que reduzem a produtividade. A queima das folhas, causada pelo fungo *Curvularia eragrostidis*, pode causar perdas significativa de produção. Considerando o contexto sócio-econômico no qual se insere a cultura do inhame, o plantio de variedades resistentes é a estratégia mais adequada de controle da queima foliar. Contudo, o sucesso desta estratégia depende, entre outros fatores, do conhecimento da variabilidade genética do patógeno. Nos anos de 2005 e 2008, coletaram-se amostras de folhas afetadas nos municípios de Chã Preta, Paulo Jacinto e Viçosa e 73 isolados foram obtidos e baseado em características morfológicas, foram identificados como *C. eragrostidis*. Todos os isolados utilizados no teste de patogenicidade foram patogênicos e houve variação quanto aos valores de AACPD ($P=0,02$). Quando diferentes isolados foram pareados em meio de cultura, a maioria mostrou reação de compatibilidade micelial. Análises de similaridade e filogenéticas confirmaram a identificação da espécie associada à queima foliar do inhame. O marcador molecular AFLP foi utilizado com o objetivo de determinar a estrutura genética da população de *C. eragrostidis*. A diversidade gênica total foi alta ($H_t=0,31$) com baixa diferenciação entre as populações ($G_{st}=0,06$). Não foi detectada estruturação da população conforme os municípios. A variabilidade genética dentro das populações de *C. eragrostidis* estudada foi alta.

Palavras chave: Queima das folhas. Variabilidade genética. Origem geográfica.

ABSTRACT

MORAES, Edlene Maria da Silva, Universidade Federal de Alagoas, September, 2009.
Analysis of species of *Curvularia* associated with yam in Alagoas State. Adviser:
Eduardo Seiti Gomide Mizubuti. Co-adviser: Gaus Silvestre de Andrade Lima.

The yam (*Dioscorea cayennensis* Lam.) is an important staple crop in the Northeast region of Brazil, mainly in the states of Alagoas, Pernambuco, and Paraíba, the highest producing areas in the region. The crop is affected by pathogens that reduce yield and leaf blight, caused by the fungus *Curvularia eragrostidis*, can cause considerable crop losses. In the socio-economic context in which this crop is placed, the use of resistant varieties is the most effective control strategy. However, for this strategy to be successful, knowledge of the genetic variability of the pathogen is required. Samples of infected yam leaves were collected in 2005 and 2008, from fields in Chã Preta, Paulo Jacinto, and Viçosa and 73 isolates were obtained. Based on morphological characteristics all isolates were identified as *C. eragrostidis*. All isolates were pathogenic to yam and there were differences in the values of area under the disease progress curve ($P= 0.02$). When different isolates were paired in culture, mycelial compatibility in the majority of pairings. Similarity and phylogenetic analyses supported the identification of the species associated to yam leaf blight. The AFLP markers were used to investigate the genetic structure of the population of *C. eragrostidis*. Gene diversity was high ($H_t = 0.31$) and there was low differentiation between populations ($G_{st} = 0.06$). The population was not structured according to geographical origin. The genetic variability within populations of *C. eragrostidis* was high.

Keywords: Leaf blight. Genetic variability. Geographical origin.

SUMÁRIO

Capítulo I – INTRODUÇÃO GERAL.....	11
1 Introdução Geral.....	12
1.1 A cultura do inhame.....	12
1.2 Aspectos fitossanitários da cultura de inhame.....	13
1.2.1 Queima das folhas do inhame.....	14
1.3 Estrutura genética de populações de fitopatógenos.....	17
2 Literatura citada.....	21
3 Recursos da internet.....	24
Capítulo II - LEVANTAMENTO DE ESPÉCIES DE <i>Curvularia</i> ASSOCIADAS A INHAME NO ESTADO DE ALAGOAS.....	25
Resumo.....	26
Abstract.....	27
1 Introdução.....	28
2 Material e Métodos.....	31
2.1 Obtenção dos Isolados.....	31
2.2 Testes de Patogenicidade e progresso da doença.....	31
2.3 Análise da morfologia de conídios.....	32
2.4 Compatibilidade vegetativa.....	33
2.5 Extração de DNA, amplificação, purificação e sequenciamento das regiões ITS e β-tubulina.....	33
2.6 Análises filogenéticas.....	35
2.6.1 ITS.....	35
2.6.2 β -tubulina.....	36
3 Resultados.....	36
3.1 Isolados.....	36
3.2 Teste de Patogenicidade e progresso da doença.....	36
3.3 Análise da morfologia de conídios.....	36
3.4 Compatibilidade vegetativa.....	37
3.5 Amplificação e sequenciamento da região ITS e β-tubulina.....	37
3.6 Análises filogenéticas.....	38
3.6.1 Análise filogenética com base na região ITS.....	38
3.6.2 Análise filogenética com base na região da β -tubulina.....	38
4 Discussão.....	38
5 Agradecimentos.....	40
6 Literatura citada.....	41
7 Recursos da internet.....	43
8 Lista de tabelas e figuras.....	44

	CAPÍTULO III ANÁLISE DA ESTRUTURA GENÉTICA DA POPULAÇÃO DE <i>Curvularia eragrostidis</i> ASSOCIADA A INHAME NO ESTADO DE ALAGOAS.....	53
	Resumo.....	54
	Abstract.....	55
1	Introdução.....	56
2	Material e Métodos.....	60
2.1	Isolados.....	60
2.2	Extração de DNA.....	60
2.3	Reações de AFLP.....	61
2.4	Coloração do gel.....	61
2.5	Análise dos dados.....	62
3	Resultados.....	63
4	Discussão.....	64
5	Agradecimentos.....	66
6	Literatura citada.....	67
7	Recurso da internet.....	69
8	Lista de tabelas e figuras.....	70
	Conclusões Gerais.....	74

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 A cultura do inhame

O inhame (*Dioscorea* spp., Ordem Dioscoreales, Família Dioscoreaceae) constitui um dos principais alimentos em regiões tropicais (Mafra, 1986) e a produção mundial, no ano de 2004, foi de aproximadamente 40 milhões de toneladas (FAO, 2005). A Nigéria destaca-se como o maior produtor (27,0 milhões de t), seguida por Gana (3,9 milhões de t), enquanto o Brasil ocupa a décima segunda posição. O Brasil é o segundo maior produtor dessa hortaliça na América Latina com cerca de 230 mil t/ano (FAO, 2005). A região Nordeste é responsável pela maior produção de inhame, com 47,3 mil t (Santos e Macêdo, 2002). Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia e Maranhão são os principais produtores dessa Dioscoreaceae na região. O estado de Alagoas é responsável pela quinta maior produção do país, com 27,172 t e área plantada de 2.292 ha. Os principais municípios produtores são Chã Preta, Paulo Jacinto, Viçosa (Vale do Paraíba), Taquarana e União dos Palmares (IBGE, 2008).

Entre as 600 espécies do gênero *Dioscorea*, estima-se que ocorram no Brasil entre 150 e 200, mas a maioria é pouco estudada (Pedralli, 2002). Somente 14 são cultivadas, por produzirem túberas comestíveis, com destaque para *D. cayennensis* (Lam.), *D. alata* (L.), *D. rotundata* (Poir.) e *D. esculenta* (Lour.) Burk. (COPR, 1978). Nos campos de produção localizados no Nordeste, a espécie predominante é a *D. cayennensis* (Moura, 1997), de hábito trepador e de caule herbáceo. Uma única cultivar, conhecida por Da Costa, é a mais plantada e é considerada como de alto valor econômico.

O ciclo do inhame tem quatro estádios fenológicos: dormência, vegetativo, reprodutivo e maturação fisiológica (Santos, 1996). A dormência fisiológica corresponde ao período do plantio à brotação das túberas-semente. O estádio vegetativo, que corresponde ao período da brotação ao início do florescimento, ocorre entre 20 e 180 dias após o plantio (DAP) e caracteriza-se por quatro fases morfológicas: brotação (20 a 80 DAP), surgimento das primeiras folhas (80 a 90 DAP), formação de ramos primários (90 a 120 DAP) e formação de ramos secundários (120 a 150 DAP). Entre o terceiro e o quarto mês de plantio, com o aparecimento dos ramos primários, inicia-se a tuberização, que se estende até o final do ciclo fisiológico da cultura. No estádio

reprodutivo, período do início da floração ao secamento das flores (180 a 210 DAP), ocorre a maturação parcial da túbera, que pode ser colhida para fim comercial, por meio da “capação”, técnica tradicional para produção de sementes. O estágio de maturação corresponde ao período do término da floração à colheita (210 a 270 DAP). Uma planta de inhame produz dois tipos de túberas: as comerciais, colhidas seis a sete meses após o plantio, e as sementes, colhidas dois meses após as comerciais (Mafra, 1986).

O inhame é um produto agrícola de alto valor econômico para os mercados interno ou externo, que movimenta e beneficia a economia das zonas produtoras. A importância alimentar do inhame decorre do seu alto valor nutritivo e energético (Santos e Macêdo, 2002), pois é rico em carboidratos e vitaminas do complexo B (Moura, 2005), vitamina A, ácido ascórbico e grãos de amido (responsáveis pela alta digestibilidade).

1.2 Aspectos fitossanitários da cultura de inhame

Apesar de o inhame ser plenamente adaptado às condições edafo-climáticas do Nordeste brasileiro e ser cultura de fácil manejo (Mafra, 1986), as doenças são limitantes à produção, pois podem reduzir a produtividade e o valor unitário das túberas destinadas ao comércio interno e às exportações (Moura, 1997; Santos, 1996).

A qualidade das túberas sementes em geral é baixa, com altos índices de infestação pelos nematóides *Scutellonema bradys* (Steiner e LeHew) Andrassy ou *Pratylenchus coffeae* (Zimmermann) Filipjev e Stekhoven, causadores da doença casca preta; e *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White) Chitwood, *M. javanica* (Treub) Chitwood e *M. arenaria* (Neal) Chitwood, responsáveis pela meloidoginose, conhecida vulgarmente por bolba do inhame. Infestações múltiplas envolvendo um nematóide causador da casca preta e outro da meloidoginose são frequentes (Moura, 2002).

As podridões causadas por *Penicillium sclerotigenum* (Yamamoto) e *Rhizopus oryzae* (Went e Prinsen Geerl) afetam túberas em diferentes situações (Moura, 1987; Moura, 2002). Além destas, a cultura também pode ser afetada pela rizoctoniose causada por *Rhizoctonia solani* (Kühn), que foi relatada pela primeira vez infectando caule de plantas de inhame no Brasil por Silva et al. (2000).

A antracnose, causada pelo fungo *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.), afeta principalmente a espécie *D. alata*, na forma de manchas foliares de coloração marrom avermelhada nas folhas e caule, que podem coalescer formando grandes áreas necrosadas e, conseqüentemente, reduzir de forma expressiva a produção de túberas (Coelho, 2002). A patogenicidade de *C. gloeosporioides* em *D. cayennensis* nunca foi comprovada, o que leva a crer que se trata de um agente secundário em lesões provocadas por *C. eragrostidis* (Moura, 1997).

Problemas bióticos de importância econômica não determinada são as viroses. O mosaico das folhas, ou virose do inhame, causado por um *Potyvirus* (*Dasheen mosaic virus*) não tem causado sérios problemas para a cultura no Brasil (Moura, 2002). Na África Central e Ocidental há a incidência de outras viroses como as causadas pelos *Potyvirus* (*Yam mosaic virus* e *Dioscorea alata virus*), o *Badnavirus* (*Dioscorea alata virus*), e o *Cucumovirus* (*Cucumber mosaic virus*) (IITA, 2009).

1.2.1. Queima das folhas do inhame

Na parte aérea, a principal doença é a queima das folhas, também conhecida por requeima, pinta preta e varíola (Moura, 1997), que tem como agente causal o fungo *Curvularia eragrostidis* (Henn.) Meyer. A queima é uma das principais doenças do inhame, chegando a reduzir em 35 a 40% o peso das túberas comerciais (EMATER/IPA, 1985). Esta doença foi reportada pela primeira vez no Brasil, em Pernambuco, em 1964 (Medeiros e Aquino, 1964).

A espécie *Cochliobolus eragrostidis* (Tsuda e Ueyama) Sivan. (anamorfo: *Curvularia eragrostidis*) pertence ao Filo Ascomycota; Classe Loculoascomycetes; Ordem Pleosporales; Família Pleosporaceae (Alexopoulos, 1996). Em meio de cultura, a fase anamórfica apresenta conidióforos com dimensões de 521 x 6 µm (Moura, 2005), solitários ou em grupos, simples ou raramente ramificados, retos a flexuosos, algumas vezes geniculados, multiseptados, com coloração marrom, variando no comprimento, com aproximadamente 6 µm de espessura. Os conídios têm forma elipsoidal ou ovóides, com dimensões de 18 – 37 x 11 – 20 µm, com três septos, sendo que o septo mediano apresenta-se com uma banda espessa e escura, as células centrais com coloração marrom escura e as células externas de coloração marrom pálida (Sivanesan, 1987). Em

meio de cultura BDA forma colônias circulares de aspecto cotonoso e de coloração negra (Moura, 2005).

A fase teleomórfica, *Cochliobolus eragrostidis* é observada apenas em condições de laboratório. Os ascomas são superficiais, globosos a sub-globosos, escuros, com 375 – 750 µm de largura, com bico ostiolar protuberante, desenvolvendo sobre estroma colunar ou plano, firmemente aderido ao substrato na base; bico ostiolar com dimensões de 250 – 1125 x 85 – 190 µm e ápice hialino. Ascas bitunicadas, a maioria cilíndrica, com oito ascósporos, têm dimensões de 150 – 240 x 12,5 – 22 µm e pseudoparáfises hialinas. Os ascósporos são hialinos, filiformes ou flageliformes, com 12 a 22 septos paralelamente a frouxamente espiralados nas ascas ou raramente espiralados em uma hélice, e têm dimensões de 175 – 240 x 3,8 – 6,3 µm, com ou sem uma fina camada mucilaginosa (Sivanesan, 1990).

Os sintomas primários da queima das folhas são manchas foliares necróticas, de coloração marrom-escura, que tendem para o formato circular e atingem, em média, 2 a 3 cm de diâmetro, frequentemente circundadas por halos amarelos. É comum a coalescência de manchas, formando grandes áreas necrosadas. Quando incide sobre plantas jovens, que possuem folhas em desenvolvimento, o crescimento é afetado e as folhas retorcidas apresentam um quadro típico de crestamento, o que resulta em perdas elevadas. Em menor frequência, ocorrem lesões nos pecíolos e ramos. Os sintomas reflexos são o desenvolvimento reduzido da planta e a desfolha, com a redução drástica no tamanho das túberas comerciais e sementes (EMATER/IPA, 1985; Moura, 1997).

Sob condições ambientais favoráveis, o patógeno pode provocar, em pouco tempo, a destruição completa dos campos de cultivo, com o aparecimento de grandes áreas de plantas queimadas e mortas (Michereff et al., 2000). Temperaturas noturnas de 20 a 22°C com umidade relativa de 100% e temperaturas diurnas, na faixa de 25 a 28°C, com umidade relativa de 65%, e presença de vento, são consideradas condições favoráveis a epidemias de queima das folhas. A dispersão dos esporos de *C. eragrostidis* ocorre principalmente pelo vento (Sivanesan, 1990) e maior incidência e severidade ocorrem em épocas chuvosas e em culturas irrigadas por aspersão quando as perdas podem atingir 100%, caso medidas preventivas não sejam aplicadas (Moura, 2002; Moura, 2005). Os restos culturais e as túberas-semente infestadas constituem as

principais fontes de inóculo primário de *C. eragrostidis* na cultura do inhame (Mignucci et al., 1985). Contudo, é provável que o inóculo possa ser proveniente de outros hospedeiros, uma vez que *C. eragrostidis* é relatada por ocorrer em espécies botânicas de outras famílias como sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench (*S. vulgare* Pers.)), batata doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), amendoim (*Arachis hypogea* L.), abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merr.) (Menezes e Oliveira, 1993), arroz (*Oryza sativa* L.) (Rashid, 2001), chá (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) (Dasgupta et al., 2005) e tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Peregrine e Ahmad, 1982).

Aplicações de fungicidas protetores são realizadas com o propósito de reduzir as perdas de produção decorrentes da queima foliar. Atualmente, como não existem fungicidas registrados para a cultura do inhame junto ao Ministério da Agricultura (Agrofit, 2009), o controle da queima das folhas é baseado, principalmente, em pulverizações de fungicidas como maneb, mancozeb e iprodione, realizadas logo após o aparecimento dos primeiros sintomas (Santos, 1996). Observações quanto à sensibilidade de isolados de *C. eragrostidis* a mancozeb e iprodione foram realizadas e todos os isolados foram sensíveis a esses produtos, em testes realizados *in vitro* e *in vivo* (Paula, 2000).

