

ISADORA FERNANDES DE FRANÇA

**ESTRUTURA E RELAÇÕES GENÉTICAS DE *Curvularia*
eragrostidis NO NORDESTE DO BRASIL**

**RECIFE - PE
FEVEREIRO – 2011**

ISADORA FERNANDES DE FRANÇA

**ESTRUTURA E RELAÇÕES GENÉTICAS DE *Curvularia*
eragrostidis NO NORDESTE DO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fitopatologia.

**RECIFE - PE
FEVEREIRO – 2011**

Ficha catalográfica

F814e França, Isadora Fernandes de
Estrutura e relações genéticas de *Curvularia eragrostidis*
no nordeste do Brasil / Isadora Fernandes de França – 2011.
95 f.: il.

Orientador: Gaus Silvestre de Andrade Lima
Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia,
Recife, 2011.

Referências

1. Variabilidade genética 2. *Dioscorea cayenensis*
3. Filogenia 4. *Cochliobolus* I. Lima, Gaus Silvestre de
Andrade, orientador II. Título

CDD 632

ISADORA FERNANDES DE FRANÇA

**ESTRUTURA E RELAÇÕES GENÉTICAS DE *Curvularia*
eragrostidis NO NORDESTE DO BRASIL**

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima (UFAL) – Orientador

Prof. Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara (UFRPE) – Co-orientador

**RECIFE - PE
FEVEREIRO – 2011**

**ESTRUTURA E RELAÇÕES GENÉTICAS DE *Curvularia*
eragrostidis NO NORDESTE DO BRASIL**

ISADORA FERNANDES DE FRANÇA

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 28/02/2011

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima (UFAL)

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Gildemberg Amorim Leal Júnior (UFAL)

Dr. Jean Herllington Araújo Monteiro (UFAL)

Dr. Ailton Reis (Embrapa Hortaliças)

Prof. Dr. Delson Laranjeira (UFRPE)

**RECIFE - PE
FEVEREIRO – 2011**

DEDICO

Aos meus pais, Luiz e Doralice, meus irmãos, Luilson, Alice, Daniel e Rafael, e meu marido Emil pelo amor, carinho, paciência e incentivo. Aos meus queridos sobrinhos, Luiz Vinicius, Maria Gabriela e Gabriel.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por permitir que tudo transcorresse bem durante toda a realização deste trabalho, quer fosse durante as viagens de coleta ou na parte laboratorial.

À Universidade Federal Rural da Pernambuco pela oportunidade de participar do curso, e à Universidade Federal de Alagoas e Universidade Federal de Viçosa pelo apoio logístico para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa, essencial para a completa realização do curso e deste trabalho, e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão do auxílio mobilidade discente, fundamental para o meu intercâmbio entre as instituições.

Ao Prof. Dr. Gaus Andrade, pela orientação, paciência e amizade, durante estes quatro anos de estudo.

Ao Prof. Dr. Eduardo Mizubuti pela cuidadosa avaliação deste manuscrito e também pelas valiosas sugestões prestadas, além de ter cedido seu laboratório para a realização de parte deste trabalho.

Ao amigo Braz da Hora Junior pela paciência, conhecimentos transmitidos e assistência durante as análises dos dados.

Ao amigo Eddy Barraza pela companhia e ajuda durante as viagens de coleta.

À Prof.^a Dra. Iraildes Assunção pela amizade, compreensão e ajuda durante as atividades laboratoriais.

Ao Prof. Dr. Marcos Câmara por ceder seu laboratório para realizar as etapas de isolamento e monospóricas dos fungos.

Aos professores do programa de pós-graduação em fitopatologia.

Às grandes amigas Erika Graciano, Erlen Keila, Kátia Cilene, Joyce Lima, Kamila Câmara, Kirley Marques, Janaina Cortês e Sarah Jaqueline pelas alegrias compartilhadas, ajuda e apoio durante toda a trajetória do doutorado.

A todos os amigos da turma pela convivência durante o curso, em especial a Frank Costa e Cintia Bezerra.

Aos colegas de trabalho Jean Herllington, Alba Valéria, Valéria Sandra, Arthur Alencar, Erika Cristina, Sheila Tavares, Mariote Brito, Mikaele, Jaqueline, Maira e

também aos amigos recentes do laboratório de Biologia de populações da UFV pelo apoio, companhia e ajuda.

A Josefa Marcolino pela convivência, amizade e acolhida em sua residência durante parte da realização deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
CAPÍTULO I – Introdução Geral	7
Referências Bibliográficas	25
CAPÍTULO II – Estrutura genética da população de <i>Curvularia eragrostidis</i> (Henn.) J.A. Mey., agente etiológico da queima das folhas do inhame	35
Resumo	37
Introdução	37
Material e Métodos	39
Resultados	43
Discussão	45
Agradecimentos	48
Referências	48
CAPÍTULO III - Filogenia molecular do gênero <i>Cochliobolus</i> Drechsler com ênfase nas relações filogenéticas do anamorfo <i>Curvularia eragrostidis</i> (Henn.) J.A. Mey.	63
Resumo	65
Introdução	65
Material e Métodos	67
Resultados	70
Discussão	74
Agradecimentos	76
Referências	77
CONCLUSÕES GERAIS	94

RESUMO

A cultura do inhame (*Dioscorea* spp.) apresenta grande importância socioeconômica para a região Nordeste do Brasil, devido à excelente qualidade nutritiva e energética de suas túberas e a utilidade para a alimentação humana. A queima das folhas, conhecida também como pinta preta, causada pelo fungo *Curvularia eragrostidis*, é responsável por grandes prejuízos à cultura do inhame no Nordeste brasileiro, principalmente nos Estados da Paraíba e Pernambuco, que são os maiores produtores. Este trabalho teve como objetivos analisar a estrutura populacional de isolados de *C. eragrostidis* patogênicos ao inhame, *D. cayennensis*, nos estados de Alagoas, Pernambuco e Paraíba, bem como estudar as relações filogenéticas destes com as demais espécies do gênero *Cochliobolus*. No primeiro estudo, foram obtidos 151 isolados, dos quais foram analisados as sequências de parte da região ITS, e dos genes β -*tubulina* e *gpd* e os perfis de DNA com marcadores ISSR. Observou-se que as sequências de DNA não apresentaram variabilidade, e os dados de ISSR mostraram a presença de seis haplótipos. A população do patógeno é caracterizada por baixa diversidade genotípica, predominância de um ou dois genótipos uniformemente distribuídos, predominância de reprodução assexuada, presença de fluxo genotípico entre as regiões de cultivo. No segundo estudo, foram realizadas análises filogenéticas de sequências de 81 isolados de espécies da família Pleosporaceae, através dos métodos de máxima verossimilhança e inferência bayesiana. Os 16 isolados de *C. eragrostidis* de inhame analisados estão relacionados com espécies do gênero *Cochliobolus* que apresentam conídios menores e mais próximos filogeneticamente de *C. clavata*, *C. brachyspora*, *C. oryzae* e *C. intermedia*.

Palavras-chave: Variabilidade genética, *Dioscorea cayennensis*, Filogenia, *Cochliobolus*.

ABSTRACT

The yam (*Dioscorea* spp.) has great social importance for the Northeast region of Brazil, due to the excellent nutritional quality and energy of their tubers and very useful for human alimentation. Leaf-spots on white yam, caused by the fungus *Curvularia eragrostidis*, is responsible for damage to yam in northeast Brazil, mainly in the states of Paraíba and Pernambuco. The aim of this study was to analyze the population structure of isolates of *C. eragrostidis* pathogenic to yam, *D. cayennensis*, in the states of Alagoas, Pernambuco and Paraíba, and to study the phylogenetic relationships of these with other species in the genus *Cochliobolus*. In the first study, 151 isolates were obtained from leaves of yam, which were analyzed the sequences of part of the ITS region and β -tubulin gene and *gpd* and the profiles of DNA with ISSR. It was observed that the DNA sequences had no variation, and ISSR data showed the presence of six haplotypes. The pathogen population is characterized by low genotypic diversity, predominance of one or two genotypes evenly distributed, the predominance of asexual reproduction, and the presence of genotypic flow between the regions of cultivation. In the second study, it was conducted phylogenetic analysis sequences of 81 isolates of species of the family Pleosporaceae using the methods of maximum likelihood and Bayesian inference. The 16 isolates of *C. eragrostidis* from yam analyzed are related to the genus *Cochliobolus* species which has smaller conidia and they are phylogenetically closer to the species *C. clavata*, *C. brachyspora*, *C. oryzae* and *C. intermedia*.

Keywords: Genetic variability, *Dioscorea cayennensis*, Phylogeny, *Cochliobolus*.

Capítulo I

Introdução Geral

INTRODUÇÃO GERAL

A cultura do inhame

O inhame (*Dioscorea* spp.) é uma monocotiledônea da Família Dioscoreaceae, adaptada a zonas com precipitações pluviométricas em torno de 1300 mm anuais (SANTOS, 1996). É uma cultura de tubérculo, cultivada na África, Ásia, partes da América do Sul, bem como Caribe e ilhas do Pacífico Sul. As espécies cultivadas são *D. alata* L. (inhame água), *D. bulbifera* L., *D. cayenensis* Lam. (inhame amarelo), *D. esculenta* (Lour.) Burkill, *D. opposita* Thunb., *D. nummularia* Lam., *D. pentaphylla* L., *D. rotundata* Poir. (inhame branco) e *D. trifida* L. f. O inhame branco e o amarelo, naturais da África Ocidental, são os mais importantes em termos de quantidade e comercialização (ASIEDU; SARTIE, 2010).

As túberas produzidas são de alto valor nutritivo e energético, constituindo alimento básico para o consumo humano, amplamente utilizado na alimentação. Em função do seu valor alimentício, grande parte da produção é destinada ao mercado interno e a outra parte é exportada, principalmente para a Europa. Os pequenos grãos de amido são os responsáveis pela alta digestibilidade do inhame, sendo, por isso, recomendados nas dietas de recém-nascidos e de pessoas idosas e convalescentes (SANTOS; MACÊDO, 2002).