Práticas complementares como tratamento das túberas-semente com fungicidas antes do plantio e eliminação de restos culturais também são recomendadas (Mignucci et al., 1985). Uma alternativa ao uso dos fungicidas sintéticos são os óleos essenciais. Kishore et al. (2007) usaram óleo de canela (*Cinnamomum zeylanicum* J.Presl) e cravo (*Syzygium aromaticum* (L.) Merrill & Perry) no controle *in vitro* de *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., *Aspergillus flavus* [Johann Heinrich Friedrich Link](#), *Fusarium moniliforme* Sheldon, *F. pallidoroseum* (Cooke) Sacc. e *Phoma sorghina* (Sacc.) Boerema Dorenbosch & van Kest, e observaram completa inibição de crescimento na presença de citral (componente dos óleos). No entanto, o uso de óleos essenciais no campo normalmente não é prática bem sucedida, pelo fato de serem voláteis na natureza, tornando-se rapidamente ineficazes. Além disso, a maioria tem maior efeito fungistático que fungicida. A utilização de extratos de plantas medicinais com propriedades antifúngicas destaca-se também como alternativa potencial para substituir a proteção tradicional promovida pela aplicação de fungicidas químicos e pode ser agregada às demais práticas de manejo integrado de doenças e

contribuir para atender à crescente demanda internacional e nacional por produtos orgânicos (Carvalho et al., 2002). Apesar de promissoras, estas práticas ainda necessitam de comprovação de eficácia em condições de campo, em larga escala espaço-temporal.

Considerando o contexto sócio-econômico de exploração da cultura do inhame na região Nordeste do Brasil, é necessário controlar a queima foliar sem depender da aplicação de fungicidas ou com quantidades mínimas destes compostos. O plantio de variedades resistentes é a medida de controle mais eficiente para o manejo da queima foliar. Porém, para que programas de melhoramento sejam bem sucedidos é necessário conhecer a estrutura genética da população de *C. eragrostidis*.

1.3 Estrutura genética de populações de fitopatógenos

A estrutura genética de populações de fitopatógenos refere-se à quantidade de variabilidade genética existente e de sua distribuição dentro de e entre populações (Milgroom, 1995). O conhecimento da estrutura genética é componente essencial no estudo da biologia de populações de fitopatógenos. A variação genética é importante para o processo evolutivo, por essa razão, a compreensão dos mecanismos evolutivos que atuam na população de patógenos é o objetivo comum em estudos de biologia de populações. Do ponto de vista evolutivo, a variabilidade genética das populações é importante, pois determina o potencial de adaptação do organismo às diferentes condições. Do ponto de vista epidemiológico, a variabilidade patogênica tem implicações diretas para o manejo da doença. Por exemplo, a maior agressividade de isolados de um patógeno implica em maior quantidade de fungicidas para controlar a doença (Kato et al., 1997) ou no manejo estratégico de variedades resistentes (McDonald e Linde, 2002a). Sensibilidade a fungicidas e desenvolvimento de resistência são fortemente influenciados pelos processos evolutivos que afetam populações de fitopatógenos (Wolfe e Caten, 1987; Milgroom e Fry, 1997; Gisi et al., 2002; Milgroom e Peever, 2003). Após a introdução de um novo agente seletivo como um gene *R* ou fungicida, novas mutações no gene correspondente de avirulência (*Avr*) ou no gene alvo do fungicida podem aumentar a variabilidade genética para virulência ou sensibilidade ao fungicida (Stukenbrock e McDonald, 2009).

Uma vez compreendidas as maneiras como populações de fitopatógenos mantêm a variabilidade genética, é possível inferir sobre a taxa com a qual estas populações evoluem e sobre a durabilidade de medidas de controle (McDonald e Linde, 2002a). A vida útil de fungicidas é determinada, em grande parte, pela taxa de evolução de populações de fitopatógenos e a rapidez com que variantes tolerantes ao produto são selecionados numa população (Anderson, 2005; Grünwald et al., 2006; Van den Bosch e Gilligan, 2008). Em fungos fitopatogênicos, recombinação e mutação são as principais fontes de variabilidade genética (Burdon e Silk, 1997). Em populações de estrutura panmítica (acasalamento aleatório) ocorre maior diversidade genotípica e, em tese, há maiores chances de seleção de isolados resistentes que em populações de estrutura clonal (organismos que se reproduzem exclusivamente ou preferencialmente de modo assexuado) (Grünwald et al., 2006). Em adição ao modo de reprodução, mutação e migração são também muito importantes. Mutações podem alterar a sensibilidade do indivíduo a fungicidas que, sob seleção, pode contribuir para transferir a sensibilidade à população inteira. Para patógenos que se reproduzem predominantemente de forma assexuada, como *C. eragrostidis*, a taxa de mutação desempenha papel importante na evolução das populações ao criar variantes resistentes e que poderão ser selecionadas com a aplicação de fungicidas (Gisi e Sierotzki, 2008; Van den Bosch e Gilligan, 2008), como aconteceu com *Alternaria alternata*, *A. brassicicola* (Schwein.) Wiltshire e *A. dauci* (J.G. Kühn) J.W. Groves e Skolko que adquiriram resistência ao fungicida iprodione (Huang e Levy, 1995, Solel et al., 1996).

Em contraposição, o uso de fungicidas pode afetar a evolução e a estrutura de populações de fitopatógenos. No caso de *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (DC.) Speer, ocorreu redução da variabilidade genética de populações e houve predominância de isolados resistentes, quando com aplicações sucessivas do fungicida fenpropimorph (O'Hara et al., 2000). Neste exemplo, o potencial evolutivo da população foi alterado com a redução da variabilidade genética (resultado de seleção) e a estrutura populacional mudou de panmítica para clonal. O uso racional de fungicidas efetivos, associado ao plantio de variedades com resistência duradoura, contribui para aumentar a eficiência do controle da doença.

No Brasil, as informações na literatura sobre a sensibilidade de *C. eragrostidis* aos principais fungicidas empregados para o controle da pinta preta, são limitadas.

Conseqüentemente, não há informações sobre a evolução da resistência a fungicidas nas populações deste patógeno. A sensibilidade de *C. lunata* ao tricyclazole foi observada com o bloqueio da biossíntese de melanina, causando o acúmulo de metabólitos. O gene 1,3,8-trihidroxinaphtileno redutase (*3HNR*), associado com a via da melanina de *C. lunata*, foi identificado e caracterizado (Rizner e Wheeler, 2003). Até o presente, não há fungicida sistêmico registrado no Ministério da Agricultura para controlar a queima das folhas do inhame, causada por *C. eragrostidis*.

A durabilidade de variedades resistentes pode ser estimada com base em informações da estrutura genética de populações de fitopatógenos (McDonald e Linde, 2002a). Por exemplo, a durabilidade do gene *Xa7*, que confere resistência de arroz à queima bacteriana (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Ishiyama 1922) Swings et al.), foi determinada com base em estudo da estrutura genética da população da bactéria em conjunto com estudos de variabilidade patogênica, principalmente de atributos relacionados à adaptabilidade do patógeno (Vera Cruz et al., 2000). Visando prolongar a vida útil de variedades resistentes, a estratégia de seu uso é determinada com base na quantidade de variabilidade genética e na sua distribuição. Um exemplo clássico é o sistema de recomendação de variedades de trigo resistentes à ferrugem do colmo nos Estados Unidos, feita com base na distribuição de patótipos de *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* Pers. (Frey et al., 1973). No entanto, o sucesso da estratégia de plantio de materiais com resistência é, frequentemente, comprometido devido à variabilidade patogênica, evidenciada pelo surgimento de novas raças ou patótipos de *P. graminis* f.sp. *tritici* (Visser et al., 2009). O maior risco para a produção de trigo é a perda da efetividade do gene *Sr31*, que é responsável pela resistência a ferrugem causada pela raça Ug99. O conhecimento da raça auxilia na geração de informação em relação à virulência e sua frequência e distribuição espacial e temporal (Admassu et al., 2009).

Programas de melhoramento visando resistência a patógenos podem ser orientados pelos conhecimentos da estrutura genética de populações de patógenos. McDonald e Linde (2002b) propuseram um modelo para auxiliar na definição de estratégias de melhoramento visando aumentar a durabilidade da resistência, que se baseia no potencial evolutivo de populações de fitopatógenos. Por sua vez, o potencial evolutivo é determinado com base na estrutura genética das populações. Em síntese, o modelo considera a quantidade e a distribuição da variabilidade genética da população.

No caso de patógenos que apresentam alta variabilidade genética e há intenso fluxo gênico entre populações, a melhor estratégia seria o uso de resistência do tipo quantitativa (“horizontal” *sensu* Van der Plank (1963)), associada ao manejo de variedades com genes de efeito maior de resistência (“resistência vertical”), em esquemas de misturas de cultivares ou multilinhas. Para populações com baixa variabilidade genética e pouco sujeitas a fluxo gênico, o uso de variedades com resistência conferida por genes de efeito maior (“vertical”) seria a melhor estratégia, como para *Fusarium oxysporum* Schlecht. emend. Snyder e Hansen (McDonald e Linde, 2002a; McDonald e Linde, 2002b). Nesta perspectiva, quantificou-se a variabilidade genética de *Phaeoisariopsis griseola* L., fungo causador da mancha angular do feijoeiro, dentro de populações da América Central, utilizando marcadores RAPD (Mahuku et al, 2002). Concluiu-se que o manejo da doença seria mais eficiente com a piramidação de genes de resistência em uma cultivar do que com a utilização de variedades com genes de efeito maior.

O estudo da dinâmica da variabilidade genética de populações de fitopatógenos é necessário para conhecer como as populações evoluem e as implicações para durabilidade de medidas de controle de doenças (McDonald et al., 1999). Para compreensão da variação espacial e temporal na resistência e virulência, torna-se necessário combinar métodos de diferentes áreas de pesquisa como, por exemplo, análises moleculares acopladas com análises estatísticas de genética de populações e evolução, pois essas variações são de grande interesse para o desenvolvimento de estratégias de manejo bem sucedidas (Stukenbrock e McDonald, 2009).

2 LITERATURA CITADA

Admassu B, Lind V, Friedt W, Ordon F (2009) Virulence analysis of *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* populations in Ethiopia with special consideration of Ug99. *Plant Pathology* 58:362–369.

Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M (1996) *Introductory Mycology*. New York: John Wiley & Sons, Inc. 865p.

Anderson JB (2005) Evolution of antifungal-drug resistance: Mechanisms and pathogen fitness. *Nature Reviews Microbiology* 3:547-556.

Carvalho RA, Lacerda JT, Oliveira EF, Santos ES (2002) Extratos de Plantas Medicinais como Estratégia para o Controle de Doenças Fúngicas do Inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste. *Anais do II Simpósio Nacional Sobre as Culturas do Inhame e do Taro*. João Pessoa: EMEPA-PB.

Coelho RSB (2002) Resistência genética a doenças na cultura do inhame (*Dioscorea* spp.). *Anais do II Simpósio Nacional Sobre as Culturas do Inhame e do Taro*. João Pessoa: EMEPA-PB.

COPR. *Pest control in tropical root crops* (1978) London: Centre for Overseas Pest Research, 235p. (PANS. Manual, 4).

Dasgupta S, Saha D, Saha A (2005) Levels of common antigens in determining pathogenicity of *Curvularia eragrostidis* in different tea varieties. *Journal of Applied Microbiology* 98:1084–1092.

EMATER/IPA (1985) *Sistemas de produção para cará da costa: Agreste Setentrional, Agreste Meridional e Mata Norte*. Recife: Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Pernambuco/Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária 11:48.

Frey KJ, Browning JA, Simons MD (1973) Management of host resistance genes to control diseases. *Zeitschrift fuer Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 80:160-180.

Gisi U, Sierotzki H (2008) Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. *European Journal of Plant Pathology* 122:157-167.

Gisi U, Sierotzki H, Cook A, McCaffery A (2002) Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Management Science* 58:859-867.

Grünwald NJ, Sturbaum AK, Montes GR, Serrano EG, Lozoya-Saldaña H, Fry WE (2006) Selection for fungicide resistance within a growing season in field populations of *Phytophthora infestans* at the center of origin. *Phytopathology* 96:1397-1403.

Huang R, Levy Y (1995) Characterization of iprodione resistant isolates of *Alternaria brassicicola*. *Plant Disease* 79:828-833.

- Kato M, Mizubuti ES, Goodwin SB, Fry WE (1997) Sensitivity to protectant fungicides and pathogenic fitness of clonal lineages of *Phytophthora infestans* in the United States. *Phytopathology* 87:973-978.
- Kishore GK, Pande S, Harish S (2007) Evaluation of essential oils and their components for broad-spectrum antifungal activity and control of late leaf spot and crown rot diseases in peanut. *Plant Disease* 91:375-379.
- Mafra RC (1986) Recomendações técnicas para o cultivo do cará. Brasília: Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças – EMBRAPA.
- Mahuku GS, Jara C, Cuasquer JB, Castellanos G (2002) Genetic variability within *Phaeoisariopsis griseola* from Central America and its implications for resistance breeding of common bean. *Plant Pathology* 51:594-604.
- McDonald BA, Linde C (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40:349-379.
- McDonald BA, Linde C (2002) The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. *Euphytica* 124:163-180.
- McDonald BA, Zhan J, Burdon JJ (1999). Genetic structure of *Rhynchosporium secalis* in Australia. *Phytopathology* 89:639-45.
- Medeiros AG, Aquino MLN (1964) Ocorrência de *Curvularia maculans* (Bancroft) Boedijn var. *macrospora*, nova variedade, em folhas de cará (Dioscoreaceae) no Estado de Pernambuco. Recife: Instituto de Pesquisas Agronômicas (IPA) 7:10.
- Menezes M, Oliveira SMA (1993) Fungos Fitopatogênicos. Recife PE. Imprensa Universitária.
- Michereff SJ, Maffia LA, Noronha MA, Pedrosa RA (2000) Progresso e arranjo espacial da queima das folhas do inhame, causada por *Curvularia eragrostidis*, na Zona da Mata de Pernambuco. *Agrotrópica* 12:87-94.
- Mignucci JS, Garcia MC, Viade HC (1985) Enfermedades, plagas y deficiencias nutricionales de las plantas de ñame. Mayagüez: Universidad de Puerto Rico. 24p.
- Milgroom MG (1995) Analysis of population structure in fungal plant pathogens. In: Leslie, J. F. e Frederiksen, R. A. (Eds.) *Disease analysis through genetics and biotechnology*. Iowa State University, Ames. pp. 213-229.
- Milgroom MG, Fry WE (1997) Contributions of population genetics to plant disease management. *Advances in Botanical Research* 24:1-30.
- Milgroom MG, Peever TL (2003) Population biology of plant pathogens. The synthesis of plant disease epidemiology and population genetics. *Plant Disease* 87:608-617.
- Moura RM (1987) “Podridão aquosa” uma nova doença do inhame (*Dioscorea cayennensis* Lam.) causada pelo fungo *Rhizopus oryzae*. *Fitopatologia Brasileira* 12:369-373.

Moura RM (1997) Doenças do inhame (*Dioscorea cayennensis* Lam. var. *rotundata* Poir). In: Kimati H, Amorim L, Bergamin Filho A, Camargo LEA, Rezende JAM. (Eds.) (1997) Manual de Fitopatologia. Vol.2. Doenças das Plantas Cultivadas. 3ª Ed. São Paulo SP. Ceres.

Moura RM (2002) Problemas fitossanitários do inhame no Nordeste e proposta para um sistema integrado de controle. Anais do II Simpósio Nacional Sobre as Culturas do Inhame e do Taro. João Pessoa: EMEPA-PB.

Moura RM (2005) Doenças do Inhame-da-Costa. In: Kimati H, Amorim L, Bergamin Filho A, Camargo LEA, Rezende JAM. (Eds.) (2005) Manual de Fitopatologia. Vol. 2. Doenças das Plantas Cultivadas. 4ª Ed. São Paulo SP. Ceres.

O'Hara RB, Nielsen BJ, Ostergard H (2000) The effect of fungicide dose on the composition of laboratory populations of barley powdery mildew. *Plant Pathology* 49:558- 566.

Paula H, Michereff SJ, Costa VSO, Laranjeira D, Oliveira SMA (2000) Variabilidad de aislamientos de *Curvularia eragrostidis* que causan atizonamiento de las hojas de ñame (*Dioscorea cayennensis*) en Pernambuco, Brasil. *Boletín Micológico* 11:85-92.

Pedralli G (2002) Dioscoreaceae e Araceae: Aspectos taxonômicos, Etnobotânicos e Espécies nativas com Potencial para Melhoramento Genético. Anais do II Simpósio Nacional Sobre as Culturas do Inhame e do Taro. João Pessoa: EMEPA-PB.

Peregrine WTH, Ahmad KB (1982). Brunei: A first annotated list of plant diseases and associated organisms. *Phytopathology* 72:1-87.

Rashid MM (2001) Detection of *Curvularia* species on boro rice seeds of Dinajpur. *Online Journal of Biological Sciences* 1:591-592.

Rižner TL, Wheeler MH (2003) Melanin biosynthesis in the fungus *Curvularia lunata* (teleomorph: *Cochliobolus lunatus*). *Canadian Journal of Microbiology* 49: 110-119.