A zona dominante de produção do inhame é a África Ocidental, onde cerca de 48 milhões de toneladas (cerca de 93% da produção mundial) são cultivadas em 4 milhões de hectares anualmente e, principalmente, em Benin, Costa do Marfim, Gana, Nigéria e Togo (ASIEDU; SARTIE, 2010). O Brasil é o segundo maior produtor dessa hortaliça na América do Sul, com uma área colhida de 27 mil hectares e produção de 250 mil toneladas

(FAO, 2011). De acordo com o censo agropecuário, a região Nordeste foi responsável pela produção de 38.256 toneladas de inhame, tendo os Estados de Pernambuco, Paraíba e Alagoas contribuído respectivamente com 16.574, 8.441 e 2.872 toneladas (IBGE, 2006).

A cultura do inhame (*Dioscorea* sp.) apresenta grande importância socioeconômica para a região Nordeste do Brasil, sobretudo para os Estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia e Maranhão, por constituir negócio agrícola promissor. As túberas são altamente energéticas e ricas em vitamina do complexo B (tiamina, riboflavina, niacina e piridoxina), carboidratos, amido e minerais; apresenta baixo teor de gorduras, sendo ainda estimulante do apetite e depurador do sangue. Algumas espécies vêm sendo utilizadas para extração de sapogeninas esteroidais e de material de partida para a síntese de cortisona. (SANTOS, 2002)

O inhame constitui opção agrícola de grande potencial para ampliar o consumo no mercado interno e atender a demanda do mercado externo. Associado a isso, está o crescimento das exportações do produto, o que aumenta as expectativas e o interesse dos agricultores no cultivo dessa hortaliça, principalmente em função dos melhores preços oferecidos pelos exportadores. No entanto, para que haja retorno econômico da atividade, faz-se necessário estruturar a cadeia produtiva, promover melhoria dos sistemas de produção, da qualidade do produto, oferta constante e preços competitivos, fatores estes que estão associados aos conhecimentos técnicos e tecnologias disponíveis para a condução adequada da cultura (SANTOS, 2002).

O inhame é propagado por túberas semente ou seções da túbera. O uso de sementes verdadeiras como propágulos é restrita a estações de pesquisa, principalmente programas de melhoramento da cultura (ASIEDU; SARTIE, 2010). Os agricultores obtêm as túberas semente pela seleção de túberas pequenas (300 a 500 g) de cada colheita (muitas vezes estas são aquelas produzidas por plantas doentes); usando túberas da segunda colheita de

variedades de maturação precoce, que produzem múltiplas túberas por grupo; ou pelo corte do tubérculo em pedaços (AIGHEWI et al., 2003).

No mercado brasileiro têm destaque dois tipos de inhame: o da costa (*D. cayennensis*), único utilizado nas exportações, e o São Tomé (*D. alata*), este menos cultivado na região. No Nordeste, problemas fitossanitários, especialmente nematóides, vírus e fungos, dificultam o cultivo do inhame da costa (MOURA, 2005, RITZINGER et al., 2003).

Apesar da importância sócio-econômica que essa cultura representa para a região Nordeste do Brasil, sua produtividade ainda continua baixa, em torno de 11.141 t/ha, decorrente do manejo inadequado da cultura, do uso de túberas-semente de qualidade agrônômica inferior (desuniformidade no tamanho e na maturação, apresentando ferimentos e contaminação por nematoides e fungos), em função da indisponibilidade de material de melhor qualidade. Para aumentar a produtividade da cultura, é de fundamental importância se praticar o manejo cultural eficiente, sobretudo, considerando os aspectos relacionados ao plantio, ao crescimento e desenvolvimento da planta, à condução da cultura (fertilização, tratos culturais e controle fitossanitário) e às colheitas (SANTOS, 2002).

Queima das folhas do inhame

A cultura do inhame está sujeita a várias doenças. As doenças causadas por fungos são mais frequentes, tanto da parte aérea, interferindo na fotossíntese, como nas túberas, interferindo no armazenamento das substâncias de reservas (MENEZES, 2002). A queima das folhas, conhecida também como pinta preta, causada por *Curvularia eragrostidis* (Henn.) J.A. Mey. é responsável por prejuízos elevados à cultura do inhame no Nordeste

brasileiro, principalmente nos Estados da Paraíba e Pernambuco, que são os maiores produtores (SANTOS, 2002).

O sintoma primário da queima das folhas é uma mancha foliar necrótica, de coloração marrom-escura, frequentemente circundada por halo amarelo. As manchas tendem para formato circular, sendo limitadas, parcialmente, pelas nervuras do limbo foliar. É comum a coalescência de manchas, formando-se grandes áreas necrosadas. Em menor frequência, ocorrem lesões nos pecíolos e nos ramos. Incidindo sobre plantas jovens, que possuem folhas em desenvolvimento, o crescimento da hospedeira é afetado e a presença de folhas necrosadas e retorcidas constituem quadro típico de crestamento com nanismo. As perdas, nesses casos, são sempre elevadas. O sintoma secundário ou reflexo é o pequeno tamanho das túberas comerciais e túberas sementes (MOURA, 2005).

A dispersão dos esporos de *C. eragrostidis* ocorre principalmente pelo vento (SIVANESAN, 1990). Em condições epidemiológicas favoráveis, como 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 vento, o patógeno pode, em pouco tempo, comprometer a produtividade de campos de cultivo, com o aparecimento de grandes áreas de plantas queimadas e mortas (MICHEREFF et al., 2000; SANTOS et al., 1998).

Em meio de cultura batata-dextrose-ágar, *C. eragrostidis* cresce vigorosamente, formando colônias circulares de aspecto cotonoso e de coloração negra (MOURA, 2005). Os conidióforos podem ser isolados ou em grupos, simples ou raramente ramificados, retos ou curvados, algumas vezes geniculados próximo ao ápice, multiseptados, com coloração marrom, variando no comprimento, acima de 5 µm de diâmetro. Os conídios têm forma elipsoidal ou ovóide, com dimensões de 18 – 37 x 11 – 20 µm, com três septos, sendo o septo mediano apresentando-se como uma banda escura, as células centrais com coloração

marrom a marrom escura e as células externas de coloração marrom pálida (SIVANESAN, 1987).

A fase teleomórfica, *Cochliobolus eragrostidis* (Tsuda & Ueyama) Sivan. foi observada apenas em condições de laboratório e apresenta ascomas superficiais, globosos a sub-globosos, escuros, com 375 – 750 µm de largura, com um protuberante bico ostiolar, 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, dimensões de 150 – 240 x 12,5 – 22 µm e pseudoparáfises hialinas. Ascósporos hialinos, filiformes ou flageliformes, com 12 a 22 septos paralelamente a frouxamente espiralados nas ascas ou raramente espiralados em uma hélice, dimensões de 175 – 240 x 3,8 – 6,3 µm, com ou sem uma fina camada mucilaginosa (SIVANESAN, 1990).

Além do inhame, *C. eragrostidis* tem sido constatada em espécies botânicas de outras famílias como sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), batata doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), amendoim (*Arachis hypogea* L.), abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merr) (MENEZES; OLIVEIRA, 1993), e arroz (*Oryza sativa* L.) (RASHID, 2001).

Para o controle da queima das folhas do inhame são indicados fungicidas à base de maneb, mancozeb e iprodione (MOURA, 2005). Paula *et al.* (2000) testaram a sensibilidade de 42 isolados de *C. eragrostidis*, provenientes do Estado de Pernambuco, a iprodione. Todos os isolados foram sensíveis ao produto, apesar de terem sido encontradas diferenças na sensibilidade dos mesmos.

Estes autores também avaliaram a variabilidade destes 42 isolados quanto às diferenças na velocidade de desenvolvimento dos sintomas em plantas de inhame inoculadas; ao desenvolvimento da doença depois do aparecimento dos primeiros sintomas; e pelas características fisiológicas (taxa de crescimento micelial, esporulação e

germinação dos conídios). Foram constatadas diferenças entre os isolados quanto às variáveis estudadas, porém não foi observada correlação significativa entre as variáveis associadas à doença e as diferentes características fisiológicas dos isolados.

Apesar da importância de *C. eragrostidis* para a cultura do inhame, pouca se conhece sobre a variabilidade dessa espécie. Portanto, é importante gerar informações que possibilitem o entendimento das populações desse patógeno e, para subsidiar, o desenvolvimento de estratégias de manejo eficientes, como o melhoramento de plantas visando à resistência à doença.

Estrutura genética de populações de fitopatógenos

As populações de patógenos devem constantemente se adaptar a mudanças em seu ambiente para sobreviver. O plantio de variedades resistentes, as aplicações de fungicidas e o uso estratégico de fertilizantes, irrigação, e rotação de cultura podem representar dificuldades para o desenvolvimento da doença. Os fitopatologistas devem estar atentos à habilidade de os patógenos evoluírem, uma vez que os sistemas agrícolas impõem uma forte seleção direcional sobre as populações de patógenos (MCDONALD, 1997). Por esta razão, é necessário entender como as populações de patógenos irão evoluir em resposta a diferentes estratégias de controle.

A estrutura genética de populações refere-se à quantidade e distribuição da variação genética dentro e entre populações, e é uma consequência da interação de mecanismos evolutivos, como mutação, sistemas de reprodução, fluxo gênico ou migração, tamanho da população e seleção, os quais contribuem para a mudança genética (isto é, evolução) dentro de populações. Em fitopatologia, o foco é determinar quais fatores desempenham maior papel na evolução de patógenos e como estes mecanismos evolutivos interagem para

determinar a composição genética e potencial evolutivo das populações de fitopatógenos (MCDONALD, 1997; MCDONALD; LINDE, 2002).

Ademais, fatores associados à história de vida e estrutura da população tanto do patógeno (especificidade de hospedeiro, dispersão, ciclo de vida) como do hospedeiro (distribuição espacial, longevidade, fenologia, resistência), também podem influenciar a estrutura genética e o tamanho efetivo da população, e, por conseguinte, o potencial evolutivo do patógeno (BARRET et al., 2008).

Assim como na maioria dos microrganismos, em fungos fitopatogênicos os processos de recombinação e mutação são as principais fontes de variação genética. A recombinação ocorre por meio da reprodução sexual ou por hibridização somática, seguida de fusão nuclear (ciclo parassexual). (BURDON; SILK, 1997). Durante o ciclo sexual, novas combinações de alelos (genótipos) são criadas pela recombinação, que são testados em diferentes ambientes, com novos genes de resistência, fungicidas ou antibióticos. A mutação leva a mudanças nas sequências de DNA de genes criando novos alelos nas populações. Patógenos com altas taxas de mutação possuem maior risco de suplantarem genes de resistência do que patógenos com baixas taxas de mutação, pois nos primeiros há um aumento da probabilidade de ocorrer mutação de um gene de avirulência para virulência, ou de uma menor agressividade para uma alta agressividade (MCDONALD; LINDE, 2002).