Santos ES (1996) Inhame (*Dioscorea* spp.): aspectos básicos da cultura. João Pessoa: EMEPA-PB/SEBRAE.

Santos ES, Macêdo LS (2002) Tendências e perspectivas da cultura do inhame (*Dioscorea* sp.). Anais do II Simpósio Nacional Sobre as Culturas do Inhame e do Taro. João Pessoa: EMEPA-PB.

Silva DW, Assis SPM, Galvão AL, Neto ER, Menezes M e Moura RM (2000) Yam stem canker, a new disease occurring in Brazil caused by *Rhizoctonia solani*. *Agrotrópica* 12:63-64.

Sivanesan A (1987) Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. *Mycological Papers* 158:1-261.

Sivanesan A (1990) *Cochliobolus eragrostidis*. *Mycopathologia*, Dordrecht, v.111, p.113-114 (CMI Descriptions of Fungi and Bacteria, 1002).

Solel Z, Timmer LW, Kimchi, M (1996) Iprodione resistance of *Alternaria alternata* pv. *citri* from Minneola Tangelo in Israel and Florida. *Plant Disease* 80:291-293.

Stukenbrock EH, McDonald BA (2009) Population genetics of fungal and Oomycete effectors involved in gene-for-gene interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22:371-380.

Van den Bosch F, Gilligan C (2008) Models of fungicide resistance dynamics. *Annual Review of Phytopathology* 46:123-147.

Van der Plank JE (1963) *Plant diseases: Epidemics and control*. Academic Press, New York.

Vera Cruz CM, Bai J, Oña I, Leung H, Nelson RJ, Mew T, Leach JE (2000) Predicting durability of a disease resistance gene based on assessment of the fitness loss and epidemiological consequences of avirulence gene mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97:13500-13505.

Visser B, Herselman L, Pretorius ZA (2009) Genetic comparison of Ug99 with selected South African races of *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*. *Molecular Plant Pathology* 10:213-222.

Wolfe MS, Caten CE (1987) *Populations of plant pathogens. Their dynamics and genetics*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

3 RECURSOS DA INTERNET

Agrofit. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários.

http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons (Setembro, 2009)

FAO. **FAOSTAT** - Agricultural statistics database. Rome: World Agricultural Information Centre, 2005. <http://faostat.fao.org/default.aspx> (Maio, 2005)

IBGE. **SIDRA** - Sistema IBGE de recuperação automática. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Unidade Estadual – AL. Supervisão Estadual de Pesquisas Agropecuárias. <http://www.sidra.ibge.gov.br> (Outubro, 2008)

IITA. **International Institute of Tropical Agriculture**. <http://www.iita.org.br/> (Agosto, 2009)

**LEVANTAMENTO DE ESPÉCIES DE *Curvularia* ASSOCIADAS A INHAME
NO ESTADO DE ALAGOAS**

LEVANTAMENTO DE ESPÉCIES DE *Curvularia* ASSOCIADAS A INHAME NO ESTADO DE ALAGOAS

Edlene M. S. Moraes¹; Braz T. Hora Júnior²; Saulo A. S. Oliveira²; Eduardo S. G. Mizubuti^{1,2}. ¹Centro de Ciências Agrárias/ Universidade Federal de Alagoas, CEP 57100-000, Rio Largo, Alagoas, Brasil; ²Departamento de Fitopatologia/ Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Autor para correspondência: Eduardo S. G. Mizubuti. e-mail: mizubuti@ufv.br

RESUMO

Folhas de inhame (*Dioscorea cayennensis*) com sintomas de queima foram coletadas nos municípios alagoanos de Viçosa, Chã Preta e Paulo Jacinto, em 2005 e 2008. Foram obtidos 73 isolados, e com base em características morfológicas, os mesmos foram identificados como *Curvularia eragrostidis* (CE). Foi realizado teste de patogenicidade com 7 isolados e todos foram patogênicos. Houve diferença quanto aos valores de AACPD entre os isolados (F= 3,8; P= 0,02). Quando diferentes isolados foram pareados em meio de cultura, a maioria mostrou reação de compatibilidade micelial. Realizou-se o sequenciamento da região ITS de 10 isolados e de parte do gene da β -tubulina de 8 isolados. Análises de similaridade (BLAST) e filogenéticas usando os métodos de *Neighbor-Joining*, Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança (esta última apenas para ITS) confirmaram a identificação de apenas uma espécie associada à queima foliar do inhame. A população de *C. eragrostidis* associada à queima foliar do inhame tem alta variabilidade genética e patogênica.

Palavras chave: Variabilidade genética. Filogenia. Queima das folhas.

ABSTRACT

Yam leaves (*Dioscorea cayennensis*) with symptoms of blight were collected in the municipalities of Viçosa, Chã Preta, and Paulo Jacinto, Alagoas State, in 2005 and 2008. A total of 73 isolates were obtained and based on morphological characteristics, they were identified as *Curvularia eragrostidis* (CE). Pathogenicity tests were conducted with 7 isolates and all were pathogenic to yam. Values of the area under the disease progress curve varied among isolates ($P= 0.02$). When different isolates were paired in culture, most showed mycelial compatibility reaction. Sequences of the ITS region were obtained for 10 isolates and of part of the β -tubulin gene for 8 isolates. Similarity and phylogenetic analysis (BLAST) using Neighbor-joining, Maximum Parsimony and Maximum Likelihood (only for ITS) methods supported the identification of only one species associated to yam leaf blight in Alagoas State. The population of *Curvularia eragrostidis* associated with leaf blight of yam has high genetic and pathogenic variability.

Keywords: Genetic variability. Phylogeny. Leaf blight.

1 INTRODUÇÃO

O inhame (*Dioscorea cayennensis* Lam.) é cultura tropical cultivada principalmente na África, mas tem grande importância na região Nordeste do Brasil (Mesquita, 2002). Além de sua importância na dieta, a produção de túberas constitui fonte de recursos financeiros para agricultores de baixa renda. Na Nigéria, Costa do Marfim e Gana, maiores produtores de inhame, grande parte da produção é destinada à exportação aos grandes mercados consumidores: Japão e Estados Unidos. No Brasil, o cultivo do inhame é regionalizado e maiores áreas concentram-se no Nordeste. Nessa região, a produtividade da cultura é reduzida pela ocorrência de doenças. Dentre essas, a queima das folhas, causada pelo fungo *Curvularia eragrostidis* (Henn) Meyer, é uma das mais destrutivas (Moura, 1997).

Apesar de *C. eragrostidis* ser considerada a principal espécie causadora de queima das folhas, é possível que outras espécies de *Curvularia* também possam estar envolvidas. A separação de espécies de *Curvularia* é baseada principalmente em aspectos da morfologia conidial tais como tamanho dos esporos, número de septos, o formato (reto ou curvado), e presença ou ausência de uma célula inchada no conídio (Sivanesan, 1987). Dois fatores dificultam a correta identificação do agente causal: 1. A subjetividade de algumas características morfológicas de importância taxonômica, como, por exemplo, a protuberância do hilo; além do fato de essa característica ser pouco informativa filogeneticamente (Sun et al., 2003); e 2. A alta variabilidade constatada entre isolados do patógeno (Paula, 2000) dificulta a identificação correta do agente causal e torna plausível o envolvimento de mais de uma espécie associada à queima das folhas. Portanto, a identificação do agente causal baseado apenas em características morfológicas pode incorrer em equívocos.

A utilização de ferramentas moleculares para identificação de espécies e o estudo das relações filogenéticas têm contribuído para elucidar aspectos ainda não bem compreendidos sobre a taxonomia e biologia de fungos fitopatogênicos. Sequências da região do espaçador interno transcrito – ITS (*Internal Transcribed Spacer*) são úteis para identificação e determinação do relacionamento entre gêneros e espécies de fungos (Glass e Donaldson, 1995). Análises filogenéticas com base em sequências da região ITS de isolados de *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker, que têm diferentes tipos de germinação conidial, juntamente com sequências de outras espécies de Pleosporaceae, incluindo *Curvularia* sp. confirmaram o alto nível de proximidade genética entre essas espécies e o compartilhamento do mesmo teleomorfo, *Cochliobolus* sp. (Dela Paz, 2006). Outro gene comumente utilizado para estudos de filogenia molecular é o que codifica para a β -tubulina (Couch e Kohn, 2002; Keeling et al., 2000; O'Donnell et al., 2000, Than et al., 2008). A proteína é usualmente sintetizada em altos níveis durante o crescimento celular e a sequência de nucleotídeos do gene que a codifica é frequentemente usada em análises filogenéticas para distinguir entre diferentes espécies e/ou diferentes subgrupos dentro das espécies (Banke et al., 2004).

Apesar do potencial de contribuição da filogenia molecular para melhor entendimento da classificação e taxonomia de fungos fitopatogênicos, estudos de delimitação de espécies devem também envolver avaliações de isolamento reprodutivo. Uma das ferramentas mais comumente empregadas para tal propósito é o teste de compatibilidade micelial (Leslie, 1993). Por exemplo, testes de compatibilidade foram realizados com *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magnus) Briosi e Cavara, e *C. gossypii* Southw. e observou-se incompatibilidade em todos os pareamentos analisados e ausência de troca de material genético entre os isolados, indicando isolamento reprodutivo entre as espécies (Roca et al., 2004). Isolados de *Sclerotium rolfsii* (Sacc.)

foram separados por Serra e Silva (2005) em diferentes grupos de compatibilidade vegetativa (GCV) com base na formação de zona de aversão, ou ausência desta, quando os isolados foram pareados em meios de cultura. Quando houve anastomose, os isolados puderam ser agrupados em um mesmo GCV e, nesse caso, houve similaridade genética entre os indivíduos. Nesse trabalho, observou-se, também, haver semelhanças de atributos biológicos, fisiológicos e patogênicos entre isolados de mesmo GCV. Apesar da utilidade desse teste, até o presente, não se tem conhecimento de análise de compatibilidade micelial entre isolados de *Curvularia* spp. que afetam inhame.

O conhecimento detalhado do agente causal de determinada doença é essencial para que estudos epidemiológicos possam resultar em desenvolvimento de estratégias eficientes de manejo. Especificamente, busca-se conhecer as espécies comumente associadas à doença, bem como compreender o relacionamento filogenético do patógeno e a dinâmica de suas populações (Kohn, 2004; Jeger e Pautasso, 2008). Do ponto de vista aplicado, tais estudos são importantes para subsidiar programas de melhoramento visando obtenção de variedades resistentes, estratégia de suma relevância para culturas de importância sócio-econômica em regiões carentes de países em desenvolvimento (Danial et al., 2007). Apesar da importância da queima das folhas do inhame, existem poucos estudos no Brasil sobre a variabilidade genética de isolados de *C. eragrostidis*. O presente trabalho teve como principal objetivo realizar o levantamento de espécies de *Curvularia* associadas à queima das folhas por meio de análises morfológicas, estudar as relações filogenéticas do patógeno com base nas regiões ITS e β -tubulina e avaliar o grau de compatibilidade micelial entre isolados obtidos de diferentes locais visando analisar a diversidade do agente causal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos Isolados

Folhas com lesões características da queima foram coletadas em campos de produção localizados em três municípios alagoanos do Vale do Paraíba: Chã Preta, Paulo Jacinto e Viçosa (Figura 1). No ano de 2005 foram selecionadas 30 áreas ao acaso e em 2008, 13 áreas. Durante a coleta foram registrados os estádios fenológicos da cultura: vegetativo (da brotação ao início do florescimento) e maturação (do término da floração à colheita) (Santos, 1996), assim como as coordenadas geográficas com aparelho portátil de posicionamento global (GPS) (Tabela 1).

Em condições de laboratório foram realizados procedimentos para isolamento do patógeno. Os isolados foram cultivados em meio BDA (Batata, 200g; Dextrose, 20g; e Ágar, 17g), a 26°C. Após 7 dias de incubação, obteve-se cultura pura e subsequentemente cultura monoconidial dos isolados. As culturas foram mantidas em tubos com meio inclinado e posteriormente armazenadas pelo método de Castellani (Gonçalves et al., 2007).

2.2 Testes de Patogenicidade e Progresso da Doença

Sete isolados de *C. eragrostidis* selecionados ao acaso foram utilizados para realização do teste de patogenicidade. Conídios foram retirados de colônias crescidas em BDA, a 26°C, durante 7 dias, após a adição de 10 mL de água destilada esterilizada às colônias e raspagem com escovas de cerdas macias. A suspensão obtida foi filtrada em camada dupla de gaze e teve a concentração ajustada para 5×10^5 conídios/mL. Adicionou-se 0,1% de Tween 20 à suspensão.

Folhas sadias de plantas de inhame cultivar Da Costa de aproximadamente 45 dias de idade, cultivadas em vasos em casa-de-vegetação, foram inoculadas com as suspensões de conídios preparadas a partir de culturas monospóricas de cada um dos 7 isolados. A inoculação foi efetuada com auxílio de atomizador manual e as plantas foram mantidas em câmara úmida por 48 h, em casa de vegetação. Após este período, a severidade da queima foliar foi avaliada diariamente até 15 dias após a inoculação, com auxílio da escala de notas (Michereff et al., 2000). Folhas pulverizadas com solução de água e Tween 20 a 0,1 % foram mantidas como controle negativo. A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foi estimada para cada isolado, em cada repetição (Shaner e Finney, 1977). O experimento foi em delineamento inteiramente casualizado com três repetições, onde cada par de folíolos inoculado constituiu uma repetição. Os valores de AACPD foram transformados por raiz quadrada e submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade usando o programa R version 2.9.1 (R Development Core Team, 2008).

2.3 Análise da morfologia de conídios

A análise morfológica de 33 isolados foi avaliada. Conídios da borda das colônias crescidas em BDA por 7 dias, a 26°C, sob regime de luz contínua, foram coletados com alça de platina e transferidos para uma gota de lactofenol (aproximadamente 50 µL) previamente depositada em lâmina para microscópio. Em seguida, os conídios foram visualizados ao microscópio (40X), fotografados com câmera digital, e mensuraram-se o comprimento e largura de 48 conídios por isolado. Calcularam-se as médias das dimensões dos conídios de cada isolado e estes valores foram utilizados para a identificação da espécie baseada em chave dicotômica para espécies de *Curvularia* (Sivanesan, 1987).

2.4 Compatibilidade vegetativa

Três isolados foram selecionados para o teste de compatibilidade vegetativa: um de cada município (CEV3A, CEPJ10A e CEC11A). Os isolados foram pareados em todas as combinações, incluindo o auto pareamento para servir como controle. Dois discos de 5mm de diâmetro de colônias de 4 dias de idade foram transferidos para BDA em placas de Petri (9cm de diâmetro) e dispostos equidistantes de 2cm. Os pareamentos foram realizados em placas individualizadas sendo cada pareamento realizado por 2 vezes. Adicionalmente, uma placa com múltiplos pareamentos, contendo 12 discos de micélio também foi mantida a 26°C e fotoperíodo de 12 h. Após a incubação, os isolados foram avaliados observando-se a presença ou ausência de zonas de aversão na região de contato micelial aos 7 e 14 dias de incubação (Serra e Silva, 2005).

2.5 Extração de DNA, amplificação, purificação e sequenciamento das regiões ITS e β -tubulina

Os isolados CE1B, CE6D, CE10A, CE20A, CE21A, CE22C, CE24, CEV3A, CEV5A e CEPJ10A, foram cultivados em meio líquido (sacarose 10 g, L-asparagina 2 g, extrato de levedura 2 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,44 mg, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,48 mg, e $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,36 mg) (Zauza et al., 2007) e mantidos sob agitação a 150 rpm a 26°C durante 7 dias. Após esse período o micélio foi lavado com água destilada e mantido em papel filtro esterilizado por 12 h para desidratação. Em seguida, o micélio foi macerado com nitrogênio líquido em almofariz. A extração de DNA foi realizada utilizando o protocolo de CTAB (Murray e Thompson, 1980). O pellet obtido foi ressuspensionado em 50 μL de TE 1X com adição de RNase A (1mg/ml) (Sambrook et al., 1989) e incubado a 37°C por 2 h. Uma alíquota do DNA extraído foi aplicada em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio a 1,5% para visualização e quantificação usando fago lambda como padrão de peso molecular. A

intensidade das bandas foi analisada visualmente após eletroforese. O DNA extraído foi armazenado a -20°C. As reações de PCR foram preparadas na presença de tampão 10X, adicionado de 1,5mM MgCl₂; 2,5mM de cada dNTP; 10µM de cada primer; 3,5U Taq DNA Polimerase e 1µL de DNA diluído. O volume final foi ajustado para 50µL com água ultra pura. A amplificação da região ITS rDNA (ITS1, 5.8S, ITS2) foi realizada com os *primers* ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') e ITS5 (5' GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G 3') (White et al., 1990). As condições de PCR foram: desnaturação inicial a 95°C por 1 min seguida de 35 ciclos formados por 94°C por 1 min, 60°C por 1:30 min para anelamento dos *primers* e extensão a uma temperatura de 72°C por 2 min. Parte da sequência do gene da β-tubulina foi amplificada com os *primers* Bt1a (5' TTC CCC CGT CTC CAC TTC TTC ATG 3') e Bt1b (5' GAC GAG ATC GTT CAT GTT GAA CTC 3') (Glass e Donaldson, 1995). As condições de PCR foram: 94°C por 5 min para a desnaturação inicial, seguida de 35 ciclos de desnaturação por 30 s a 94°C, anelamento por 2 min a 53°C e extensão por 1 min a 72°C. Adicionalmente foi realizada uma extensão final a 72°C por 5 min.