Embora a reprodução sexual seja comum, muitas espécies são clonais ou primariamente endogâmicas, outras exibem ambos os modos de reprodução clonal e sexual que variam no tempo e espaço. As populações que se reproduzem sexuadamente geralmente exibem maior diversidade genotípica que as exclusivamente assexuadas (BARRET et al., 2008). Os patógenos com sistema de reprodução misto (sexual e assexual) possuem maior potencial evolutivo, já que durante o ciclo sexual, novas

combinações de alelos (genótipos) são criadas, e aquelas mais adaptadas são mantidas e podem aumentar a frequência em clones selecionados (MCDONALD; LINDE, 2002).

Além disso, o mesmo fungo pode apresentar diferentes modos de reprodução em diferentes localidades geográficas e em diferentes períodos. O componente clonal pode ser geograficamente restrito devido a práticas culturais. No entanto, há exemplos de migração e mudança genética entre fungos clonais e membros recombinantes da mesma espécie em outras localidades geográficas. Portanto, é necessário conhecer o modo de reprodução do patógeno nas escalas geográfica e temporal, o que permitirá uma maior chance de controle do patógeno na escala local (TAYLOR et al., 1999).

O fluxo gênico é um processo onde alelos (genes) ou indivíduos (genótipos) são trocados entre populações geograficamente separadas. Patógenos que apresentam maior fluxo gênico ou genotípico podem apresentar população com maior diversidade genética. Alto fluxo gênico tende a neutralizar os efeitos da deriva genética e homogeneizar populações adjacentes, aumentando a área espacial circundada pela população que estava isolada (BARRET et al., 2008; MCDONALD; LINDE, 2002). A migração de isolados permite a entrada de novos alelos de virulência, ou de resistência a fungicidas, em áreas onde a doença foi previamente controlada por genótipos resistentes de hospedeiros ou fungicidas, e também resulta na introdução de fitopatógenos em regiões ou continentes onde a doença não estava presente (ZAFFARANO et al., 2009).

As introduções modificam a estrutura genética das populações exóticas de fitopatógenos em suas novas áreas. Normalmente, estas populações fundadoras apresentam menor variabilidade quando comparada às populações de origem (GOODWIN et al. 1994; MILGROOM et al. 1996). Isto pode ocorrer devido à perda de variabilidade genética ocorrida pelo efeito fundador (introdução de pequenas populações contendo pouca

variação genética); pela deriva genética aleatória ou pela seleção exercida pelo novo ambiente (MONTARRY et al., 2010).

Porém, múltiplas introduções podem aumentar a variabilidade disponível para seleção no novo ambiente, por trazer junto diferentes combinações genéticas, como observado por Delmotte et al. (2008) para três raças de *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. & De Toni encontradas na França. O estabelecimento de um fitopatógeno, em um novo ambiente, pode modificar a biologia da espécie, em particular o balanço entre a reprodução sexual e assexual durante o ciclo de vida (TAYLOR et al., 1999). Desta forma, a avaliação das características de populações de fitopatógenos invasoras pode ajudar a entender as mudanças genéticas que acompanham estas introduções, e, por conseguinte, a epidemiologia dessas doenças (MONTARRY et al., 2010). É necessário também se definir as populações fonte e dreno de fitopatógenos e determinar os padrões de migração entre regiões, para se evitar a introdução e reduzir a dispersão de espécies e genótipos de patógenos. As informações podem ser usadas para determinar as melhores estratégias de intervenção, como quarentena ou uso estratégico de genes de resistência (ZAFFARANO et al., 2009).

Abordagens filogeográficas e de genética de populações são realmente úteis para produzir conhecimento sobre o movimento de fitopatógenos numa escala mundial. Estes estudos permitiram identificar populações fonte e separar a migração devido a atividades humanas (principalmente transporte de plantas infectadas) ou por dispersão natural de esporos de fungos fitopatogênicos (MONTARRY et al., 2010). Diversos estudos deste tipo já foram realizados para patógenos como: *Rhynchosporium secalis* (Oudem.) Davis (LINDE et al. 2009; ZAFFARANO et al., 2009), *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schröt. (STUKENBROCK; MCDONALD, 2008), *Ustilago maydis* (DC.) Corda (MUNKACSI et al., 2008), *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter (GLADIEUX et al.,

2008), *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (KOHLI et al., 1995), e *Puccinia striiformis* Westend. (HOVMØLLER et al., 2008).

Em agroecossistemas, as plantas normalmente são cultivadas em extensos grupos geneticamente uniformes, os quais ampliam a disponibilidade de recursos do hospedeiro para certas raças do patógeno, proporcionando o aumento do tamanho da sua população (BARRET et al., 2008). Grandes populações de patógenos, além de serem menos endógamas que populações menores, aumentam a diversidade genética pelo acúmulo de mutações. Como resultado, o patógeno é capaz de responder mais rapidamente a implantação de medidas de controle, como a introdução de novos fungicidas ou genes de resistência (STUKENBROCK; MCDONALD, 2008).

A seleção é o principal mecanismo responsável pela mudança na frequência de alelos mutantes. A seleção direcional ocorre quando um gene de resistência (codificado por um receptor) se torna amplamente distribuído em uma vasta área geográfica, levando a um aumento na frequência dos mutantes virulentos que perderam o elicitor (alelo de avirulência) até que o gene de resistência seja suplantado (MCDONALD; LINDE, 2002). Os hospedeiros e patógenos estão envolvidos em uma “corrida armamentista”, onde os hospedeiros evoluem para escapar da infecção do patógeno e os patógenos evoluem para escapar das defesas do hospedeiro. Atualmente, há duas hipóteses utilizadas para descrever as interações entre plantas e patógenos. A hipótese “*trench-warfare*” propõe que ciclos epidêmicos da doença mantêm formas estáveis de alelos de resistência e suscetibilidade por longos períodos de tempo, isto é, a seleção balanceadora mantém o polimorfismo estável e duradouro no loco envolvido no reconhecimento hospedeiro-patógeno. Alternativamente, a hipótese “*arms-race*” propõe que ambos, hospedeiro e patógeno, desenvolvem continuamente novos alelos de resistência e virulência, com rápida e

sucessiva fixação destes alelos, resultando em uma co-evolução competitiva de hospedeiro e patógeno (AGUILETA et al, 2009; ERSOZ et al., 2010).

Em ambientes espacialmente heterogêneos, a evolução pode levar a adaptação de populações às condições locais. Essa adaptação local ocorre quando a média de adaptação de uma população é mais alta em seu próprio hábitat do que em outros habitats. A distribuição espacial dos fenótipos do patógeno e do hospedeiro tem proporcionado informações valiosas sobre adaptação local ou adaptação inadequada, e por meio disso sobre os processos evolutivos (AGUILETA et al., 2009; GANDON; MICHALAKIS, 2002).

Exemplos de adaptação local foram demonstrados para fitopatógenos como *Colletotrichum lindemuthianum* em *Phaseolus vulgaris* (SICARD et al., 2007); *Melampsora lini* em *Linum marginale* (THRALL et al., 2002); *Podosphaera plantaginis* em *Plantago lanceolata* (LAINE, 2005), *Mycosphaerella graminicola* em trigo (ZHAN et al., 2002) e *Phytophthora infestans* em populações de batata na França e Marrocos (ANDRIVON et al ., 2007). Porém, em fitopatologia, estudos com diferentes patógenos têm promovido um melhor entendimento da epidemiologia de interações específicas e a capacidade de patógenos de evoluir. No entanto, dada à enorme gama de estilos de vida, formas de crescimento, organização celular, e padrões citológicos nenhuma espécie de fungo serve de modelo para as demais (BURDON; SILK, 1997).

A escolha do marcador genético pode ter um impacto substancial na análise e interpretação dos dados. No caso de fungos que se reproduzem principalmente assexuadamente, ou seja, com uma estrutura composta de linhagens clonais, pode ser usado um marcador neutro, como os de *fingerprint* de DNA (MCDONALD, 1997).

Até metade da década de 1980, os marcadores disponíveis para estudos de populações eram de natureza morfológica ou patológica, ou eram aloenzimas. Para

fitopatógenos, por exemplo, era comum se fazer inferências com base na variabilidade de virulência observada dentro e entre populações. Atualmente, diversas técnicas estão disponíveis para se detectar variação na sequência de DNA em qualquer organismo. Os métodos moleculares são mais vantajosos por serem aplicados a qualquer organismo do quais amostras de DNA de qualidade possam ser extraídas (BROWN, 1996; MCDONALD; MCDERMOTT, 1993).

Estudos de variação genética de fitopatógenos utilizando marcadores neutros, que não estão sob seleção, têm se tornado bastante comum. Com esses estudos, é possível entender os processos evolutivos que atuam nas populações. Por exemplo, a extensão e os padrões de diversidade genotípica dentro das populações podem ser usados para inferir se estas são clonais ou recombinantes (MILGROOM; PEEVER, 2003). O marcador ISSR (*inter-simple sequence repeat*) ou RAMS (*random amplified microsatellites*) foi descrito por Zietkiewicz et al. (1994) para analisar diversidade genética em plantas e animais. Hantula et al. (1996) utilizou esta técnica para detectar polimorfismos de DNA a nível inter e intra-específico em fungos, comprovando a utilidade da técnica para este grupo de organismos. Esta técnica combina a simplicidade do RAPD, a confiabilidade das bandas de domínios do genoma conhecidos e transmissíveis, e o potencial para diferenciar populações ou espécies divergentes recentemente (ZHOU et al. 2001).

No método ISSR, o DNA, entre as extremidades distais de dois microsatélites localizados próximo, é amplificado em múltiplos locos por todo o genoma, por meio de iniciadores de oligonucleotídeos (*primers*) contendo sequências de microsatélites, com ou sem ancoras degeneradas na extremidade 5'. Este método produz padrões de bandas entre diferentes indivíduos, onde cada banda amplificada corresponde a uma sequência de DNA única delimitada por dois microsatélites invertidos (ALANIZ et al., 2009).

Diversos autores já utilizaram esta técnica para descrever a diversidade genética em algumas espécies de oomicetos e fungos, como: *Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn) J. Schröt. (HANTULA et al., 1997), *P. capsici* Leonian (TRUONG et al., 2010), *P. citrophthora* (R.E. Sm. & E.H. Sm.) Leonian (COHEN et al., 2003), *Alternaria solani* Sorauer (VAN DER WAALS et al., 2004), *Claviceps* spp. (TOOLEY et al., 2000), *Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei (Qi et al., 2009), *Botryosphaeria* spp. (ZHOU et al., 2001), *Cylindrocarpon* spp. (ALANIZ et al., 2009), *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris (MAHUKU et al., 2002), *Fusarium graminearum* Schwabe (MISHRA et al., 2004), *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn (ELBAKALI et al., 2003), *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara (MAHUKU; RIASCOS, 2004), *Gremmeniella* spp. e *Phomopsis* spp. (BØRJA et al., 2006).

Em estudos de genética de populações, os microssatélites estão entre os marcadores mais utilizados, devido a sua especificidade e alto polimorfismo. No entanto, como o desenho dos iniciadores específicos para esta técnica requer o conhecimento da sequência genômica, estes marcadores acabam sendo, muitas vezes, limitados a espécies economicamente importantes. O marcador ISSR é rápido e fácil de manejar, não requer o conhecimento de sequências e possui a reprodutibilidade dos marcadores microssatélites, tornando este uma opção para estudos de variabilidade de organismos para os quais ainda não há microssatélites caracterizados.

O gênero *Cochliobolus*

O gênero *Cochliobolus* Drechsler pertence à família Pleosporaceae, ordem Pleosporales, classe Dothideomycetes (ZHANG et al., 2009). As espécies são caracterizadas por ascoma peritecial, unilocular, com corpo globoso e “pescoço” ostiolar longo e cilíndrico ou curto, marrom escuro a preto, com pouco ou nenhum

desenvolvimento estromático. As ascas são cilíndricas a clavadas, bitunicadas, geralmente com oito ascósporos, que são filiformes, multiseptados e arrançados em espiral nas ascas. Ambos anamorfos *Bipolaris* e *Curvularia* possuem teleomorfos *Cochliobolus*. Estes dois gêneros apresentam características morfológicas semelhantes, separados apenas com base na morfologia dos conídios: tamanho, número de septos, curvatura e presença ou ausência de uma célula desproporcionalmente aumentada (SIVANESAN, 1987).

Mais de 30 espécies pertencem ao gênero *Cochliobolus*, das quais algumas são saprófitas, e outras são patogênicas, geralmente em monocotiledôneas, principalmente gramíneas. São encontrados parasitando importantes culturas, como milho (*Zea mays* L.), arroz (*Oryza sativa* L.), cevada (*Hordeum vulgare* L.), cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), trigo (*Triticum* spp.) e aveia (*Avena sativa* L.). Análises filogenéticas revelaram que as espécies de *Cochliobolus* são divididos em dois grupos distintos. O grupo 2 contém 18 espécies, nenhuma das quais são importantes fitopatógenos. Por outro lado, todos os membros do gênero que são conhecidos por causar graves doenças em plantas cultivadas (*C. heterostrophus* (Drechsler) Drechsler, *C. carbonum* R.R. Nelson, *C. victoriae* R.R. Nelson, *C. sativus* (S. Ito & Kurib.) Drechsler ex Dastur e *C. miyabeanus* (S. Ito & Kurib.) Drechsler ex Dastur) estão entre as 13 espécies do grupo 1. Os baixos níveis de substituição nas seqüências de nucleotídeos na região ITS e no gene *gpd* entre os membros do grupo 1 indicam que o grupo de espécies altamente virulento sofreu súbita radiação. Esta observação sugere que um progenitor dentro do gênero *Cochliobolus* deu origem, ao longo de um período relativamente curto, a uma série de biótipos distintos, cada um com capacidade patogênica única para um determinado tipo de planta. Esta radiação parece estar associada com a aquisição da capacidade de produzir toxinas hospedeiro-específicas, exigidas tanto para a patogênese como para a determinação da gama de hospedeiros. (BEERBE et al., 1999; LU et al., 2003)

Análises filogenéticas em fungos

Tradicionalmente, a taxonomia de ascomicetos e líquen objetiva a distinguir e circunscrever os grupos de organismos. A maioria dos sistemas propostos se baseou em caracteres únicos, como ascoma, ou tipo de ascos, resultando em grupos taxonômicos artificiais. As classificações morfológicas são interrompidas pela ausência de corpos de frutificação num amplo grupo de fungos mitospóricos, colocados na classe Deuteromycetes. Embora muitos pertençam aos ascomicetos, sem evidências moleculares estes fungos não poderão ser colocados em seus contextos evolutivos (LUMBSCH, 2000).

Nos últimos anos, a sistemática molecular está revolucionando a visão da evolução dos fungos. Hibbett et al. (2007) propuseram a classificação filogenética detalhada do reino Fungi, baseada em análises filogenética moleculares recentes. Novas propostas surgem, como as de Schüßler et al. (2001) para reconhecer o filo Glomeromycota e a de Keeling et al. (2000) para incluir Microsporidia no reino Fungi.

Atualmente, os dados moleculares são utilizados na classificação de fungos, com base nas relações evolutivas, em diferentes níveis taxonômicos, desde classes, ordens e famílias, até na delimitação de espécies, populações e, dependendo da ferramenta, na diferenciação de indivíduos. Classes tradicionais, como os Pyrenomycetes, Plectomycetes e Archiascomycetes já foram confirmados por estudos baseados em dados moleculares (BERBEE; TAYLOR, 1992; BERBEE et al., 2000; GARGAS; TAYLOR, 1995; LUMBSCH, 2000). Em outras, como Discomycetes e Loculomycetes, não está claro se os caracteres moleculares são insuficientes ou se estes grupos não representam um conjunto natural de organismos (BERBEE, 1996; GARGAS; TAYLOR, 1995;).

Alguns estudos moleculares demonstraram que os caracteres morfológicos podem ser geralmente insuficientes para inferir a história evolutiva do filo, devido ao fato de

similaridades morfológicas ocasionadas por convergência (BERBEE; TAYLOR, 1993). Berbee (1996) demonstraram que ascas bitunicadas ocorrem em clados independentes, enquanto Wedin e Tibell (1997) e Wedin et al. (1998) demonstraram homoplasia de ascas prototunicadas.

Até o momento, os genes usados para construir a filogenia são escolhidos com base em critérios práticos e históricos, ou seja, as filogenias são feitas usando os mesmo genes de estudos anteriores ou genes que estão disponíveis para um conjunto de espécies. Muitas vezes, estes genes têm histórias de duplicação ou transferência horizontal que podem resultar em árvores de gene/espécies discrepantes. O comprimento da inferência das árvores de espécies aumenta quando múltiplos loci independentes convergem em uma única resposta (AGUILETA et al., 2008).

Os loci comumente utilizados em filogenia molecular de fungos são o rDNA ribossomal nuclear e mitocondrial (18S, 28S, ITS, IGS, mtSSU, mtLSU), bem como genes codificadores de proteínas, como RNA polimerases (*RPB1* e *RPB2*), β -tubulina, actina- γ , ATP-sintase (*ATP6*), e fator de alongação EF-1 α (*TEF1 α*). Alguns genes de cópia única codificadores de proteínas, como *RPB1* e *RPB2*, são promissores para gerarem filogenias bem suportadas (SCHMITT et al., 2009).

No entanto, devido alguns genes possuírem maior poder de inferência filogenética do que outros, a escolha de alguns genes com alta informatividade filogenética pode permitir a construção de filogenias robustas e minimizar a quantidade de dados necessários a serem seqüenciados, como os lócus MS277 e MS456. Filogenias feitas com estes dois lócus tinham a mesma topologia, poder de resolução e suporte de ramo de filogenias baseadas em uma análise concatenada de todos os 135 genes ortólogos de um único exemplar identificado a partir de genomas de fungos (AGUILETA et al., 2008).

As relações filogenéticas derivadas de análises multigenes têm permitido aos micologistas rever os sistemas de classificação, para coincidir com as relações filogenéticas moleculares (CROUS et al., 2009). Além disso, a correta classificação filogenética dos fungos pode permitir a aplicação de informações prévias de organismos modelo ou táxons relacionados (TAYLOR, 1995).

Os objetivos do presente estudo foram determinar a estrutura de populações de *C. eragrostidis* de inhame em regiões do nordeste do Brasil, utilizando marcadores moleculares como o ISSR (*inter-simple sequence repeat*) e sequências de DNA das regiões ITS e dos genes que codificam para β -tubulina e gliceraldeído-3-fostato desidrogenase (*gpd*), e avaliar as relações filogenéticas de *C. eragrostidis* e das espécies do gênero *Cochliobolus*, através da análise de sequências de fungos da família Pleosporaceae, usando métodos de reconstrução filogenética baseados em algoritmos de máxima verossimilhança e Bayesianos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRIVON, D.; PILET, F.; MONTARRY, J., HAFIDI, M., CORBIÈRE, R., ACHBANI, E. H., PELLÉ, R.; ELLISSÈCHE, D. Adaptation of *Phytophthora infestans* to partial resistance in potato: Evidence from French and Moroccan populations. **Phytopathology**, St. Paul, v. 97, p. 338-343, 2007.

AGUILETA, G.; MARTEY, S.; CHIAPELLO, H.; LEBRUN, M. H.; RODOLPHE, F.; FOURNIER, E.; GENDRAULT-JACQUEMARD, A.; GIRAUD, T. Assessing the performance of single-copy genes for recovering robust phylogenies. **Systematic Biology**, v. 57, p. 613-627, 2008.

AGUILETA, G.; REFRÉGIER, G.; YOCKTENG, R.; FOURNIER, E.; GIRAUD, T. Rapidly evolving genes in pathogens: Methods for detecting positive selection and examples among fungi, bacteria, viruses and protists. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 9, n. 4, p. 656–670, 2009.

AIGHEWI, B. A.; ASIEDU, R.; AKORODA M. O. Seed yam production from pre-sprouted minisetts with varied thicknesses of storage parenchyma. **African Journal of Root and Tuber Crops**, v. 5, n. 2, p. 21–24, 2003.