Os produtos amplificados foram visualizados após eletroforese em gel de agarose a 0,8% com brometo de etídio a 1,5%. O marcador de massa de 100pb foi utilizado para determinar o tamanho do fragmento gerado. As amostras foram purificadas usando minicolunas, resinas de purificação e tampão, de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante (Roche - High Pure PCR Product Purification Kit).

As amostras purificadas foram enviadas para sequenciamento no Laboratório de Genômica do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agricultura (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa – MG. A leitura das amostras foi feita em sequenciador automático MegaBACE™ 1000 de 96 capilares (GE Healthcare). Os *primers* usados para amplificar os fragmentos foram usados para direcionar o sequenciamento.

2.6 Análises filogenéticas

As sequências foram editadas manualmente usando o programa The Staden Package, ver 1.6.0 (Staden, 1996) para gerar a sequência consenso. As sequências de cada isolado foram submetidas ao BLASTn (*Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*) para comparação com outras depositadas no GenBank e confirmação da espécie (www.ncbi.nlm.nih.gov/). Os alinhamentos das sequências foram realizados com o programa ClustalW (Thompson et al., 1994).

Três métodos de reconstrução filogenética foram empregados: *Neighbor-Joining* (NJ), Máxima Parcimônia (MP) e Máxima Verossimilhança (ML) (Ridley, 2006). Para análise de NJ, a distância foi calculada usando o modelo de Kimura 2-parâmetros (Kimura, 1980) e utilizou-se o programa MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Program) (Tamura et al., 2007). A confiabilidade das árvores geradas foi avaliada por meio de 1000 repetições *bootstrap*.

As análises de MP e ML foram realizadas usando o PAUP* (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) ver. 4.0b10, Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts (Swofford, 2003). A análise de ML foi realizada apenas para as sequências de ITS. O modelo de substituição mais adequado foi selecionado pelo Modeltest 3.7 (Posada e Crandall, 2001). As árvores de MP e ML foram submetidas a 1000 repetições *bootstrap* e visualizadas com o TreeView ver. 1.6.6 (Page, 1996).

2.6.1 ITS

As sequências de ITS foram alinhadas tomando-se como referência a sequência de *C. eragrostidis* depositada no GenBank (AF163077). A sequência *outgroup* consistiu de *Bipolaris heveae* também depositada no GenBank (AB179835) (Tabela 2).

2.6.2 β -tubulina

Árvores filogenéticas para as sequências parciais de β -tubulina foram obtidas com oito sequências de *C. eragrostidis* geradas neste estudo. Uma sequência de *Stemphylium botryosum* obtida do GenBank (3688539) foi utilizada como *outgroup* (Tabela 3).

3 RESULTADOS

3.1 Isolados

Foram obtidos 73 isolados de *Curvularia eragrostidis*. Os isolados formaram colônias circulares de aspecto cotonoso e de coloração escura com a presença de grande quantidade de conidióforos e conídios.

3.2 Teste de Patogenicidade e Progresso da Doença

Todos os isolados testados foram patogênicos ao inhome. Os primeiros sintomas da doença, caracterizados por pequenas manchas escuras, foram observados 48 h após a inoculação. Houve diferença entre os isolados quanto aos valores de AACPD ($F= 3,8$; $P= 0,02$). Os isolados CE2A e CE5 diferiram quanto ao valor da AACPD e resultaram em maior e menor valores, respectivamente. Os demais não diferiram estatisticamente entre si (Figura 2).

3.3 Análise da morfologia de conídios

Dos 73 isolados obtidos, 33 isolados foram analisados detalhadamente quanto à morfologia, e apresentaram características típicas de *C. eragrostidis*.

Os conídios apresentaram-se ovóides, com três septos, um tipicamente mediano com uma banda mais escura, células centrais de coloração marrom e células das extremidades mais claras, típicos da espécie, conforme descrito anteriormente (Sivanesan, 1987). As medidas de comprimento e largura dos conídios variaram de 18,9 – 33,6 (26,2) μm x 10,1 – 16,0 (13,06) μm .

3.4 Compatibilidade vegetativa

Nos tratamentos utilizados como controle (auto pareamento), houve ausência de zona de aversão entre as colônias, o que caracteriza a compatibilidade micelial e evidencia a possível troca de material genético entre os isolados. Em geral, nos pareamentos de colônias de diferentes isolados, não houve formação de zona de aversão. Em apenas um caso, entre os isolados CEV3A e CEPJ10A, procedentes de Viçosa e Paulo Jacinto, respectivamente, constatou-se formação de zona de aversão pouco distinta ou fraca (Figura 3).

3.5 Amplificação e sequenciamento da região ITS e β -tubulina

A amplificação da região ITS resultou em fragmento de aproximadamente 500pb e a da β -tubulina, em fragmento de cerca de 400pb. As sequências de ITS dos isolados utilizados no presente estudo apresentaram alta similaridade com a sequência de *C. eragrostidis* depositada no GenBank (AF163077), com E-value igual a 0.0. Não foram encontradas sequências de β -tubulina disponíveis de nenhuma espécie de *Curvularia* depositada no GenBank.

3.6 Análises filogenéticas

3.6.1 Análise filogenética com base na região ITS

Topologias semelhantes foram recuperadas com os três métodos de reconstrução filogenética. Os isolados sequenciados neste estudo foram posicionados junto à sequência do isolado de *C. eragrostidis* obtida do GenBank (Figura 4). Na análise de Máxima Parcimônia foram geradas três árvores igualmente parcimoniosas; o índice de consistência (CI) foi de 0,955 e o índice de retenção (RI) foi de 0.500.

3.6.2 Análise filogenética com base na região da β -tubulina

Em todos os métodos filogenéticos, o relacionamento entre os 8 isolados de *C. eragrostidis* sequenciados neste estudo e a sequência de *S. botryosum* obtida do GenBank foi similar (Figura 5). Na análise de Máxima Parcimônia foram geradas duas árvores igualmente parcimoniosas; o índice de consistência (CI) foi de 0,992 e o índice de retenção (RI) foi de 0.909.

4 DISCUSSÃO

A espécie *C. eragrostidis* é o agente causal da queima foliar do inhame nos principais municípios produtores de Alagoas. Contudo, existe a possibilidade do envolvimento de mais de uma espécie associada à doença. Os resultados do teste de compatibilidade vegetativa confirmam a ocorrência de apenas uma espécie como agente causal da queima foliar do inhame em Alagoas. Em estudo recente, envolvendo espécies de *Alternaria* causadoras de pinta preta em batateira e tomateiro, constatou-se haver incompatibilidade entre isolados de *A. grandis* e *A. tomatophila*, agentes causais da doença em batateira e tomateiro, respectivamente (Rodrigues, 2009). No entanto,

reações de compatibilidade foram observadas em alguns casos, possivelmente pelo fato de haver um processo de especiação recente e isolamento genético ainda não concluído. No caso de *C. eragrostidis* não houve correlação entre a compatibilidade vegetativa e a origem geográfica dos isolados, pois isolados procedentes de locais diferentes foram compatíveis. Conclui-se que o fator determinante da resposta de compatibilidade foi o relacionamento filogenético.

A subjetividade na classificação de espécies de *Curvularia* com base em características morfológicas foi relatada por outros autores (Sun et al., 2003). Métodos moleculares, principalmente as análises de sequências de DNA têm sido úteis para elucidar casos em que a delimitação de morfoespécies é confusa. Sequências da região ITS do DNA ribossomal são comumente empregadas em análises filogenéticas conduzidas para auxiliar na taxonomia de fungos (Glass e Donaldson, 1995). Devido diferenças morfológicas e no DNA, Nakada et al. (1994) propuseram que *C. lunata* var. *aeria* deveria ser tratada como nova espécie de *Curvularia*. Análises morfológicas devem ser complementadas por ferramentas moleculares para aumentar a confiabilidade das conclusões. A origem geográfica dos isolados não influenciou na formação dos grupos.

Apesar de sequências da região da β -tubulina serem amplamente usadas em análises filogenéticas, nenhuma sequência de espécies de *Curvularia* encontra-se depositada no GenBank. Braun et al. (2003) utilizaram sequências de ITS e de β -tubulina para analisar o relacionamento filogenético entre endofíticos e outras espécies da Família Pleosporaceae. Concluiu-se que as espécies de endofíticos são mais similares a espécies de *Alternaria* ou *Embellisia* que de outros membros de Pleosporaceae.

Aparentemente, as populações de *C. eragrostidis* associadas à queima foliar do inhame têm alta variabilidade genética. Considerando o reduzido número de isolados analisados no teste de patogenicidade, verificou-se haver diferenças de agressividade. Neste estudo, o isolado CE2A foi o que resultou em maior valor de AACPD, diferindo estatisticamente do isolado CE5. Thrall et al. (2005) avaliaram a variação de agressividade dentro da metapopulação de *Alternaria brassicicola* (Schwein.) Wiltshire que infecta *Cakile maritima* Scop. e observaram diferenças entre isolados, mas não entre as populações do patógeno. Fato semelhante pode estar acontecendo em populações de *C. eragrostidis*. Outra observação que sugere haver alta variabilidade genética na população é a ocorrência de duas mutações na região ITS do isolado CE21A, assim como uma inversão na sequência de β -tubulina do isolado CE22C. Considerando que os isolados foram obtidos de regiões geográfica e temporalmente próximas, a presença destas mutações nas sequências de DNA indica alta variabilidade genética.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores expressam agradecimentos ao Dr. Olinto Liparini Pereira pelo auxílio na identificação das espécies utilizadas no estudo de filogenia molecular, à FAPEAL pela concessão de bolsa de mestrado a Edlene Maria da Silva Moraes e ao CNPq pela concessão de bolsa de Produtividade em Pesquisa de Eduardo S. G. Mizubuti.

6 LITERATURA CITADA

- Banke S, Peschon A, McDonald BA (2004) Phylogenetic analysis of globally distributed *Mycosphaerella graminicola* populations based on three DNA sequence loci. *Fungal Genetics and Biology* 41:226–38.
- Braun K, Romero J, Liddell C, Creamer R (2003) Production of swainsonine by fungal endophytes of locoweed. *Mycological Research* 107:980-988.
- Couch BC, Kohn LM (2002) A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. *Mycologia* 94:683–693.
- Danial D, Parlevliet J, Almekinders C, Thiele G (2007) Farmers' participation and breeding for durable disease resistance in the Andean region. *Euphytica* 153:385-396.
- Dela Paz MAG, Goodwin PH, Raymundo AK, Ardales EY, Vera Cruz CM (2006) Phylogenetic analysis based on ITS sequences and conditions affecting the type of conidial germination of *Bipolaris oryzae*. *Plant Pathology* 55:756-765.
- Glass NL, Donaldson GC (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61:1323–1330.
- Gonçalves RC, Alfenas AC, Mafia RG (2007) Armazenamento de microrganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. In: Alfenas AC, Mafia RG (Eds.) (2007) *Métodos em Fitopatologia*. Viçosa MG. Editora UFV.
- Jeger M, Pautasso M (2008) Comparative epidemiology of zoosporic plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 122:111-126.
- Keeling PJ, Luker MA, Palmer JD (2000) Evidence from betatubulin phylogeny that microsporidia evolved from within the fungi. *Molecular Biology and Evolution* 17:23–31.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-112.
- Kohn LM (2004) Applying comparative genomics to plant disease epidemiology. *Phytoprotection* 85:45-48.
- Leslie JF (1993) Fungal vegetative compatibility. *Annual Review of Phytopathology* 31:127-150.
- Mesquita AS (2002) Inhame - *Dioscorea cayennensis* Lam. - e taro - *Colocasia esculenta* (L.) Schott. -, Cenários dos Mercados Brasileiro e Internacional. Anais do II Simpósio Nacional Sobre as Culturas do Inhame e do Taro. João Pessoa: EMEPA-PB.

Michereff SJ, Maffia LA, Noronha MA (2000) Escala diagramática para avaliação da severidade da queima das folhas do inhame. *Fitopatologia Brasileira* 24:174-180.

Moura RM (1997) Doenças do inhame (*Dioscorea cayennensis* Lam. var. *rotundata* Poir). In: Kimati H, Amorim L, Bergamin Filho A, Camargo LEA, Rezende JAM. (Eds.) (1997) Manual de Fitopatologia. Vol.2. Doenças das Plantas Cultivadas. 3ª. Ed. São Paulo SP. Ceres.

Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Research*. 8: 4321-4325.

Nakada M, Tanaka C, Tsunewaki K, Tsuda M (1994) RFLP analysis for species separation in the genera *Bipolaris* and *Curvularia*. *Mycoscience* 35:271-278.

O'Donnell K, Kistler C, Tacke BK, Casper HH (2000) Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:7905-10.

Page RDM (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.

Paula H, Michereff SJ, Costa VSO, Laranjeira D, Oliveira SMA (2000) Variabilidade de aislamientos de *Curvularia eragrostidis* que causan atizamiento de las hojas de ñame (*Dioscorea cayennensis*) en Pernambuco, Brasil. *Boletín Micológico* 11:85-92.

Posada D, Crandall KA (2001) Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. *Systematics Biology* 50:580-601.

Ridley M (2006) Evolução. 3ª Ed. São Paulo, SP. Artmed.

Roca MG, Davide LC, Davide LMC, Mendes-Costa MC, Schwan RF, Wheals AE (2004) Conidial anastomosis fusion between *Colletotrichum* species. *Mycological Research* 108:1320-1326.

Rodrigues TTMS (2009) Molecular and morphological characterization, with inference about recombination, for *Alternaria* species related to early blight of potato and tomato. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG.

Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Laboratory Press, New York.

Santos ES (1996) Inhame (*Dioscorea* spp.): aspectos básicos da cultura. João Pessoa: EMEPA-PB/SEBRAE.

Serra IMRS, Silva GS (2005) Caracterização biológica e fisiológica de isolados de *Sclerotium rolfsii* obtidos de pimenta no estado do Maranhão. *Fitopatologia Brasileira* 30:61-66p.

Shaner G, Finney RE (1977) The effect of nitrogen fertilization in the expression of Slow-mildewing resistance in knox wheat. *Phytopathology* 67:1051-1056.

Sivanesan A (1987) Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. *Mycological Papers* 158: 1-261.

Staden R (1996) The Staden Sequence Analysis Package. *Molecular Biotechnology* 5:233-241.

Sun G, Oide S, Tanaka E, Shimizu K, Tanaka C, Tsuda M (2003) Species separation in *Curvularia* “geniculata” group inferred from Brn1 gene sequences. *Mycoscience* 44:239-244.

Swofford DL (2003) PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetic analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.

Than PP, Shivas RG, Jeewon R, Pongsupasamit S, Marney TS, Taylor PWJ, Hyde KD (2008) Epitypification and phylogeny of *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds. *Fungal Diversity* 28:97-108.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research* 22:4673-4680.

Thrall PH, Barrett LG, Burdon JJ, Alexander HM (2005) Variation in pathogen aggressiveness within a metapopulation of the *Cakile maritima*–*Alternaria brassicicola* host–pathogen association. *Plant Pathology* 54:265–274.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: a guide to methods and applications* (eds Innis, M A; Gelfand, D H; Sninsky, J J; White, T J). Academic Press, San Diego.

Zauza EAV, Alfenas AC, Mafia RG (2007) Esterilização, preparo de meios de cultura e fatores associados ao cultivo de fitopatógenos. In: Alfenas AC, Mafia RG (Eds.) (2007) *Métodos em Fitopatologia*. Viçosa MG. Editora UFV.

7 RECURSOS DA INTERNET

CoreNucleotides, www.ncbi.nlm.nih.gov/ (Julho, 2009)

R Development Core Team R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing (2008) Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. URL <http://www.R-project.org>

8 LISTA DE TABELAS E FIGURAS

- Tabela 1.** Localização geográfica das áreas de plantio de inhame onde os isolados de *Curvularia eragrostidis* foram obtidos. **45**
- Tabela 2.** Lista dos isolados utilizadas nos estudos filogenéticos com a região ITS e seus respectivos números de acesso do GenBank. **46**
- Tabela 3.** Lista dos isolados utilizados nos estudos filogenéticos com o gene da beta tubulina e o número de acesso no GenBank da sequência *outgroup*. **47**
- Figura 1.** A. Mapa do Brasil com o Estado de Alagoas em destaque. **48**
B. Mapa de Alagoas indicando as áreas amostrados em regiões produtoras de inhame. CP: Chã Preta, PJ: Paulo Jacinto, VI: Viçosa.
- Figura 2.** Valores médios de área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) da queima das folhas do inhame (*Dioscorea cayennensis*) causada por diferentes isolados de *Curvularia eragrostidis*, em condição de casa de vegetação. **49**
- Figura 3.** Compatibilidade micelial no auto pareamento, vista do verso (A) e reverso (B) da placa. Arranjo de discos de micélio de *Curvularia eragrostidis* em múltiplos pareamentos (ri: reação incompatível; rc: reação compatível) visto no verso (C) e reverso (D) da placa. **50**
- Figura 4.** Árvore filogenética de Máxima Parcimônia baseada em sequências de ITS de 10 isolados de *Curvularia eragrostidis* com *Bipolaris heveae* como *outgroup*. A barra de escala representa 1 mudança e valores de suporte de *bootstrap* de 1000 repetições são apresentados nos ramos. **51**
- Figura 5.** Árvore filogenética de Máxima Parcimônia baseada em sequências de β tubulina de 8 isolados de *Curvularia eragrostidis*. A árvore foi enraizada com *Stemphylium botryosum*. A barra de escala representa 1 mudança e valores de suporte de *bootstrap* de 1000 repetições são apresentados nos ramos. **52**

Tabela 1. Localização geográfica das áreas de plantio de inhame onde os isolados de *Curvularia eragrostidis* foram obtidos.

Área	Latitude	Longitude	Município	Ano de coleta
1	09°20'47,9"	36°15'18,6"	Viçosa	2005
2	09°20'51,9"	36°15'23,4"	Viçosa	2005
3	09°20'54,5"	36°15'34,4"	Viçosa	2005
4	09°20'58,0"	36°15'35,8"	Viçosa	2005
5	09°21'37,2"	36°15'10,1"	Viçosa	2005
6	09°15'07,2"	36°16'31,4"	Chã Preta	2005
7	09°15'09,2"	36°16'33,7"	Chã Preta	2005
8	09°22'12,9"	36°21'25,2"	Paulo Jacinto	2005
9	09°18'42,6"	36°21'59,9"	Paulo Jacinto	2005
10	09°18'40,2"	36°22'00,1"	Paulo Jacinto	2005
11	09°18'54,9"	36°21'43,7"	Paulo Jacinto	2005
12	09°18'54,7"	36°21'42,7"	Paulo Jacinto	2005
13	09°18'57,4"	36°21'44,9"	Paulo Jacinto	2005
14	09°18'47,1"	36°21'58,9"	Paulo Jacinto	2005
15	09°15'15,2"	36°16'51,4"	Chã Preta	2005
16	09°15'15,5"	36°16'59,8"	Chã Preta	2005
17	09°15'15,6"	36°16'54,7"	Chã Preta	2005
18	09°15'23,5"	36°16'55,7"	Chã Preta	2005
19	09°15'06,9"	36°16'56,7"	Chã Preta	2005
20	09°20'36,9"	36°14'52,9"	Viçosa	2005
21	09°17'00,3"	36°18'40,9"	Chã Preta	2005
22	09°17'03,9"	36°18'20,1"	Chã Preta	2005
23	09°17'00,5"	36°18'29,4"	Chã Preta	2005
24	09°22'22,2"	36°20'08,6"	Viçosa	2005
25	09°22'31,2"	36°20'08,9"	Viçosa	2005
26	09°22'43,4"	36°20'10,7"	Viçosa	2005
27	09°22'55,0"	36°20'13,7"	Viçosa	2005
28	09°22'49,2"	36°23'49,8"	Paulo Jacinto	2005
29	09°22'53,8"	36°23'51,6"	Paulo Jacinto	2005
30	09°22'56,7"	36°23'55,7"	Paulo Jacinto	2005
V-01	09°23'54,0"	36°15'38,7"	Viçosa	2008
V-02	09°23'50,7"	36°15'38,7"	Viçosa	2008
V-03	09°24'02,4"	36°15'39,8"	Viçosa	2008
V-04	09°24'01,5"	36°15'33,5"	Viçosa	2008
V-05	09°23'30,6"	36°15'51,6"	Viçosa	2008
V-06	09°20'15,0"	36°18'25,4"	Viçosa	2008
PJ-07	09°22'40,5"	36°23'12,7"	Paulo Jacinto	2008
PJ-08	09°22'39,6"	36°23'13,4"	Paulo Jacinto	2008
PJ-09	09°21'09,7"	36°21'41,6"	Paulo Jacinto	2008
PJ-10	09°21'08,1"	36°21'41,3"	Paulo Jacinto	2008
CP-11	09°15'31,7"	36°17'41,9"	Chã Preta	2008
CP-12	09°15'11,8"	36°17'36,3"	Chã Preta	2008
CP-13	09°15'07,2"	36°17'59,6"	Chã Preta	2008

Tabela 2. Lista dos isolados utilizadas nos estudos filogenéticos com a região ITS e seus respectivos números de acesso do GenBank.

Espécie	Isolado¹	GenBank
<i>Bipolaris heveae</i>	Cyn-1	AB179835
<i>Curvularia eragrostidis</i>	95/1857 ^a	AF163077
<i>C. eragrostidis</i>	CE6D-CP	Presente trabalho
<i>C. eragrostidis</i>	CE21A-CP	Presente trabalho
<i>C. eragrostidis</i>	CE22C-CP	Presente trabalho
<i>C. eragrostidis</i>	CE10A-PJ	Presente trabalho
<i>C. eragrostidis</i>	CEPJ10A-PJ	Presente trabalho
<i>C. eragrostidis</i>	CE1B-Vi	Presente trabalho
<i>C. eragrostidis</i>	CE20A-Vi	Presente trabalho
<i>C. eragrostidis</i>	CE24-Vi	Presente trabalho
<i>C. eragrostidis</i>	CEV3A-Vi	Presente trabalho
<i>C. eragrostidis</i>	CEV5A-Vi	Presente trabalho

¹ As letras após a identificação dos isolados oriundos deste trabalho correspondem ao município de coleta: CP – Chã Preta, PJ – Paulo Jacinto, Vi – Viçosa, respectivamente.

Tabela 3. Lista dos isolados utilizados nos estudos filogenéticos com o gene da beta tubulina e o número de acesso no GenBank da sequência *outgroup*.

Espécie	Isolado¹	GenBank
<i>Curvularia eragrostidis</i>	CE6D-CP	Presente trabalho
<i>C.eragrostidis</i>	CE21A-CP	Presente trabalho
<i>C.eragrostidis</i>	CE22C-CP	Presente trabalho
<i>C.eragrostidis</i>	CE10A-PJ	Presente trabalho
<i>C.eragrostidis</i>	CE1B-Vi	Presente trabalho
<i>C.eragrostidis</i>	CE24-Vi	Presente trabalho
<i>C.eragrostidis</i>	CEV3A-Vi	Presente trabalho
<i>C.eragrostidis</i>	CEV5A-Vi	Presente trabalho
<i>Stemphylium botryosum</i>	ICMP 5620-77	3688539

¹ As letras após a identificação dos isolados oriundos deste trabalho correspondem ao município de coleta: CP – Chã Preta, PJ – Paulo Jacinto, Vi – Viçosa, respectivamente.

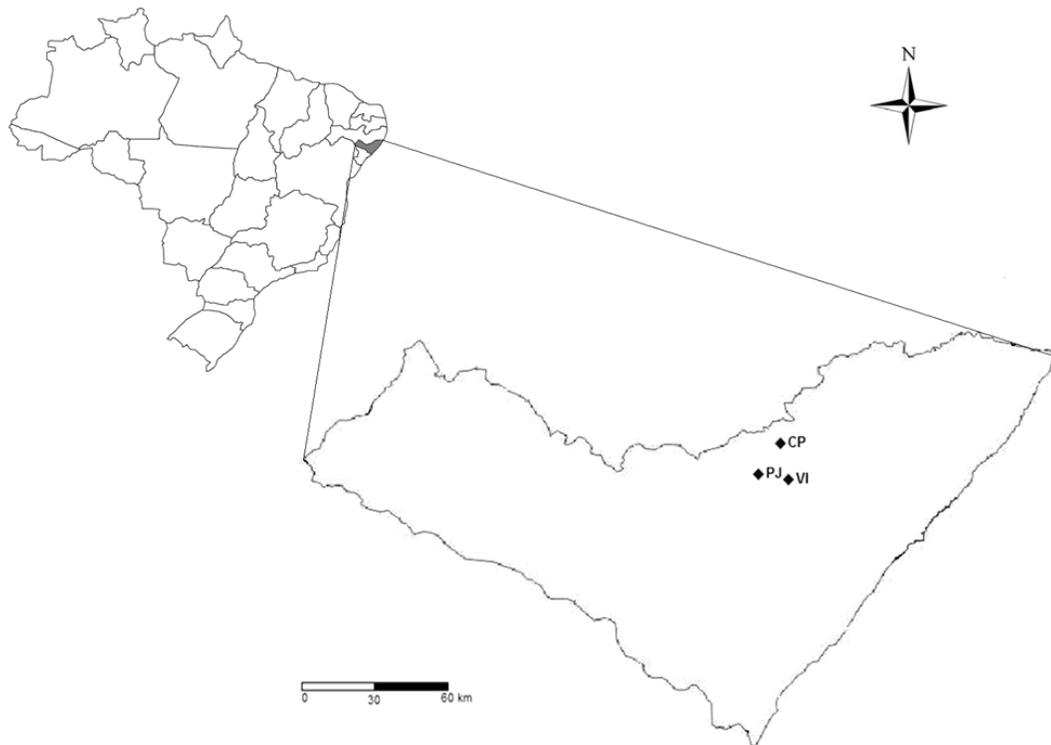


Figura 1. A. Mapa do Brasil com o Estado de Alagoas em destaque. B. Mapa de Alagoas indicando as áreas amostradas em regiões produtoras de inhame. CP: Chã Preta, PJ: Paulo Jacinto, VI: Viçosa.

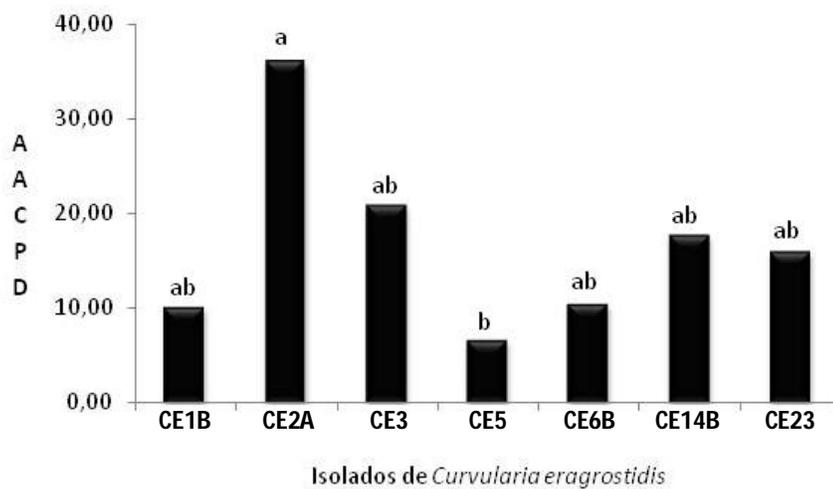


Figura 2. Valores médios de área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) da queima das folhas do inhame (*Dioscorea cayennensis*) causada por diferentes isolados de *Curvularia eragrostidis*, em condição de casa de vegetação.

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

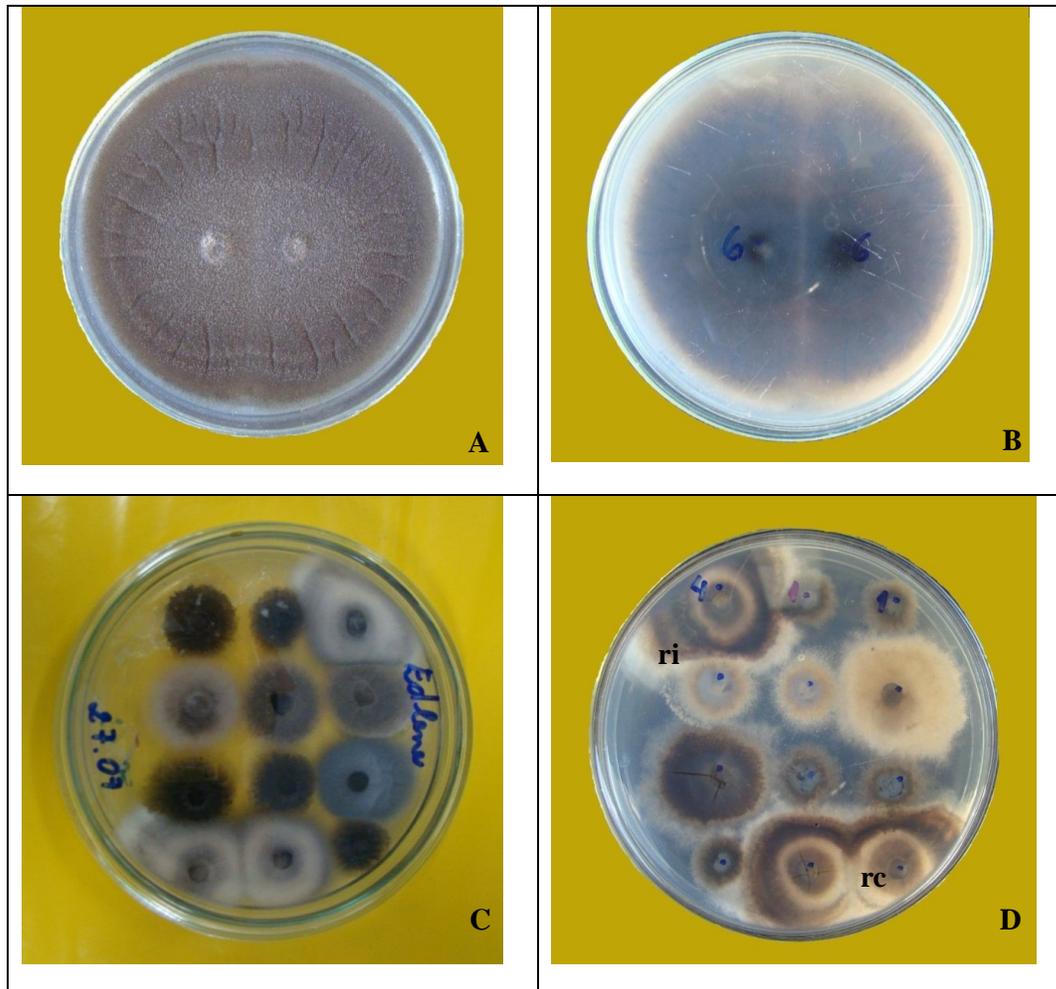


Figura 3. Compatibilidade micelial no auto pareamento, vista do verso (A) e reverso (B) da placa. Arranjo de discos de micélio de *Curvularia eragrostidis* em múltiplos pareamentos (ri: reação incompatível; rc: reação compatível) visto no verso (C) e reverso (D) da placa.

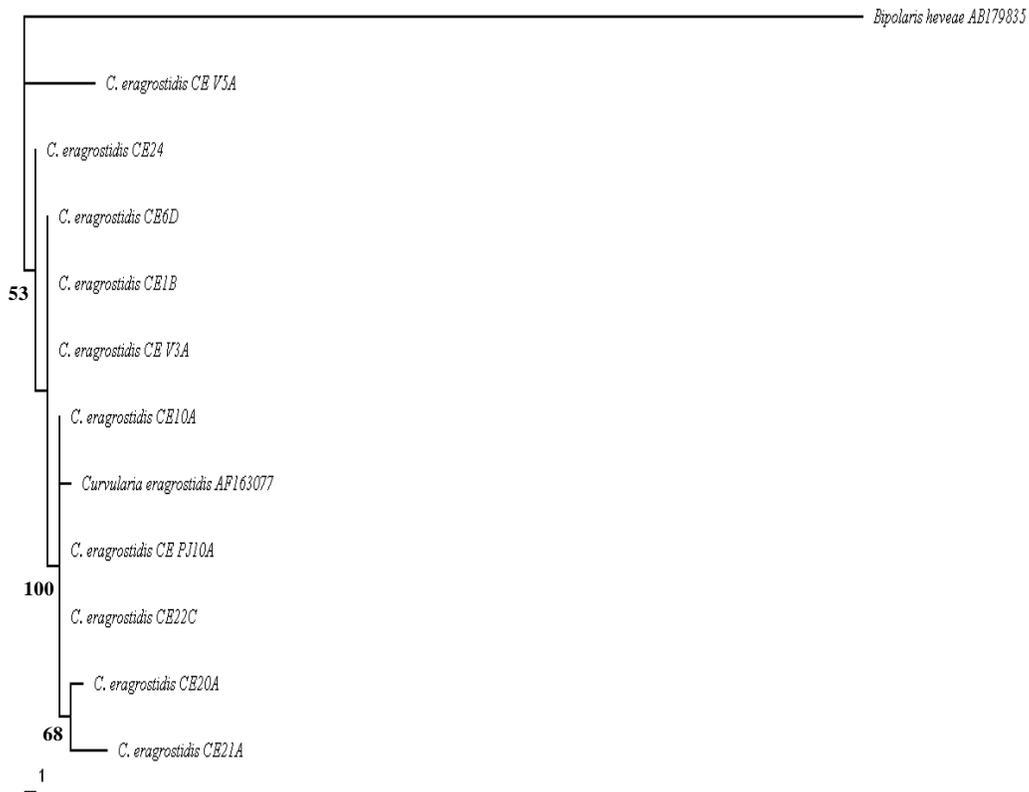


Figura 4. Árvore filogenética de Máxima Parcimônia baseada em sequências de ITS de 10 isolados de *Curvularia eragrostidis* com *Bipolaris heveae* como *outgroup*. A barra de escala representa 1 mudança e valores de suporte de *bootstrap* de 1000 repetições são apresentados nos ramos.