ALANIZ, S.; ARMENGOL, J.; LEÓN, M.; GARCIA-JIMÉNEZ, J.; ABAD-CAMPOS, P. Analysis of genetic and virulence diversity of *Cylindrocarpon liriodendri* and *C. macrodidymum* associated with black foot disease of grapevine. **Mycological Research**, Cambridge, v. 113, n. 1, p. 16-23, 2009.

ASIEDU, R.; SARTIE, A. Crops that feed the World 1. Yams: Yams for income and food security. **Food Security**, v. 2, n. 4, p. 305-315, 2010.

BARRETT, L. G.; THRALL, P. H.; BURDON, J. J.; LINDE, C. C. Life history determines genetic structure and evolutionary potential of host–parasite interactions. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 23, n. 12, p. 678-685, 2008.

BERBEE, M. L. Loculoascomycete origins and evolution of filamentous ascomycete morphology based on 18S rRNA gene sequence data. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 13, p. 462-470, 1996.

BERBEE, M. L., TAYLOR, J. W. Dating the evolutionary radiations of true fungi. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 71, p. 1114-1127, 1993.

BERBEE, M. L.; TAYLOR, J. W. Two ascomycete classes based on fruiting body characters and ribosomal DNA sequences. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 9, p. 278–284, 1992

BERBEE, M. L.; PIRSEYEDI, M.; HUBBARD, S. *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. **Mycologia**, New York, v. 91, p. 964-977, 1999.

BERBEE M. L.; CARMEAN D. A.; WINKA K. Ribosomal DNA and resolution of branching order among the ascomycota: how many nucleotides are enough? **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 17, p. 337-344, 2000.

BØRJA, I.; SOLHEIM, H.; HIETALA, A. M.; FOSDAL, C. G. Etiology and realtime polymerase chain reaction-based detection of Gremmeniella- and Phomopsis-associated disease in Norway spruce seedling. **Phytopathology**, St. Paul, v. 96, p. 1305-1314, 2006.

BROWN, J. K. M. The choice of molecular marker methods for population genetic studies of plant pathogens. **New Phytologist**, Cambridge, v. 133, p. 183-195, 1996.

BURDON, J. J.; SILK, J. Sources and patterns of diversity in plant-pathogenic fungi. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n. 6, p. 665-669, 1997.

COHEN, S.; ALLASIA, V.; VENARD, P.; NOTTER, S.; VERNIÈRE, C. H.; PANABIÈRES, F. Intraspecific variation in *Phytophthora citrophthora* from citrus trees in eastern Corsica. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, n. 8, p. 791-805, 2003.

CROUS, P. W.; SUMMERELL, B. A.; CARNEGIE, A. J.; WINGFIELD, M. J.; HUNTER, G. C.; BURGESS, T. I.; ANDJIC, V.; BARBER, P. A.; GROENEWALD, J. Z. Unravelling *Mycosphaerella*: do you believe in genera? **Persoonia**, Leiden, v. 23, p. 99-118, 2009.

DELMOTTE, F.; GIRESE, X.; RICHARD-CERVERA, S.; M'BAYA, J.; VEAR, F.; TOURVIEILLE, J.; WALSER, P.; DE LABROUHE, D. T. Single nucleotide polymorphisms reveal multiple introductions into France of *Plasmopara halstedii*, the plant pathogen causing sunflower downy mildew. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 8, p. 534-540, 2008.

ELBAKALI, A. M.; LILJA, A.; HANTULA J.; MARTIN, M. Identification of Spanish isolates of *Rhizoctonia solani* from potato by anastomosis grouping, ITS-RFLP and RAMS-fingerprinting. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 42, n. 2, p. 167-176, 2003.

ERSOZ, E. S.; WRIGHT, M. H.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S. C.; LANGLEY, C. H.; NEALE, D. B. Evolution of disease response genes in loblolly pine: insights from candidate genes. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e14234, 2010.

FAO. FAOSTAT. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/default.aspx>>. Acesso em: 16 jan. 2011.

GANDON, S.; MICHALAKIS, Y. Local adaptation, evolutionary potential and host-parasite coevolution: interactions between migration, mutation, population size and generation time. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v. 15, p. 451-462, 2002.

GARGAS, A.; TAYLOR, J. W. Phylogeny of Discomycetes and early radiations of the apothecial Ascomycotina inferred from SSU rDNA sequence data. **Experimental Mycology**, Orlando, v. 19, p. 7-15, 1995.

GLADIEUX, P.; ZHANG, X. G.; AFOUFA-BESTIEN, D.; VALDEBENITO SANHUEZA, R. M.; SBAGHI, M.; LE CAM, B. On the origin and spread of the scab disease of apple: out of Central Asia. **PLoS One**, v. 3, n. 1, p. e1455, 2008.

GOODWIN, S. B.; COHEN, B. A.; FRY, W. E. Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the of the United States of America**, Washington, v. 91, p. 11591-11595, 1994.

HANTULA, J.; DUSABENYAGASANI, M.; HAMELIN, R. C. Random amplified microsatellites (RAMS) – a novel method for characterizing genetic variation within fungi. **European Journal of Forest Pathology**, Hamburg, v. 26, n. 3, p. 159-166, 1996.

HANTULA, J.; LILJA, A.; PARIKKA, P. Genetic variation and host specificity of *Phytophthora cactorum* isolated in Europe. **Mycological Research**, Cambridge, v. 101, n. 5, p. 565-572, 1997.

HIBBETT, D. S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v. 111, p. 509-547 . 2007.

HOVMØLLER, M. S.; YAHYAOUI, A. H.; MILUS, E. A. JUSTESEN, A. F. Rapid global spread of two aggressive strains of a wheat rust fungus. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 17, n. 17, p. 3818-3826, 2008.

IBGE. Censo Agropecuário 2006. Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2006. 777p.

KEELING, P. J.; LUKER, M. A; PALMER, J. D. Evidence from beta-tubulin phylogeny that microsporidia evolved from within the fungi. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 17, p. 23-31, 2000.

KOHLI, Y.; BRUNNER, L. J.; YOELL, H.; MILGROOM, M. G.; ANDERSON, J. B.; MORRALL, R. A. A.; KOHN, L. M. Clonal dispersal and spatial mixing in populations of the plant pathogenic fungus, *Sclerotinia scerotiorum*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 69-77, 1995.

LAINE, A.J. Spatial scale of local adaptation in a plant–pathogen metapopulation. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v. 18, p. 930–938, 2005.

LINDE, C. C.; ZALA, M.; MCDONALD, B. A. Molecular evidence for recent founder populations and human mediated migration in the barley scald pathogen *Rhynchosporium secalis*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 51, n. 3, p. 454-464, 2009.

LU, S. W.; KROKEN, S.; LEE, B. N.; ROBBERTSE, B.; CHURCHILL, A. C.; YODER, O. C.; TURGEON, B. G. A novel class of gene controlling virulence in plant pathogenic ascomycete fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, p. 5980-5985, 2003.

LUMBSCH, H. T. Phylogeny of filamentous ascomycetes. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 87, p. 335-342, 2000.

MAHUKU, G. S.; HENRÍQUEZ, M. A.; MUNÓZ, J.; BURUCHARA, R. A. Molecular markers dispute the existence of the Afro-Andean group of the bean angular leaf spot pathogens, *Phaeoisariopsis griseola*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 6, p. 580-589, 2002.

MAHUKU, G. S.; RIASCOS, J. J. Virulence and molecular diversity within *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Andean and Mesoamerican bean varieties and regions. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, n. 3, p. 253–263, 2004.

MCDONALD, B. A. The Population Genetics of Fungi: Tools and Techniques. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n. 4, p. 448-453, 1997.

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 349-379, 2002.

MCDONALD, B. A.; MCDERMOTT, J. M. The population genetics of plant pathogenic fungi. **BioScience**, London, v. 43, p. 311-319, 1993

MENEZES, M. Considerações Epidemiológicas de Doenças Fúngicas da Cultura do Inhame. In: II Simpósio Nacional sobre as Culturas do Inhame e do Taro. **Anais eletrônicos**. João Pessoa, PB, EMEPA-PB, 2002. Disponível em: <http://www.emepa.org.br/anais/an_sincit2_v1.php>. Acesso em: 25 maio de 2007.

MENEZES, M; OLIVEIRA, S. M. A. de. **Fungos fitopatogênicos**. Recife, UFRPE, Imprensa Universitária, 1993. 277p.

MICHEREFF, S. J.; MAFFIA, L. A.; NORONHA, M. A, PEDROSA, R. A. Progresso e arranjo Espacial da Queima das Folhas do Inhame, causada por *Curvularia eragrostidis*, na Zona da Mata de Pernambuco. **Agrotropica**, Ilhéus, v. 12, p. 87-94, 2000.

MILGROOM, M. G.; PEEVER, T. L. Population biology of plant pathogens: the synthesis of plant disease epidemiology and population genetics. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, n. 6, p. 608-617, 2003.

MILGROOM, M. G.; WANG, K.; ZHOU, Y.; LIPARI, S. E.; KANEKO, S. Intercontinental population structure of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. **Mycologia**, New York, v. 88, p. 179-190, 1996.

MISHRA, P. K.; TEWAR, J. P.; CLEAR, R. M.; TURKINGTON, K. T. Molecular genetic variation and geographical structuring in *Fusarium graminearum*. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 145, n. 3, p. 299-307, 2004.

MONTARRY, J.; ANDRIVON, D.; GLAIS, I.; CORBIERE, R.; MIALDEA, G.; DELMOTTE, F. Microsatellite markers reveal two admixed genetic groups and an ongoing displacement within the French population of the invasive plant pathogen *Phytophthora infestans*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 19, n. 9, p. 1965–1977, 2010.

MOURA, R. M. Doenças do inhame-da-costa (*Dioscorea cayennensis*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.

Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 415-419.

MUNKACSI, A. B.; STOXEN, S.; MAY, G. *Ustilago maydis* populations tracked maize through domestication and cultivation in the Americas. **Proceedings of the Royal Society B - Biological Sciences**, Londres, v. 275, p. 1037-1046, 2008.

PAULA, H.; MICHEREFF, S. J.; OLIVEIRA, V. S.; OLIVEIRA, S. M. A.; LARANJEIRA, D. Variabilidade de Alisiamientos de *Curvulaia eragrostidis* que Causan Atizonamiento de lãs Hojas de Ñame (*Dioscorea cayennensis*) em Pernambuco, Brasil. **Boletín Micológico**, Valparaiso, Chile, v. 15, p. 85-92, 2000.