**ANÁLISE DA ESTRUTURA GENÉTICA DA POPULAÇÃO DE *Curvularia*
eragrostidis ASSOCIADA A INHAME NO ESTADO DE ALAGOAS**

Trabalho a ser submetido à Revista Tropical Plant Pathology

ANÁLISE DA ESTRUTURA GENÉTICA DA POPULAÇÃO DE *Curvularia eragrostidis* ASSOCIADA À CULTURA DO INHAME NO ESTADO DE ALAGOAS

Edlene M. S. Moraes¹; Carlos A. D. Bragança²; Eduardo S. G. Mizubuti^{1,2}. ¹Centro de Ciências Agrárias/ Universidade Federal de Alagoas, CEP 57100-000, Rio Largo, Alagoas, Brasil; ²Departamento de Fitopatologia/ Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Autor para correspondência: Eduardo S. G. Mizubuti. e-mail: mizubuti@ufv.br

RESUMO

Foram obtidos 50 isolados de *Curvularia eragrostidis* oriundos de folhas de inhame (*Dioscorea cayennensis*) com sintomas de queima, coletadas em 2005 e 2008, nos municípios alagoanos de Viçosa, Chã Preta e Paulo Jacinto. Todas as amostras foram geo-referenciadas e a variabilidade genética foi quantificada por meio do marcador AFLP com duas combinações de *primers*: EAC-MA e EAA-MA. Foram geradas 150 bandas polimórficas. A diversidade gênica total foi alta ($H_t = 0,31$) com baixa diferenciação entre as populações ($G_{st} = 0,06$). Os isolados não agruparam conforme origem geográfica e não houve correlação entre distância genética e distância geográfica. A AMOVA revelou que a variação genética foi maior dentro (97,9%) do que entre (2,1%) as populações. A população de *C. eragrostidis* estudada possui alta variabilidade genética, o que pode dificultar estratégias de manejo da queima foliar, como por exemplo, o uso de variedades resistentes.

Palavras chave: Polimorfismo. Variabilidade genética. Origem geográfica.

ABSTRACT

A total of 50 isolates of *Curvularia eragrostidis* were obtained in 2005 and 2008 from yam (*Dioscorea cayennensis*) leaves with symptoms of blight, in Viçosa, Chã Preta, and Paulo Jacinto, Alagoas State, Brazil. The geographic coordinates of each isolate were recorded with a portable GPS. The genetic variability was assessed using AFLP markers with two primers combinations: EAC-MA and EAA-MA and 150 polymorphic bands were scored. There was high gene diversity ($H_t = 0.31$) and low differentiation between populations ($G_{st} = 0.06$). The isolates did not group according to geographical origin and there was no correlation between genetic distance and geographic distance. The genetic variation was higher within (97.9%) than among (2.1%) populations. The genetic variability within populations of *C. eragrostidis* was high and this should be carefully considered when planning disease management strategies such as the deployment of resistant varieties.

Keywords: Polymorphism. Genetic variability. Geographical origin.

1 INTRODUÇÃO

A queima das folhas do inhame (*Dioscorea cayennensis* (Lam.), também conhecida por requeima, pinta preta ou varíola (Moura, 2005), tem como agente causal o fungo *Curvularia eragrostidis* (Henn.) Meyer, e é uma das doenças que mais comprometem a produtividade dessa cultura no estado de Alagoas. O patógeno infecta folhas, reduzindo a área fotossintética e conseqüentemente a produção. Atualmente, não existem fungicidas registrados para a cultura do inhame, embora o controle da queima das folhas seja baseado, principalmente, em pulverizações com os produtos maneb, mancozeb e iprodione, realizadas logo após o aparecimento dos primeiros sintomas (Santos, 1996).

A cultura do inhame desempenha papel socioeconômico importante no Nordeste do Brasil, especialmente nos Estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia e Maranhão, prestando enorme contribuição ao desenvolvimento rural (Santos e Macêdo, 2002). Por ser cultura explorada principalmente por pequenos produtores, a necessidade de controlar a queima foliar sem depender da aplicação de fungicidas ou com quantidades mínimas destes compostos é evidente. A utilização de métodos alternativos de controle de doenças de plantas representa um grande desafio para a agricultura moderna. No caso da cultura do inhame, destaca-se o uso da resistência genética (Coelho, 2002).

O controle de doenças torna-se mais efetivo, econômico e ecológico, quando se utilizam diversas técnicas de forma integrada. A utilização da resistência genética representa um dos métodos de controle mais eficientes, de fácil acesso aos produtores e econômico, reduzindo, de forma expressiva, os prejuízos com a doença e custos de produção (Coelho, 2002). Além disso, o uso de variedades resistentes reduz o impacto

ambiental devido à redução de aplicações desnecessárias de fungicidas (Cooke e Kaye, 2006). No entanto, a utilização eficiente de programas de manejo integrado requer conhecimento sobre a intensidade da doença e população do patógeno (Savary e Cooke, 2006).

Apesar de ser doença destrutiva para a cultura do inhame, são poucas as informações relacionadas à queima das folhas, em particular ao estudo da população do patógeno. Neste caso, o conhecimento sobre a estrutura de populações é imprescindível para entender as variações observadas entre isolados e suas implicações para o desenvolvimento e controle da doença (McDonald et al., 1999). Especificamente, é necessário investigar as forças evolutivas que atuam na população do patógeno e que podem interferir em aspectos ecológicos e epidemiológicos de interesse (McDonald 1997; McDonald e Linde 2002b).

Em fungos fitopatogênicos, a recombinação e a mutação são mecanismos evolutivos importantes na geração de novos genótipos (Burdon e Silk, 1997). Para patógenos que se reproduzem predominantemente de forma assexuada, como *C. eragrostidis*, é comumente assumido que o processo evolutivo de maior importância é a mutação, por criar variantes na população que poderão ser rapidamente selecionados por apresentarem resistência à aplicação de fungicidas com modo de ação sítio-específico (Gisi e Sierotzki, 2008; Van den Bosch e Gilligan, 2008).

Até o momento, os estudos de populações de *C. eragrostidis* objetivaram determinar principalmente a variabilidade fisiológica e, alguns poucos, a variabilidade genética. Brito (2006) estudou a variabilidade fisiológica e genética de 15 isolados de *C. eragrostidis* obtidos na cultura do inhame, coletados nos Estados da Bahia, Paraíba e Pernambuco. Constataram-se variações fisiológicas e no perfil de proteínas totais e

esterase. Para esse último marcador, houve diferenciação entre os isolados quanto à mobilidade relativa, número e intensidade de bandas, e a análise de agrupamento revelou alto polimorfismo entre os isolados permitindo a formação de 11 grupos. Não houve variação entre os isolados do grupo 1 quanto ao perfil de proteínas totais e de esterase. Houve formação de grupos com apenas um isolado. Concluiu-se que há grande variabilidade fisiológica e genética entre os isolados de *C. eragrostidis* analisados. Em outro trabalho, estudaram-se as características fisiológicas de 42 isolados de *C. eragrostidis* provenientes do Estado de Pernambuco, e detectou-se a formação de dois grupos de similaridade em relação à taxa de crescimento micelial, cinco para a esporulação e quatro para a germinação, indicando a existência de variabilidade entre os isolados analisados (Paula et al., 2000).

A variabilidade presente em populações de patógenos pode determinar diferenças na severidade da doença, pois a variabilidade pode determinar o potencial de adaptação do organismo às condições adversas (Brown, 1998). Diversas técnicas moleculares têm sido desenvolvidas para determinar a diversidade genética e estrutura de populações de fitopatógenos (Visser et al., 2009). Marcadores moleculares neutros como *Restriction Fragment Length Polymorphisms* (RFLPs), isoenzimas, *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPDs), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFPL), microsátélites e *Single Nucleotide Polymorphism* (SNPs) são usados para medir a variabilidade em fungos e estudar populações de fitopatógenos (McDonald, 1997; Zaffarano et al., 2006). O marcador RAPD foi utilizado por Ahmad et al. (2006) para analisar a variabilidade de isolados de *C. lunata* obtidos de lesões características de queima das folhas e podridão da raiz de duas variedades de trigo e arroz. Formaram-se quatro grupos de acordo com o padrão de bandas e agressividade: isolados agressivos, isolados não agressivos, isolados não agressivos a variedades de arroz e isolados não

agressivos a variedades de trigo. A variação observada na população estabeleceu correlação positiva entre agressividade, taxonomia e características genéticas.

Os marcadores AFLP (Vos et al., 1995) são efetivos para determinar variação genética intraespecífica em fungos, e são ferramentas eficientes para discriminar indivíduos geneticamente próximos, evidenciando a utilidade deste tipo de marcador para a realização de estudos de variabilidade genética (Arnao et al., 2008; Majer et al., 1996; (Mueller e Wolfenbarger, 1999). O conhecimento da variabilidade genética de fitopatógenos é importante para selecionar o tipo apropriado de resistência e para seleção de genes de resistência em programas de manejo da doença (McDonald e Linde, 2002a). Esse marcador associa o polimorfismo gerado por enzimas de restrição à capacidade de detecção da técnica de PCR (Ferreira e Grattapaglia, 1998). A técnica apresenta vantagens comparativas, tais como detecção de maior número de locos, cobertura ampla do genoma e baixo custo (Lopes et al., 2002), quando considera-se o grande número de fragmentos que são gerados e resolvidos em um único gel.

O presente trabalho objetivou determinar a estrutura genética da população de *C. eragrostidis* associada à queima das folhas do inhame no Estado de Alagoas por meio da genotipagem de isolados coletados em três regiões produtoras com o marcador molecular AFLP.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolados

Foram utilizados 50 isolados de *C. eragrostidis* obtidos de folhas com sintomas da doença, coletadas em 2005 e 2008, em áreas de produção de inhame nos municípios alagoanos de Chã Preta, Paulo Jacinto e Viçosa (Figura 1). As culturas foram mantidas em meio de cultura BDA inclinado em tubos de ensaios e posteriormente armazenadas pelo método de Castellani (Gonçalves et al., 2007).

2.2 Extração de DNA

Para extração do DNA genômico, três discos de micélio com 5 mm de diâmetro de cada isolado foram depositados em 100 mL de meio líquido (sacarose 10 g, L-asparagina 2 g, extrato de levedura 2 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,44 mg, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,48 mg, e $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,36 mg) (Zauza et al., 2007) em Erlenmeyers de 250 mL, mantidos sob agitação a 150 rpm a 26°C durante 7 dias. Após esse período, o micélio foi lavado com água destilada e mantido em papel filtro esterilizado por 12 h para completa desidratação. Em seguida, o micélio foi macerado em nitrogênio líquido em almofariz. A extração de DNA foi realizada utilizando o protocolo de CTAB (Murray e Thompson, 1980). O *pellet* obtido foi ressuscitado em 50 μL de TE 1X com adição de RNase A (2mg/ml) (Sambrook et al., 1989) e incubado a 37°C por 2 h. O DNA extraído foi armazenado a -20°C e quantificado após eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio a 1,5% usando fago lambda como padrão de massa molecular.

2.3 Reações de AFLP

Todas as reações de AFLP foram realizadas segundo as instruções do fabricante (Invitrogen KIT AFLP - AFLP[®] Analysis System I). A concentração de DNA nas amostras obtidas dos isolados de *C. eragrostidis* foi ajustada para aproximadamente 14ng. O DNA genômico total padronizado foi clivado com duas enzimas de restrição: *EcoRI* e *MseI* por 2 h a 37°C e em seguida, a 70°C por 15 minutos para interromper a clivagem. Em seguida, os adaptadores foram ligados nas extremidades dos fragmentos do DNA digerido por meio da T4 DNA ligase e da solução de ligação dos adaptadores a 20°C por 2 h.

O produto de PCR da pré-amplificação foi diluído (1:50) e usado como molde para amplificações seletivas com dois e um nucleotídeo(s): E+AC/+MA e E+AA/+MA. Em seguida, as amostras foram desnaturadas a 90°C por 3 minutos para separação dos fragmentos em gel de poliacrilamida a 6% submetido à pré-corrída a 120 W. A corrida foi realizada a 70 W por aproximadamente 3 h, em tampão TBE 1X. Marcadores de 50pb e de 100pb foram utilizados como referência de peso molecular.

2.4 Coloração do gel

Após eletroforese, o gel de poliacrilamida foi submetido ao processo de coloração das bandas geradas. A coloração seguiu as seguintes etapas: lavagem em Solução fixadora I (Etanol 10% + Ácido Acético 1%) por 10 min; Solução fixadora II (Ácido Nítrico 1,5%) por 3 min; Solução de coloração (Nitrato de Prata 0,2%) por 20 min ao abrigo da luz; Solução reveladora (Carbonato 3% + Formaldeído 0,02%) até o surgimento das bandas e Solução bloqueadora (Ácido Acético 5%) por 5 min. Sempre efetuando uma lavagem com água entre uma solução e outra (Creste et al., 2001). Todas as soluções foram mantidas resfriadas e todas as lavagens ocorreram sob agitação

constante. Em seguida, a placa foi submetida à secagem ao ar, fotografada e as bandas foram avaliadas com base na massa molecular.

2.5 Análise dos dados

Cada banda gerada foi considerada como um loco com 2 alelos: presença (1) ou ausência (0) da banda. Uma matriz binária foi construída para criar os haplótipos multilocus no SNAP (Aylor et al., 2006). Cada município foi considerado como uma população de patógenos e análises intrapopulacionais foram realizadas com a avaliação da variação na frequência alélica para cada loco e diversidade gênica em cada município. A diversidade gênica na população total (H_t) e dentro das subpopulações (H_s), o coeficiente de diferenciação genética (G_{st}) e a intensidade de fluxo gênico (N_m) entre as populações dos diferentes municípios foram calculados usando a estatística de Nei's (h) (Nei, 1973) no programa POPGENE version 1.32 (Yeh et al., 1997). Uma análise interpopulacional foi conduzida com a construção de um dendrograma baseado na distância de Jaccard para estimar a distância genética usando UPGMA (Unweighted Pair Group Method of Averages) no programa R version 2.9.1 (R Development Core Team, 2008). A AMOVA foi usada para estimar a variância genética presente dentro e entre as populações, utilizando o programa Arlequin 3.1 (Excoffier et al., 2005). O relacionamento entre diversidade genética e distância geográfica foi estimado pelo teste de Mantel (Mantel, 1967), usando o programa R. A distância genética foi estimada pelo coeficiente de Jaccard e a significância da correlação foi estimada com base em 1000 permutações.

3 RESULTADOS

Foram geradas 150 bandas polimórficas com tamanho variando entre 100 e 600 pares de bases usando os dados combinados dos *primers* E+AC/+MA e E+AA/+MA. Houve alto polimorfismo para as marcas obtidas e cada isolado constituiu em haplótipo único. A diversidade gênica total (H_t) foi 0,31 (desvio padrão = $\pm 0,03$) e $H_s = 0,3$ (s.d. $\pm 0,02$). A diversidade gênica (h) detectada para todos os locos ($n = 150$) foi $h = 0,31$ (s.d. $\pm 0,16$).

Os valores de diversidade gênica para as populações de Viçosa, Chã Preta e Paulo Jacinto foram $h = 0,28$ (s.d. $\pm 0,17$), $h = 0,31$ (s.d. $\pm 0,17$) e $h = 0,29$ (s.d. $\pm 0,17$), respectivamente. A diversidade gênica nas populações de *C. eragrostidis* foi alta. A diferenciação genética estimada pela média G_{st} foi baixa ($G_{st} = 0,06$). O fluxo gênico estimado entre as populações foi alto ($N_m = 7,9$). Alta identidade genética e baixa distância genética foram observadas entre as populações (Tabela 1).

Na análise de agrupamento, os isolados não foram agrupados conforme origem geográfica (Figura 2). A AMOVA revelou que a variação genética foi maior dentro (97,9%) do que entre (2,1%) as populações. O coeficiente de correlação estimado com o teste de Mantel não significativo ($r = -0,003$; $P = 0,517$), portanto não houve correlação entre distância genética e distância geográfica.

4 DISCUSSÃO

Este foi o primeiro estudo para determinação da estrutura genética de populações de *C. eragrostidis* do Estado de Alagoas, baseado no marcador molecular AFLP. A variabilidade genética dentro das populações de *C. eragrostidis* estudada foi alta, porém houve baixa diferenciação entre as populações. Devido à proximidade geográfica entre os pontos amostrados para obtenção dos isolados, a alta variabilidade observada nesta população não era esperada. Além disso, o modo de reprodução de *C. eragrostidis* implica em baixa variabilidade na população, pois a reprodução assexuada caracteriza uma população com estrutura clonal. Neste caso, a taxa de mutação representa o mecanismo evolutivo mais significativo para gerar variabilidade.

Outra consideração importante e que pode ter influenciado a alta variabilidade constatada na população é a mistura de espécies de *Curvularia*. A identificação de *Curvularia* spp. é subjetiva e baseada principalmente na morfologia conidial (Sivanesan, 1987). Essa forma de identificação torna possível a identificação equivocada, devido à inconsistência e variabilidade que ocorrem dentro do isolado e entre isolados dependendo das condições (Sun et al., 2003). Alta variabilidade também foi observada por Lourenço Jr. et al (2009) ao estudar a estrutura genética de populações de *Alternaria solani* associadas à batateira e tomateiro de diversos campos de produção do Brasil. Esse autor detectou a formação de dois grupos de isolados geneticamente distintos, parcialmente relacionados ao seu hospedeiro de origem. Assim, a mistura de isolados de diferentes espécies pode ser a causa da alta variabilidade genética nas populações.

Não foi detectada estruturação da população conforme os municípios. Wang et al. (2006) obtiveram resultados similares ao analisar a população de *Fusarium*

oxysporum f.sp. *vasinfectum* (Fov), agente causal da murcha de fusário do algodoeiro, provenientes de diferentes regiões da Austrália e concluíram que o patógeno apresenta distribuição basal e que o desenvolvimento de cultivares resistentes por região deve ser realizado, assim como, alternativamente, o monitoramento continuado da distribuição geográfica desses haplótipos deve ser avaliado com medidas quarentenárias mais severas como uma futura estratégia para o manejo da doença. No presente estudo, a ausência de estrutura se deve mais provavelmente à alta variabilidade genética detectada. Uma das implicações da não estruturação para o manejo da doença está relacionada ao desenvolvimento de cultivares resistentes, que no caso da queima foliar do inhame deverá priorizar resistência inespecífica e não necessita ser localidade-específica.

Na análise de agrupamento, observou-se que os isolados não agruparam conforme origem geográfica. Dois fatores podem ter influenciado este resultado: alto grau de polimorfismo da combinação de *primers* usada no marcador AFLP e a proximidade geográfica das áreas amostradas. O alto grau de polimorfismo obtido com os primers selecionados acarretou na geração de haplótipos únicos. O elevado grau de polimorfismo é também uma das razões para o posicionamento do isolado CE9D no dendrograma. Nenhuma evidência de subdivisão da população de acordo com a localização geográfica foi detectada. A análise de Mantel revelou correlação negativa entre distância genética e geográfica, indicando que isolados de áreas diferentes não foram mais distintos geneticamente.

Trabalhos subsequentes serão necessários para eliminar a possibilidade de o polimorfismo elevado da combinação de *primers* ter introduzido um artefato nas análises. Novas amostras deverão ser processadas e novas combinações de *primers* avaliadas. Entretanto, no presente estudo, a repetibilidade das reações foi avaliada para

um subconjunto de isolados que constituíram em réplica biológica apropriada para o teste. Não se observou alteração do perfil de bandas para reações realizadas com um mesmo isolado, o que assegura a reprodutibilidade da técnica e diminui a ênfase na hipótese de artefato. Se constatados os altos níveis de variabilidade, há que se envidar esforços para elucidar qual(is) o(s) mecanismo(s) evolutivo(s) responsável(is) por este processo.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores expressam agradecimentos à FAPEAL pela concessão de bolsa de mestrado a Edlene Maria da Silva Moraes e ao CNPq pela concessão das bolsas de Produtividade em Pesquisa de Eduardo S. G. Mizubuti.

6 LITERATURA CITADA

- Ahmad I, Iram S, Cullum J (2006) Genetic variability and aggressiveness in *Curvularia lunata* associated with rice-wheat cropping areas of Pakistan. *Pakistan Journal of Botany* 38:475-485.
- Arnao E, Jayaro Y, Hinrichsen P, et al. (2008) Marcadores AFLP en la evaluación de la diversidad genética de variedades y líneas élites de arroz en Venezuela. *Interciencia* 33:359-364.
- Aylor DL, Price EW, Carbone I (2006) SNAP: Combine and Map modules for multilocus population genetic analysis. *Bioinformatics* 22:1399-1401.
- Brito NM (2006) Estudo da fisiologia e variabilidade genética de *Curvularia eragrostidis* na cultura do inhame. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal da Paraíba. Areia, PB.
- Brown JKM (1998) Surveys of variation in pathogen population and their application to disease control. In: Jones G (Ed.). *The epidemiology of plant diseases*. Dordrecht, Kluwer.
- Burdon JJ, Silk J (1997) Sources and patterns of diversity in plant pathogenic fungi. *Phytopathology* 87:664-669.
- Coelho RSB (2002) Resistência genética a doenças na cultura do inhame (*Dioscorea* spp.). Anais do II Simpósio Nacional Sobre as Culturas do Inhame e do Taro. João Pessoa: EMEPA-PB.
- Cooke BM e Kaye B (Eds.) (2006) *The Epidemiology of Plant Diseases*. 2ª Ed. University College Dublin, Ireland University College Dublin, Ireland. Springer.
- Creste S, Neto AT, Figueira A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter* 19:299-306.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin. Version 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- Ferreira ME, Grattapaglia D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª Ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN (EMBRAPA- CENARGEN Documento 20).
- Gisi U, Sierotzki H (2008) Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. *Eur. J. Plant Pathology* 122:157-167.
- Gonçalves RC, Alfenas AC, Mafia RG (2007) Armazenamento de microrganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. In: Alfenas AC, Mafia RG (Eds.) (2007) *Métodos em Fitopatologia*. Viçosa MG. Editora UFV.

- Lopes MS, Lopes MTG, Figueira A, Camargo LEA, Fungaro MHP, Carneiro MS, Vieira MLC (2002) Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 5:56-60.
- Lourenço Jr. V, Moya A, González-Candelas F, Carbone I, Maffia LA, Mizubuti ESG (2009) Molecular diversity and evolutionary processes of *Alternaria solani* in Brazil inferred using genealogical and coalescent approaches. *Phytopathology* 99:765-774.
- Majer D, Mithen R, Lewis BG, Vos P, Oliver RP (1996) The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycological Research* 100:1107-1111.
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27:209-220.
- McDonald BA (1997) The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology* 87:448-453.
- McDonald BA, Linde C (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40:349-379.
- McDonald BA, Linde C (2002) The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. *Euphytica* 124:163-180.
- McDonald BA, Zhan J, Burdon JJ (1999). Genetic structure of *Rhynchosporium secalis* in Australia. *Phytopathology* 89:639-645.
- Moura RM (2005) Doenças do Inhame-da-Costa. In: Kimati H, Amorim L, Bergamin Filho A, Camargo LEA, Rezende JAM. (Eds.) (2005) Manual de Fitopatologia. Vol. 2. Doenças das Plantas Cultivadas. 4ª Ed. São Paulo SP. Ceres.
- Mueller UG, LaReesa Wolfenbarger L (1999) AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution* 14:389-394.
- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Research*. 8: 4321-4325.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70:3321-3323.
- Paula H, Michereff SJ, Costa VSO, Laranjeira D, Oliveira SMA (2000) Variabilidad de aislamientos de *Curvularia eragrostidis* que causan atizonamiento de las hojas de ñame (*Dioscorea cayennensis*) en Pernambuco, Brasil. *Boletín Micológico* 11:85-92.
- Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Laboratory Press, New York.
- Santos ES (1996) Inhame (*Dioscorea* spp.): aspectos básicos da cultura. João Pessoa: EMEPA-PB/SEBRAE.

Santos ES, Macêdo LS (2002) Tendências e perspectivas da cultura do inhame (*Dioscorea* sp.). Anais do II Simpósio Nacional Sobre as Culturas do Inhame e do Taro. João Pessoa: EMEPA-PB.

Savary S, Cooke BM (Eds.) (2006) Plant Disease Epidemiology: Facing Challenges of the 21st Century. Under the aegis of an International Plant Disease Epidemiology Workshop held at Landernau, France. Hardcover.

Sivanesan A (1987) Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. Mycological Papers 158: 1-261.

Sun G, Oide S, Tanaka E, Shimizu K, Tanaka C, Tsuda M (2003) Species separation in *Curvularia* “geniculata” group inferred from Brn1 gene sequences. Mycoscience 44:239-244.

Van den Bosch F, Gilligan C (2008) Models of fungicide resistance dynamics. Annual Review of Phytopathology 46:123-147.

Visser B, Herselman L, Pretorius ZA (2009) Genetic comparison of Ug99 with selected South African races of *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*. Molecular Plant Pathology 10:213–222.

Vos P et al. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23:4407–4414.

Wang B, Brubaker CL, Tate W, Woods MJ, Matheson BA, Burdon JJ (2006) Genetic variation and population structure of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* in Australia. Plant Pathology 55:746–755.

Yeh FC, Yang R, Boyle TBJ, Ye Z, Mao JX (1997) POPGENE. Release 1.32. The user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta: Edmonton.

Zaffarano PL, McDonald BA, Zala M, Linde CC (2006) Global Hierarchical Gene Diversity Analysis Suggests the Fertile Crescent Is Not the Center of Origin of the Barley Scald Pathogen *Rhynchosporium secalis*. Phytopathology 96:941-950.

Zauza EAV, Alfenas AC, Mafia RG (2007) Esterilização, preparo de meios de cultura e fatores associados ao cultivo de fitopatógenos. In: Alfenas AC, Mafia RG (Eds.) (2007) Métodos em Fitopatologia. Viçosa MG. Editora UFV.

7 RECURSO DA INTERNET

R Development Core Team R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing (2008) Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. URL <http://www.R-project.org>

8 LISTA DE TABELAS E FIGURAS

- Tabela 1.** Identidade genética (acima da diagonal) e distância genética (abaixo da diagonal) de Nei's entre as populações. **71**
- Figura 1.** A. Mapa do Brasil com o Estado de Alagoas em destaque. **72**
B. Mapa de Alagoas indicando as áreas amostrados em regiões produtoras de inhame. CP: Chã Preta, PJ: Paulo Jacinto, VI: Viçosa.
- Figura 2.** Dendrograma gerado por UPGMA baseado no coeficiente de Jaccard da análise de AFLP de 50 isolados de *Curvularia eragrostidis* de Alagoas. As letras ao final da identificação de cada isolado correspondem à origem geográfica (CP: Chã Preta, PJ: Paulo Jacinto e VI: Viçosa). **73**

Tabela 1. Identidade genética (acima da diagonal) e distância genética (abaixo da diagonal) de Nei's entre as populações.

População	Viçosa	Chã Preta	Paulo Jacinto
Viçosa	****	0.9583	0.9506
Chã Preta	0.0426	****	0.9729
Paulo Jacinto	0.0507	0.0274	****

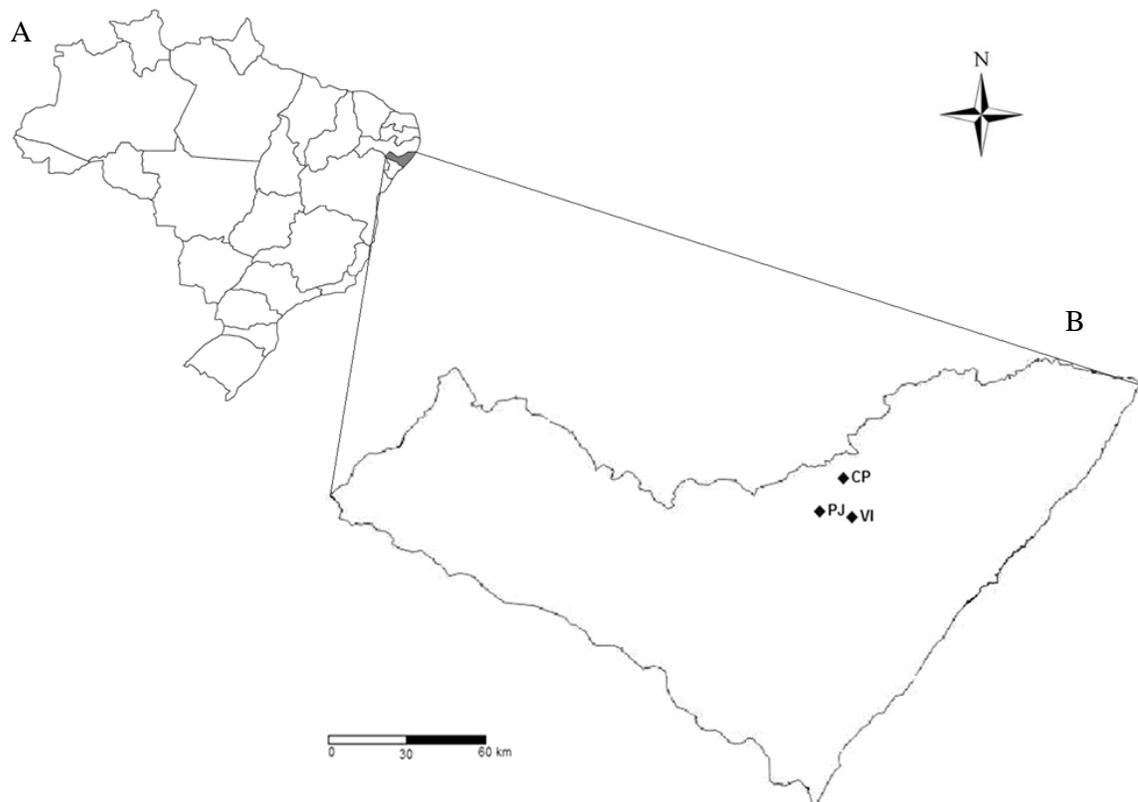


Figura 1. A. Mapa do Brasil com o Estado de Alagoas em destaque. B. Mapa de Alagoas indicando as áreas amostrados em regiões produtoras de inhame. CP: Chã Preta, PJ: Paulo Jacinto, VI: Viçosa.

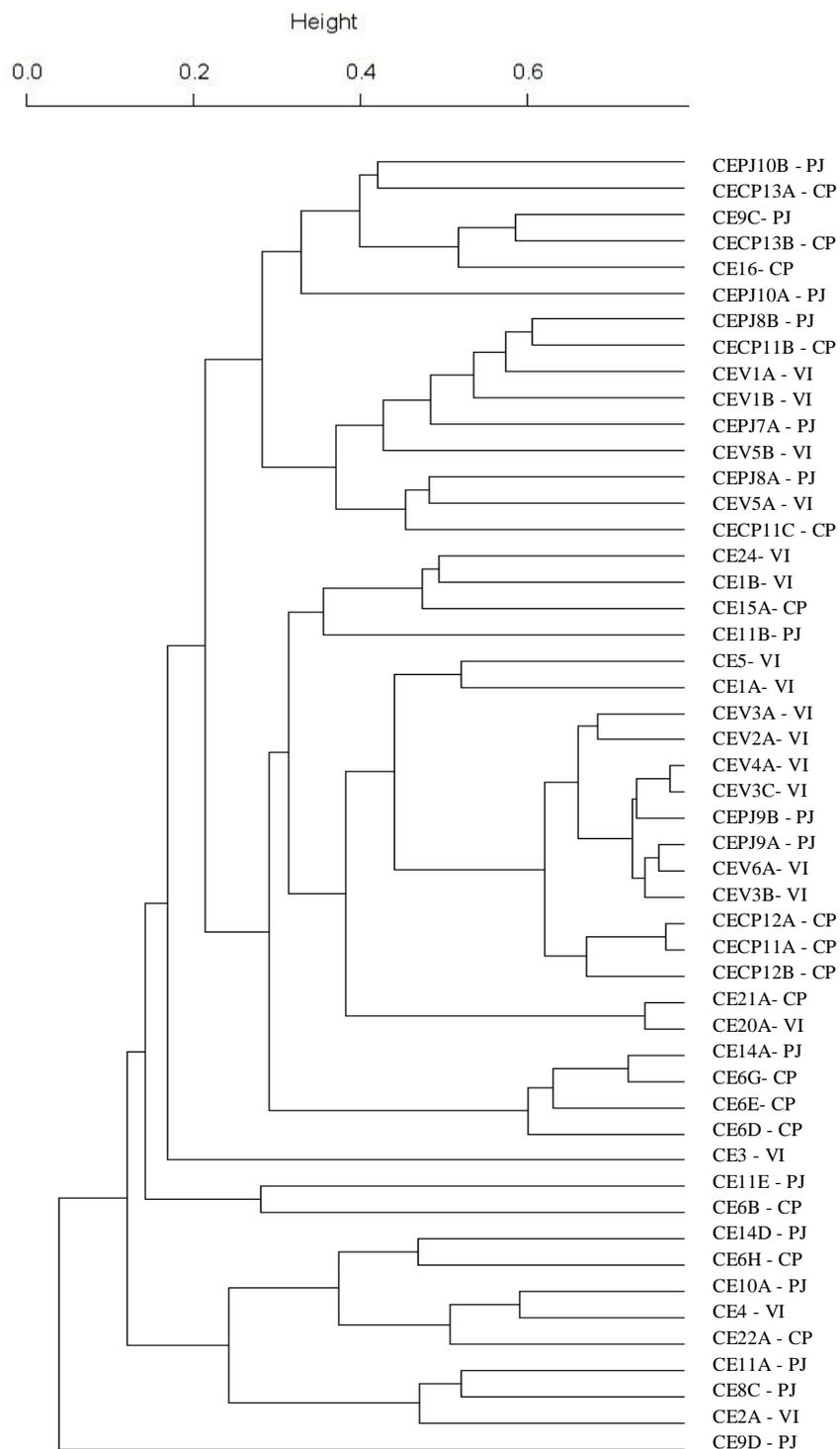


Figura 2. Dendrograma gerado por UPGMA baseado no coeficiente de Jaccard da análise de AFLP de 50 isolados de *Curvularia eragrostidis* de Alagoas. As letras ao final da identificação de cada isolado correspondem à origem geográfica (CP: Chã Preta, PJ: Paulo Jacinto e VI: Viçosa).