QI Y, XIE Y, ZHANG X, PU J, ZHANG H, HUANG S, ZHANG H. Molecular and pathogenic variation identified among isolates of *Corynespora cassicola*. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 41, n. 2, p. 145-151, 2009.

RASHID, M. M. Detection of *Curvularia* species on boro rice seeds of Dinajpur. **Online Journal of Biological Sciences**, Pakistan, v. 1, n. 7, p. 591-592, 2001.

RITZINGER, C.H.S., SANTOS FILHO, H.P., ABREU, K.C.L.M., FANCELLI, M.; RITZINGER, R. **Aspetos fitossanitários da cultura do inhame**. Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, 2003 (Documentos).

SANTOS, E. S. **Inhame (*Dioscorea* spp.): aspectos básicos da cultura**. João Pessoa: EMEPA-PB, SEBRAE, 1 ed., 1996, 158p.

SANTOS, E. S. Manejo sustentável da cultura do inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste do Brasil. 2002. In: II Simpósio Nacional sobre as Culturas do Inhame e do Taro. **Anais eletrônicos**. João Pessoa, PB, EMEPA-PB, 2002. Disponível em: <http://www.emepa.org.br/anais/an_sincit2_v1.php>. Acesso em: 25 maio de 2007.

SANTOS, E. S.; MACÊDO, L. S. Tendências e perspectivas da cultura do inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste do Brasil. 2002. In: II Simpósio Nacional sobre as Culturas do

Inhame e do Taro. **Anais eletrônicos**. João Pessoa, PB, EMEPA-PB, 2002. Disponível em: <http://www.emepa.org.br/anais/an_sincit2_v1.php>. Acesso em: 25 maio de 2007.

SANTOS, E. S. dos; MACÊDO, L. de S.; MATIAS, E. C.; MELO, A. S. de. **Contribuição tecnológica para a cultura do inhame no Estado da Paraíba**. João pessoa, PB: EMEPAPB/MMA-PRONAF, 1998. 84p. (EMEPA-PB. Documentos, 23)

SCHMITT, I.; CRESPO, A.; DIVAKAR, P. K.; FANKHAUSER, J. D.; HERMAN-SACKETT, E.; KALB, K.; NELSEN, M. P.; NELSON, N. A.; RIVAS-PLATA, E.; SHIMP, A.D.; WIDHELM, T.; LUMBSCH, H.T. New primers for promising single-copy genes in fungal phylogenetics and systematics. **Persoonia**, Leiden, v. 23, p. 35-40, 2009.

SCHÜBLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, p. 1413-1421, 2001.

SICARD, D.; PENNING, P.S.; GRANDCLEMENT, C.; ACOSTA, J.; KALTZ, O.; SHYKOFF, J.A. Specialization and local adaptation of a fungal parasite on two host plant species as revealed by two fitness traits. **Evolution**, Lancaster, v. 61, p. 27-41, 2007.

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

SIVANESAN, A. **Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs**. Wallingford, UK: CAB International Mycological Institute, 1987. 261 p.

STUKENBROCK, E. H.; MCDONALD, B. A. The Origins of Plant Pathogens in Agro-Ecosystems. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 46, p. 75-100, 2008.

TAYLOR, J. W. Molecular phylogenetic classification of fungi. **Archives of Medical Research**, Mexico, v. 26, p. 307-314, 1995.

TAYLOR, J. W.; JACOBSON, D. J.; FISHER, M. C. The Evolution Of Asexual Fungi: Reproduction, Speciation and Classification. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 197-246, 1999.

TOOLEY, P. W.; O'NEILL, N. R.; GOLEY, E. D.; CARRAS, M. M. Assessment of diversity in *Claviceps africana* and other *Claviceps* by RAM and AFLP analysis. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, n. 10, p. 1126-1130, 2000.

THRALL, P. H.; BURDON, J. J.; BEVER, J. D. Local adaptation in the *Linum marginale-Melampsora lini* host-pathogen interaction. **Evolution**, Lancaster, v. 56, p. 1340-1351, 2002.

TRUONG, N. V.; LIEW, E. C.; BURGESS, L. W. Characterisation of *Phytophthora capsici* isolates from black pepper in Vietnam. **Fungal biology**, Oxford, v. 114, n. 2-3, p. 160-70, 2010.

VAN DER WAALS, J. E.; KORSTEN, L.; SLIPPERS, B. Genetic diversity among *Alternaria solani* isolates from potatoes in South Africa. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, p. 959-964, 2004.

WEDIN, M.; TIBELL, L. Phylogeny and evolution of Caliciaceae, Mycocaliciaceae, and Sphinctrinaceae (Ascomycota), with notes on the evolution of the prototunicate ascus. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 75, p. 1236-1242, 1997.

WEDIN, M.; TEHLER, A.; GARGAS, A. Phylogenetic relationships of Sphaerophoraceae (ascomycetes) inferred from SSU rDNA sequences. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 209, p. 75-83, 1998.

ZAFFARANO, P. L.; MCDONALD, B. A.; LINDE, C. C. Phylogeographical analyses reveal global migration patterns of the barley scald pathogen *Rhynchosporium secalis*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 18, n. 2, p. 279-293, 2009.

ZIEKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - Anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, San Diego, v. 20, n. 2, p. 176-183, 1994.

ZHAN, J., MUNDT, C.C., HOFFER, M.E. AND MCDONALD, B.A. Local adaptation and effect of host genotype on the rate of pathogen evolution: an experimental test in a plant pathosystem. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v. 15, p. 634-647, 2002.

ZHANG, Y.; SCHOCH, C. L.; FOURNIER, J.; CROUS, P. W.; GRUYTER, J. DE; WOUDEBERG, J. H. C.; HIRAYAMA, K.; TANAKA, K.; POINTING, S. B.; SPATAFORA, J. W.; HYDE, K. D. Multi-locus phylogeny of Pleosporales: a taxonomic, ecological and evolutionary re-evaluation. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 64, p. 85-102, 2009.

ZHOU, S.; SMITH, D. R.; STANOSZ, G. R. Differentiation of *Botryosphaeria* species and related anamorphic fungi using inter simple or short sequence repeat (ISSR) fingerprinting. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, n. 8, p. 919-926, 2001.

Capítulo II

ESTRUTURA GENÉTICA DA POPULAÇÃO DE *Curvularia eragrostidis* (Henn.) J.A. Mey., AGENTE ETIOLÓGICO DA QUEIMA DAS FOLHAS DO INHAME

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17

ESTRUTURA GENÉTICA DA POPULAÇÃO DE *Curvularia eragrostidis* (Henn.)

J.A. Mey., AGENTE ETIOLÓGICO DA QUEIMA DAS FOLHAS DO INHAME

I. F. de França¹, B. T. da Hora-Júnior², E. S. G. Mizubuti², M.P.S. Câmara¹, G. S. A. Lima^{3*}

¹Departamento de Agronomia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil, 52171-900.

²Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 36570-000.

³Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, Alagoas, Brasil, 57100-000.

*Autor para correspondência: Gaus S. A. Lima

Email: gausandrade@yahoo.com.br

18 **Resumo**

19 A queima das folhas ou pinta preta, causada pelo fungo *Curvularia eragrostidis*, é
20 responsável por grandes prejuízos à cultura do inhame, no Nordeste brasileiro. O
21 conhecimento da diversidade da população deste patógeno pode fornecer importantes
22 informações sobre o potencial evolutivo do fungo e as melhores estratégias de manejo da
23 doença. O objetivo deste estudo foi determinar a diversidade da população de isolados de
24 *C. eragrostidis* de inhame de regiões no nordeste do Brasil, utilizando sequências de DNA
25 (ITS, *gpd* e β -*tubulina*) e marcadores ISSR. A partir de folhas de inhame, foram obtidos
26 151 isolados procedentes dos estados de Alagoas (Zona da Mata), Pernambuco (Zona da
27 Mata e Agreste) e Paraíba (Zona da Mata). Não houve variação nas sequências de DNA e
28 com base nos dados de ISSR se observou que a população do patógeno apresenta baixa
29 diversidade genotípica, predominância de um ou dois genótipos uniformemente
30 distribuídos e alto grau de similaridade genética entre os grupos de isolados. O
31 desequilíbrio de ligação na população indica predominância de reprodução assexual,
32 enquanto a falta de estruturação entre as subpopulações a presença de fluxo genotípico.

33 **Palavras-chave:** diversidade genética, *Dioscorea cayenensis*.

34

35 **Introdução**

36

37 O inhame (*Dioscorea* spp.) compreende um conjunto de espécies herbáceas bem
38 adaptadas às condições edafoclimáticas das regiões tropicais e subtropicais,
39 desenvolvendo-se satisfatoriamente nos ecossistemas brasileiros. A cultura apresenta
40 grande importância socioeconômica para a região Nordeste do Brasil, sobretudo para os
41 Estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia e Maranhão, por constituir um negócio

42 agrícola promissor, pela excelente qualidade nutritiva e energética de suas túberas e a
43 grande utilidade para a alimentação humana (Santos, 2002).

44 A queima das folhas, causada por *Curvularia eragrostidis*, é uma das doenças
45 fúngicas mais prejudiciais à cultura do inhame na região Nordeste do Brasil. Esta pode
46 provocar grandes perdas em plantios irrigados, quando incide sobre plantas jovens. Nessas
47 condições, a severidade da doença é alta e pode haver desfolhamento da planta e, por
48 conseguinte, a redução no peso das túberas comerciais, em torno de 40% (Santos, 1996;
49 Michereff et al.,1999; Moura, 2005).

50 A estrutura genética de populações refere-se à quantidade e distribuição da variação
51 genética dentro e entre populações, sendo uma consequência da interação de mecanismos
52 evolutivos, como mutação, sistemas de reprodução, fluxo gênico ou migração, tamanho da
53 população e seleção, os quais contribuem para a mudança genética (isto é, evolução)
54 dentro de populações. Em fitopatologia, o foco é determinar os fatores que mais
55 contribuem para evolução de patógenos e como estes mecanismos evolutivos interagem
56 para determinar a composição genética e potencial de adaptação do organismo às
57 condições adversas e dessa forma, entender como as populações de patógenos irão evoluir
58 em resposta a diferentes estratégias de controle (McDonald, 1997; McDonald & Linde,
59 2002).