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

1. Análises morfológicas e filogenéticas suportam a ocorrência de uma espécie dominante, *Curvularia eragrostidis*, associada à queima das folhas de inhame no estado de Alagoas;
2. A população de *C. eragrostidis* estudada possui alta variabilidade genética e patogênica, o que pode dificultar estratégias de manejo da queima foliar, como por exemplo, o uso de variedades resistentes.

Normas do periódico Tropical Plant Pathology

Instruções para Autores

Versão 15 fev 2008

Escopo da Revista

A revista **Tropical Plant Pathology** é um periódico internacional, de periodicidade bimestral, publicado pela Sociedade Brasileira de Fitopatologia. Tem como objetivo a publicação de resultados de pesquisa básica e aplicada sobre todos os aspectos da Fitopatologia. São recebidas contribuições das áreas de micologia, bacteriologia, virologia, nematologia, epidemiologia, interação planta-patógeno, genética de fitopatógenos, aspectos bioquímicos e moleculares de fitodoenças, doenças não infecciosas e de pós-colheita, e outros tópicos que tenham como objetivo o melhor entendimento ou a prevenção de doenças de plantas. Trabalhos sobre prospecção ou avaliação de produtos naturais e sintéticos ou sobre elementos de resistência a patógenos podem ser aceitos como artigo somente se apresentarem informações inéditas sobre o modo de ação ou mecanismos de resistência. Primeiros relatos de fitodoenças devem ser apresentados no formato ‘Comunicação’.

Política Editorial

Embora **Tropical Plant Pathology** seja órgão oficial da Sociedade Brasileira de Fitopatologia, contribuições de membros e não-membros da Sociedade são bem vindas. É pré-requisito fundamental que manuscritos submetidos não tenham sido e nem serão publicados em outros periódicos. Com a aprovação do manuscrito para publicação, a Editora adquire plenos e exclusivos direitos sobre a matéria em todas as línguas e países. Incide custo somente para a produção de páginas coloridas. A pedido dos autores, separatas serão disponibilizadas em forma de arquivo pdf sem custo adicional.

Manuscritos considerados em consonância com o escopo da revista serão avaliados por um Editor Associado e pelo menos dois revisores ad-hoc externos. A aceitação do manuscrito pelo Editor se baseia na qualidade do trabalho como contribuição original e substancial para a área e apresentação geral do manuscrito.

Submissão de Manuscritos

1 Manuscritos devem ser enviados para:

Ludwig H. Pfenning, Editor Chefe

Tropical Plant Pathology – Comissão Editorial

Universidade Federal de Lavras
Cx. Postal 3066
37200-000 Lavras MG

2 Documentos necessários para submissão de manuscrito:

- a) Uma carta de encaminhamento, assinada por todos os autores, declarando a sua anuência com a submissão do manuscrito e que a matéria não está sendo avaliada nem publicada em outro periódico;
- b) Declaração de transferência de direitos autorais à Editora, disponível na página da revista na Web;
- c) Uma versão impressa do manuscrito, incluindo fotografias e demais elementos gráficos;
- d) Cópia digital do texto e tabelas em plataforma Windows, Figuras em TIFF or JPEG, gravadas em arquivos separados. (Para Figuras, veja também instruções detalhadas no item 3.1.h.) CD's e disquetes devem ser identificados com o nome e sobrenome do primeiro autor;
- e) Comprovante de depósito da taxa de tramitação no valor de R\$ 50, em favor de Banco do Brasil, agência 0364-6, conta no. 36.981-0.

A falta de qualquer elemento pode causar atrasos na tramitação ou devolução do manuscrito mesmo antes da revisão. A Comissão Editorial aprecia os esforços envidados pelos autores para que o texto seja elaborado em linguagem correta antes da submissão.

3 Formatos

3.1 Artigo Científico

O texto do manuscrito deve ser redigido em Inglês, em espaço duplo usando fonte 12 pt, impresso em papel A4 em um só lado, com margens de 2,5 cm, numeração contínua de páginas e linhas, começando pela primeira página, incluindo Agradecimento, Referências, Tabelas, Legendas e Apêndices. Manuscritos redigidos em Português ou Espanhol também serão aceitos.

Os seguintes elementos devem iniciar-se em uma nova página, na seqüência indicada:

- a) A **página inicial** deve conter: um título conciso e informativo, de preferência com não mais de 150 caracteres com espaços; nome dos autores, sendo o primeiro e último sem abreviação; local de trabalho ou local da realização do trabalho, incluindo Departamento ou Setor, Instituição, CEP e cidade, estado e país; locais distintos devem ser indicados com numeração sobrescrita; título resumido de até 35 caracteres com espaços; nome do autor para correspondência, incluindo endereço de e-mail. O autor para correspondência é responsável pela leitura da prova tipográfica, o pagamento de ilustrações coloridas e qualquer outra tarefa inerente à correta tramitação do manuscrito.

b) O “**Abstract**” sumariza aspectos da metodologia, os principais resultados e conclusões do trabalho. Deve ser redigido em parágrafo único com não mais de 200 palavras, sem citações bibliográficas. Até seis palavras chave devem ser incluídas, diferentes de termos mencionados no título. Todos os manuscritos incluem também um Resumo em português. Manuscritos redigidos em português ou espanhol incluem também um Abstract em inglês.

c) O **texto** deve ser redigido da forma mais sucinta e objetiva possível. Citações no texto devem indicar os sobrenomes dos autores e ano da publicação; quando o trabalho tiver dois autores cita-se o sobrenome de ambos, quando há três ou mais autores, cita-se o sobrenome do primeiro usando-se et al. Referências com a mesma citação devem ser listadas em ordem cronológica, referências com o mesmo ano de publicação devem ser listadas por ordem alfabética do sobrenome do primeiro autor. Trabalhos com o mesmo primeiro autor são listados em ordem cronológica, separados por vírgula (p.ex. Barreto et al., 1966a, 1966b, 2000). Somente trabalhos publicados ou no prelo devem ser citados. Quando se usa “Comunicação pessoal” ou “Dados não publicados”, todos os nomes devem ser citados com iniciais e sobrenome. Números: no texto, números de um a nove são escritos por extenso, exceto quando indicam datas, fração de decimal, porcentagem ou unidade de medida. A letra arábica é usada para números maior de nove. Deve-se evitar iniciar uma frase com número. URLs para programas, dados e outras fontes de informação da Web devem ser listados na seção Recursos da Internet (Internet Resources Section), imediatamente após da seção Referências Bibliográficas. URLs de citações bibliográficas de artigos publicados em periódicos eletrônicos, devem ser indicados na seção Referências Bibliográficas.

O texto inclui os seguintes elementos:

Introdução - descrição do contexto que levou a condução do estudo;

Material e Métodos – relata detalhes relevantes para a condução do estudo permitindo a sua repetição. Métodos da avaliação estatística devem ser explicados no final da seção;

Resultados – deve-se evitar duplicação no texto e em tabelas. Comentários sobre o significado dos resultados procedem, entretanto a discussão mais aprofundada deve constar da seção Discussão;

Discussão – resultados e descobertas do trabalho devem ser colocados no contexto com outras relevantes informações publicadas, perspectivas decorrentes do trabalho devem ser mencionadas e discutidas. Idéias e hipóteses de outras publicações não devem ser discutidas somente no intuito de incrementar a apresentação. Alguns manuscritos podem exigir um formato diferente em função de seu conteúdo.

d) **Agradecimentos.** Único parágrafo inserido após a Discussão, que deve fazer referência a apoio financeiro, e contribuição técnica ou intelectual.

e) **Referências Bibliográficas** são listadas em ordem alfabética do sobrenome do primeiro autor. Referências com o mesmo primeiro autor são listadas conforme a seguir: primeiro, como único autor, em ordem cronológica; segundo, com somente um co-autor, em ordem alfabética de acordo com o sobrenome do co-autor e então, quando há dois ou mais co-autores, em ordem cronológica, independente do sobrenome dos co-autores. O título de periódicos é citado por extenso. Somente trabalhos publicados ou no prelo devem usados como referência. Artigos submetidos não são aceitos como referência. Os autores devem evitar a citação de Teses e Resumos.

“Comunicação pessoal” ou “Dados não publicados” são citados somente no texto. “Comunicação pessoal” se refere a informações fornecidas por indivíduos que não são autores do trabalho; “Dados não publicados” se refere a dados gerados por pelo menos um dos autores do manuscrito em análise.

Artigo científico

Reis RF, Goes A, Timmer LW (2006) Effect of temperature, leaf wetness, and rainfall on the production of *Guignardia citricarpa* ascospores and on black spot severity on sweet orange. *Fitopatologia Brasileira* 31:29-34.

Arnold AE, Medjía LC, Kylló D, Rojas EI, Maynard Z, Robbins N, Herre EA (2003) Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 26:15649-15654.

Capítulo de livro

Campos VP, Villain L (2005) Nematode parasites of coffee and cocoa. In: Luc M, Sikora RA, Bridge J (Eds.) *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. Wallingford UK. CAB International. pp. 529-580.

Livro de autor

Agrios GN (2005) *Plant Pathology*. 5th Ed. Amsterdam. Elsevier Academic Press.

Livro editado

Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA (Eds.) (2005) *Manual de Fitopatologia*. Vol. 2. Doenças das Plantas Cultivadas. 4ª. Ed. São Paulo SP. Ceres.

Documento eletrônico

CONAB. Cana-de-açúcar. Safra 2006 -2007.

www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/BoletimCana-Novembro2006-07.pdf

Uma cópia da primeira página ou carta de aceitação deve ser enviada para cada artigo citado que não esteja publicado. Cópias de Comunicações pessoais também devem ser disponibilizadas, permitindo sua verificação.

f) **Recursos da Internet** indica os endereços (URL's) onde dados apresentados no trabalho são disponibilizados, programas de software e demais recursos da Internet utilizados na avaliação e processamento de informação. Na citação de bancos de dados, a data do acesso deve ser indicada.

Exemplo:

CoreNucleotides, www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez (Dezember 12, 2007)

LEM Software, http://dir.niehs.nih.gov/dirbb/weinbergfiles/hybrid_design.htm

g) **Tabelas.** Cada tabela deve iniciar em uma nova página e receber um título conciso e informativo no cabeçalho. Um subtítulo deve ser indicado para cada coluna. Tabelas devem ser numeradas de acordo com sua citação no texto. Rodapés devem ser indicados com números sobrescritos, e redigidos logo abaixo da tabela. As tabelas devem ser inseridas após a seção Referências Bibliográficas.

h) **Figuras** são numeradas de acordo com sua citação no texto e devem ser formatadas conforme a largura das colunas da revista, aproximadamente. Gráficos e fotografias devem ser apresentados em formato TIFF ou JPEG, gravados em arquivos separados, no tamanho aproximado em que aparecerão na revista. Legendas são apresentadas em página própria, após a seção Referências Bibliográficas. Os autores devem inserir chaves e barra diretamente na figura. Deve-se evitar figuras que foram digitalizadas a partir de versões impressas.

Para reprodução com qualidade na revista, imagens precisam ter resolução mínima de 300 dpi. Desenhos e gráficos necessitam resolução mínima de 600-1200 dpi. Essas resoluções se referem ao tamanho em que as ilustrações serão publicadas. Quando se prevê redução ou aumento, a resolução precisa ser ajustada. Ilustrações coloridas são aceitas, mas os autores devem assumir os custos. Para submissão, veja item 2 (Submissão de manuscrito).

j) **Nomenclatura** de nomes científicos deve seguir o padrão internacional atual, disponível para acesso público na Internet.

Plantas: The International Plant Names Index, www.ipni.org/index.html

Fungos: Index Fungorum, www.speciesfungorum.org/Names/Names.asp

Bactérias: www.isppweb.org/names_bacterial.asp

Nematóides: www.iczn.org/iczn/index.jsp

Vírus: International Code for Classification and Nomenclature, publicado no 8o. Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV (2005).

Nomes científicos de gêneros, espécie e taxons infra-específicos devem ser impressos em itálico, na primeira citação no Resumo e no “Abstract” por extenso. As citações subseqüentes devem ser abreviadas no nível genérico. Na primeira menção no texto deverão ser escritos por extenso. A autoridade do nome científico de seres vivos deve ser citada no corpo principal do texto, na ocasião de sua primeira aparição, somente quando os organismos são objeto do estudo.

j) **Culturas e outro material de referência.** A origem e o depósito de culturas deve ser indicado. Os autores são incentivados a depositar material de referência (vouchers) de culturas e espécimes em coleções certificadas ou reconhecidas para fins de documentação de sua pesquisa, e indicar o local do depósito no texto.

k) **Sequências.** Números de acesso citados de Genbank ou outros bancos de dados precisam ser citados e disponibilizados para o público no momento da publicação do artigo.

l) **Acesso a dados.** Acesso a informação detalhada sobre dados e material usado para a realização de estudos citados deve ser facilitado.

m) **Abreviações e Unidades.** Unidades SI devem ser usados, como p. ex. mg, g, m, mm, L, mL, µL, h, min, s, mol, kg/ha. Uma abreviação para qual não há padrão, precisa ser definida por extenso em sua primeira menção.

n) **Defensivos agrícolas.** Deve-se utilizar apenas nomes técnicos ou princípios ativos. Não é recomendável a menção de nomes comerciais de produtos ou de empresas que os produzem e que sugira sua utilização. As fórmulas químicas devem ser escritas em uma linha e obedecer ao padrão de nomenclatura atual.

3.2 Comunicação

Destinado à publicação de resultados e observações que não justifiquem a publicação de um artigo completo. Não devem se basear em resultados meramente preliminares. Destina-se ainda à publicação de relatos originais de fitodoeças para o território brasileiro ou outros países. Registros novos para regiões ou estados da Federação são aceitos somente em casos específicos, como no caso de patógenos quarentenários, patógenos com alta especificidade em relação ao hospedeiro ou em plantas de valor comercial relevante. Esses manuscritos devem conter ilustrações do patógeno, indicação do depósito de

material de referência de acesso público, de preferência no país de origem, depósito de seqüências de DNA e ser acompanhados da documentação exigida pela legislação específica, quando couber. Devem possuir 12 páginas ou menos, digitadas em espaço duplo em fonte 12, já incluindo referências. Todos os manuscritos incluem também um Resumo em português. Manuscritos redigidos em português ou espanhol incluem também um Abstract em inglês, não excedendo 200 palavras cada. O texto deve ser redigido em seqüência única, incluindo Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão. São aceitáveis até duas figuras e duas tabelas. O formato da primeira página e da seção Bibliografia segue o do Artigo.

3.3 Carta ao Editor

Relata ou responde a questões publicadas recentemente. A discussão de assuntos políticos, sociais ou éticos de interesse para fitopatologistas também é bem vinda.

3.4 Artigo de revisão

Artigos de revisão são bem vindos. Os autores devem consultar o Editor antes da submissão.

4 Prova Tipográfica

A prova tipográfica será enviada ao autor para correspondência. Alterações maiores, que não representem erros cometidos durante a composição gráfica, sujeitam os autores ao pagamento de taxas. Comentários adicionados ao texto nessa fase exigem a aprovação do Editor. As provas devem ser devolvidas dentro de 72 horas.

5 Separatas

Separatas são disponibilizadas sem custo na forma de arquivo pdf quando solicitadas.

6 Autoria

Quem submete manuscritos para **Tropical Plant Pathology – Fitopatologia Brasileira** deve respeitar a pesquisa de seus pares, evitando a desvalorização da co-autoria. Cada autor deve ter oferecido contribuição intelectual substancial quanto ao desenho, a condução, análise ou interpretação do estudo. Cada autor precisa aprovar a versão final do manuscrito a ser publicado e estar disposto a assumir publicamente responsabilidade por sua contribuição no trabalho. O primeiro autor, assim como o autor para correspondência, devem assumir responsabilidade pública para o trabalho na íntegra.