60 Paula et al. (2000) avaliaram a variabilidade de 42 isolados de *C. eragrostidis*,
61 provenientes do Estado de Pernambuco, quanto às diferenças na velocidade de
62 desenvolvimento dos sintomas em plantas de inhame inoculadas; ao desenvolvimento da
63 doença depois do aparecimento dos primeiros sintomas; características fisiológicas (taxa de
64 crescimento micelial, esporulação e germinação dos conídios) e sensibilidade a iprodione.
65 Foram constatadas diferenças entre os isolados quanto às variáveis estudadas, porém não
66 foi observada correlação significativa entre as variáveis associadas à doença e as diferentes

67 características fisiológicas dos isolados. Contudo, apesar da importância da queima das
68 folhas do inhame, não existem estudos no Brasil sobre a variabilidade genética de *C.*
69 *eragrostidis*.

70 Por essa razão, pretende-se com este trabalho, gerar informações que possibilitem o
71 entendimento da biologia de populações deste patógeno e, por conseguinte, o
72 desenvolvimento futuro de estratégias de manejo eficientes, como o melhoramento de
73 plantas visando à resistência à doença. Os objetivos deste trabalho foram determinar a
74 variação genética e a estrutura de populações de *C. eragrostidis* de inhame em regiões do
75 nordeste do Brasil, utilizando marcadores moleculares como o ISSR (inter-simple
76 sequence repeat) e sequências de DNA das regiões ITS e dos genes que codificam para β -
77 *tubulina* e gliceraldeído-3-fostato desidrogenase (*gpd*).

78

79 **Material e Métodos**

80

81 **Obtenção dos isolados**

82 Foram coletadas folhas com sintomas de queima em 16 áreas de cultivo (Tabela 1)
83 de inhame, *D. cayenensis* Lam., nas principais regiões produtoras dos estados de Alagoas
84 (Zona da Mata), Pernambuco (Zona da Mata e Agreste) e Paraíba (Zona da Mata) (Figura
85 1). No laboratório, as folhas foram incubadas em câmara úmida por 48 h para o posterior
86 isolamento direto em lupa. Nesta etapa, os conídios foram transferidos para placas
87 contendo meio batata dextrose ágar (BDA), as quais foram mantidas a temperatura
88 ambiente. Também foi realizado isolamento indireto, a partir de fragmentos da região de
89 transição de tecido foliar sadio e lesionado, os quais foram imersos em solução de álcool
90 70% durante 30 segundos e em seguida em hipoclorito de sódio a 1,5% por um minuto
91 para a desinfestação. Os fragmentos foram lavados por duas vezes consecutivas em água

92 destilada esterilizada (ADE), secos em papel filtro esterilizado e transferidos para BDA em
93 placas de Petri mantidas a temperatura ambiente.

94 Todos os isolados foram incorporados na Coleção de Cultura de Fungos
95 Fitopatogênicos “Prof.^a Maria Menezes” (CMM) da Universidade Federal de Pernambuco.

96

97 **Extração de DNA dos isolados**

98 Discos de micélio cultivados em BDA foram transferidos para Erlenmeyers
99 contendo 30 mL do meio líquido sacarose-extrato de levedura-asparagina (Alfenas et al.,
100 1991). Após oito dias, o micélio foi retirado e o excesso de meio foi lavado com ADE e o
101 micélio foi então armazenado a -86°C. Para a extração, aproximadamente 200 mg de
102 micélio foram transferidos para almofariz e refrigerados a -86°C por 5 minutos. Em
103 seguida, o micélio foi macerado e o DNA genômico foi então extraído seguindo o
104 protocolo CTAB (*cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide*), segundo Ferreira &
105 Grattapaglia (1998).

106

107 **Caracterização genética dos isolados utilizando iniciadores de oligonucleotídeos ISSR**

108 Foram selecionados os iniciadores CGA₅, GT₅G, GACA₄, ACA₅, AG₇ e ACTG₄,
109 AG₈, CA₈, TCG₅, CCA₅ e GA₈ (Tabela 2), baseados em regiões de repetições presentes em
110 microssatélites. Também foram testadas algumas combinações desses iniciadores. As
111 reações foram realizadas em volume total de 20 µL, contendo 4 µL de tampão 5X Green
112 GoTaq Flexi Buffer, 0,4 µL de dNTPs 10 mM, 1,2 µL de MgCl₂ 25 mM, 1,6 µL de cada
113 oligonucleotídeo 10 µM, 1U da GoTaq Flexi DNA Polimerase (Promega), 1 µL de DNA
114 (~200 ng) e 11,6 µL de água ultrapura. As condições de amplificação foram: um ciclo de
115 desnaturação inicial a 94°C por 5 min; 35 ciclos de amplificação [desnaturação a 95°C por
116 1 min; anelamento a temperaturas variáveis, de acordo com o iniciador (Tabela1) por 1

117 min e extensão a 72°C por 2 min]; extensão final a 72°C por 10 min. Nas combinações de
118 iniciadores foram utilizados 0,8 µL de cada oligonucleotídeo a 10 µM. Após a
119 amplificação, os produtos foram analisados em gel de agarose a 1,5%, em tampão TBE
120 (Tris-Borato, EDTA 0,5M pH 8,0), corados com brometo de etídeo, visualizados sob luz
121 ultravioleta.

122 A presença ou ausência de bandas reproduzíveis foi utilizada para a construção de
123 uma matriz binária. A similaridade genética foi calculada com base no coeficiente de Dice
124 (Dice, 1945), com o programa SimQual. A matriz de similaridade foi utilizada para
125 construir dendrogramas utilizando o algoritmo agrupamento UPGMA (*unweighted pair-*
126 *group method with arithmetic average*, em inglês), nos programas SAHN e TREE. Todas
127 estas análises foram feitas no NTSYS-pc versão 2.1 (Exeter Software, Setauket, NY).

128

129 **Amplificação e sequenciamento da região ITS e dos genes *β-tubulina* e *gpd***

130 As sequências parciais da região ITS, e dos genes *β-tubulina* e *gpd* foram
131 amplificadas via PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores ITS4 e ITS5 (White et
132 al., 1990), Bt1a e Bt1b (Glass & Donaldson, 1995) e *gpd1* e *gpd2* (Berbee et al., 1999),
133 respectivamente (Tabela 2).

134 As reações foram realizadas em volume total de 60 µL, contendo 6 µL de tampão
135 10X (KCl 100 mM; Tris-HCl 100 mM pH 9,0; Triton-X 1%), 4,8 µL de dNTPs 2,5 mM,
136 1,8 µL de MgCl₂ 50 mM, 3 µL de cada oligonucleotídeo 10 µM, 1U da DNA Taq
137 Polimerase, 1 µL de DNA (10 a 100 ng) e 40 µL de água ultrapura. As amplificações
138 foram feitas no termociclador Therm-1000 Maxygene (Axygen, Union City, CA, USA)
139 usando as seguintes condições de ciclagem: um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 5
140 min; 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 30 s; anelamento a 57°C por 1
141 min e 30 s e extensão a 72°C por 1 min); extensão final a 72°C por 5 min para a região ITS

142 e um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 5 min; 35 ciclos de amplificação
143 (desnaturação a 94°C por 30 s; anelamento a 53°C (*β-tubulina*) e 57°C (*gpd*) por 1 min e 30
144 s e extensão a 72°C por 1 min); extensão final a 72°C por 5 min, para o *β-tubulina* e *gpd*.

145 Os produtos foram analisados em gel de agarose a 1,5% (p/v), após eletroforese em
146 tampão TAE (Tris-Ácido Acético, EDTA 0,5M pH 8,0) a 80V por 1 h, corados com
147 brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta.

148 Todos os produtos de PCR provenientes da região ITS ou do gene *β-tubulina* ou
149 *gpd* foram purificados utilizando ilustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit
150 (GE Healthcare). O sequenciamento foi realizado pela Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul)
151 diretamente dos produtos de PCR purificados. As sequências geradas foram editadas e
152 alinhadas com auxílio do programa Bioedit 7.0.9 (Hall, 1999).

153

154 **Diversidade genotípica**

155 A diversidade genotípica foi analisada para cada subpopulação, considerada como
156 cada uma das regiões amostradas, e para a população total. Estimaram-se a riqueza e
157 equitabilidade. A riqueza foi quantificada pelo número de genótipos observados (g_{obs}), e
158 pelo número de genótipos esperados $E(gn)$ em uma amostra de $n = 29$ (menor tamanho de
159 população analisado) utilizando o método de rarefação. Para determinar como os genótipos
160 estão distribuídos nas amostras, foi calculado o índice de equitabilidade $E5 = (G-1)/(N_I-1)$.
161 Adicionalmente, foram calculados os índices de diversidade de Stoddart e Taylor (G),
162 Simpson (λ), Shannon-Wiener (H') e NI de Hill, e os intervalos de confiança a 90% foram
163 construídos com *bootstrap* de 1000 (Grunwald et al., 2003). A fração clonal de cada
164 população [proporção de isolados originados de reprodução assexual em cada população
165 (Zhan et al., 2002)], foi calculada usando: $1 - [(\text{número de genótipos diferentes}) / (\text{número}$
166 $\text{total de amostras})]$ (Stukenbrock et al., 2006).

167

168 **Variação genética entre populações, análise de associação multilocus e rede de**
169 **haplótipos**

170 Para estimar a distribuição da variação genética em diferentes níveis de subdivisão
171 geográfica: entre regiões geográficas (Agreste e Zona da Mata de Pernambuco, Zona da
172 Mata de Alagoas e Zona da Mata da Paraíba), entre os cultivos dentro das regiões, e dentro
173 das populações, foi realizada análise de variação molecular (AMOVA) com o programa
174 Arlequin version 3.1 (Excoffier et al., 2005).

175 A distribuição geográfica e a frequência dos haplótipos foram mostradas em uma
176 rede, seguindo o algoritmo *median-joining*, implementado no programa Network 4.6.0.0
177 (Bandelt et al., 1999).

178 Para avaliar as associações entre os locos, em cada amostra, foram utilizados o
179 índice de associação (IA) e estimativa de desequilíbrio de ligação multilocus (rd), ambos
180 calculados pelo programa Multilocus 1.3, determinados estatisticamente com um conjunto
181 de dados gerados aleatoriamente por 1000 vezes (Agapow & Burt, 2001).

182

183 **Resultados**

184 Foram obtidos 158 isolados monospóricos, sendo que de apenas 151 destes foi
185 obtido DNA de boa qualidade para as análises genéticas.

186 O alinhamento das sequências da região ITS resultou em 547 pares de bases,
187 apresentando alta similaridade com a sequência de *C. eragrostidis* depositada no GenBank
188 (AF163077), baseada na análise de BLAST, com E-value igual a 0,0, validando a
189 identificação da espécie.

190 A amplificação de parte do gene da β -tubulina resultou em um fragmento de 396
191 pares de bases com 97% de identidade com a sequência de *Cochliobolus heterostrophus*

192 (Drechsler) Drechsler (AB009971), com E-value igual a 0,0. Para o gene *gpd*, o
193 alinhamento das sequências resultou em 546 pares de bases, com alta similaridade (99%)
194 com a sequência de *C. eragrostidis* (HM053657), com E-value igual a 0,0.

195 Não foram observadas variações nas sequências das três regiões genômicas
196 analisadas, demonstrando que os isolados de *C. eragrostidis* procedentes de Alagoas,
197 Paraíba e Pernambuco fazem parte de um único haplótipo.

198 Dos iniciadores ISSR testados, apenas ACA₅, CGA₅ e a combinação ACA₅ + CA₈
199 geraram polimorfismo com bandas reproduzíveis em 151 isolados de *C. eragrostidis*. Os
200 demais foram monomórficos para todas as bandas geradas entre os isolados testados ou
201 geraram bandas de tamanho similares, dificultando a definição dos padrões de bandas de
202 DNA. O número de bandas amplificadas e de bandas polimórficas encontradas foi: seis e
203 uma para o ACA₅, dez e duas para CGA₅, e cinco e uma para a combinação ACA₅ + CA₈.
204 Exemplo de padrão de amplificação ISSR usando o iniciador ACA₅ está apresentado na
205 Figura 2.

206 A análise de agrupamento com base no coeficiente de Dice e no método UPGMA
207 revelou a formação de seis grupos com similaridade genética acima de 0,94 (Figura 3). Os
208 grupos não estão relacionados com a origem geográfica ou com o ano de coleta dos
209 isolados.

210

211 **Diversidade genotípica**

212 Os índices de riqueza genotípica, diversidade e equitabilidade, foram similares para
213 todas as populações amostradas (Tabela 3). O número de genótipos esperados em uma
214 amostra de 29 indivíduos ($n = 29$) variou de 4 na Zona da Mata de Alagoas a 5,2 na Zona
215 da Mata da Paraíba (Figura 4). A diversidade genotípica quantificada com o índice *G* de
216 Stoddart & Taylor foi baixa, entre 2,23 até 2,73. Os valores do índice de equitabilidade *E5*

217 variaram de 0,67 na Zona da Mata de Pernambuco a 0,75 no Agreste de Pernambuco.
218 Portanto, os genótipos estão uniformemente distribuídos dentro das populações regionais.
219 Os valores observados de fração clonal foram altos e variaram entre 0,83 a 0,89 (Tabela 3).

220

221 **Diferenciação de populações e modo de reprodução**

222 Pela AMOVA, a diferenciação das populações entre e dentro das quatro regiões foi
223 de $\Phi_{CT} = 0,016$ e $\Phi_{SC} = 0,418$, respectivamente, porém estas não foram significativas ($P =$
224 $0,257$ e $0,124$, respectivamente), o que demonstra ausência de evidência de estruturação
225 das populações por região geográfica, independentemente. A maior variação (94,24%)
226 ocorreu entre os indivíduos dentro de subpopulações de cada área de cultivo, com $\Phi_{ST} =$
227 $0,057$ e $P = 0,047$ (Tabela 4). Na figura 5 está representada a rede de haplótipos obtidos
228 com o marcador ISSR. Os haplótipos mais comuns, H4 e H1, juntamente com H2 e H5,
229 ocorrem em todas as quatro regiões amostradas, evidenciando a falta de estruturação das
230 subpopulações.

231 Nos testes de randomização, ambos IA e rd observados para o conjunto de dados
232 ISSR para os 151 isolados foram significativamente ($P < 0,001$) maiores que a média dos
233 IA e rd de conjuntos de dados aleatorizados (Figura 6). Portanto, rejeitou-se a hipótese de
234 acasalamento aleatório na população, e os isolados amostrados, provavelmente, são
235 procedentes de uma população de estrutura clonal.

236

237 **Discussão**

238 Constatou-se baixa diversidade genotípica em subpopulações de *C. eragrostidis* nas
239 áreas amostrais do nordeste do Brasil. Nessa região, há a predominância de um ou dois
240 genótipos uniformemente distribuídos e alto grau de similaridade genética entre os grupos
241 de isolados. Baixa diversidade genética é esperada em populações recentemente

242 estabelecidas, as quais são compostas de uma pequena parcela da diversidade genética
243 existente nos centros de origem, em razão do efeito do fundador (Gordon et al., 1996;
244 McDonald, 1997). Por outro lado, múltiplas introduções de um fungo numa área podem
245 resultar em maior diversidade de genes (Burdon & Roelfs, 1985; Correll et al., 1992;
246 Burgess et al., 2001).

247 Neste estudo, a baixa diversidade genética de *C. eragrostidis* suporta a idéia de que
248 este foi introduzido no Brasil e que houve poucas introduções, entretanto, os registros
249 disponíveis não permitem concluir acerca dessa possibilidade. O intercâmbio de material
250 propagativo deve ter sido a principal fonte de introdução da queima das folhas do inhame
251 no Brasil, principalmente devido ao fato de o inhame ser multiplicado vegetativamente
252 através das túberas-sementes inteiras ou por parte das túberas-semente. Como o inhame
253 cará-da-costa é originário da África, possivelmente este deva ser o centro de origem da
254 linhagem de *C. eragrostidis* patogênico a esta hospedeira.

255 A falta de estruturação e não diferenciação das populações entre e dentro das
256 regiões geográficas amostradas pode ser explicada pela migração de indivíduos entre
257 cultivos próximos, o que impediria, assim, o aparecimento de populações geneticamente
258 diferenciadas. Este fluxo pode estar ocorrendo tanto através do material propagativo do
259 hospedeiro como pela dispersão dos esporos do patógeno pelo vento (Sivanesan, 1990),
260 principalmente nas áreas amostradas neste estudo que são relativamente próximas (Figura
261 1).

262 Baseado nos testes para associação multilocus, a população total está em
263 desequilíbrio de ligação. Este resultado, aliado à homogeneidade genética de *C.*
264 *eragrostidis*, indica que a população está reproduzindo, predominantemente, de modo
265 assexual, e que a reprodução sexual, se ocorrer, é rara. O que é provável uma vez que o
266 teleomorfo *C. eragrostidis* somente foi reportado pelo cruzamento de dois *mating type*

267 opostos sob condições de laboratório, não havendo registro de sua ocorrência natural em
268 campo de cultivo (Tsuda & Ueyama, 1985).

269 Borchardt et al. (1998) observaram que populações tropicais (do Quênia, México e
270 sul da China) de *Setosphaeria turcica* (Luttr.) K.J. Leonard & Suggs apresentavam
271 diversidade genotípica alta, nenhum ou fraco desequilíbrio gamético, e uma distribuição
272 uniforme dos dois tipos de *mating-type*, indicando recombinação sexual freqüente.
273 Enquanto que as populações das regiões temperadas (Europa e norte da China) tiveram
274 uma diversidade genotípica menor, forte desequilíbrio de ligação, e uma distribuição
275 desigual dos tipos de *mating-type*, indicando que a recombinação sexual é rara nestas
276 populações.

277 Milgroom (1996) relata que o desequilíbrio de ligação também pode ser
278 influenciado pelo fluxo gênico, seleção e deriva. O fluxo de genes pode causar
279 desequilíbrio gamético pela imigração de um número relativamente grande de indivíduos
280 de populações com diferentes frequências alélicas (mistura de população). A seleção para
281 fenótipos controlados pela interação de genes em mais de um locus pode resultar em
282 associações não-aleatórias, como a exercida por cultivares com múltiplos genes de
283 resistência que favorecem as raças com genes de avirulência compatíveis. A deriva pode
284 afetar o desequilíbrio em pequenas populações, ou se uma população fundadora tem
285 associações não aleatórias na época da colonização de uma nova área ou uma nova cultivar
286 resistente.

287 Este é o primeiro estudo sobre caracterização molecular e variação genética em *C.*
288 *eragrostidis* isolados de inhame no Brasil. Ao se confirmar o que os resultados
289 preliminares indicam, ou seja, a baixa variabilidade genética das populações do fungo na
290 região nordeste, poderá se inferir sobre o potencial evolutivo do patógeno, e a partir deste,

291 traçar as melhores estratégias aplicadas a grupos de patógenos com este perfil de estrutura
292 genética.

293 McDonald & Linde (2002) propuseram um modelo de risco para prever o
294 potencial evolutivo das populações do patógeno com base na análise de sua estrutura
295 genética. De acordo com este modelo, *C. eragrostidis* pode ser enquadrado no grupo dos
296 patógenos com risco intermediário, os quais possuem reprodução assexuada ou endogamia,
297 mas que apresentam um elevado potencial para o fluxo de genótipos. Esses patógenos
298 apresentam baixa diversidade genotípica, porém, quando a linhagem virulenta surge por
299 mutação, esta pode ser movida de forma eficiente para os campos vizinhos ou regiões
300 agrícolas adjacentes. A melhor estratégia de manejo durável para este grupo é a
301 piramidização de genes de resistência, já que é improvável uma sequência de mutações à
302 virulência ocorrer na mesma linhagem clonal.

303

304 **Agradecimentos**

305 A primeira autora agradece à CAPES pela concessão de bolsa de estudo e à FACEPE pelo
306 auxílio mobilidade discente fornecido para a realização dos trabalhos nas instituições
307 parceiras.

308

309 **Referências**

310 Agapow PM, Burt A, 2001. Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Molecular*
311 *Ecology Notes* **1**, 101-2.

312 Alaniz S, Armengol J, León M, García-Jiménez J, Abad-Campos P, 2008. Analysis of
313 genetic and virulence diversity of *Cylindrocarpon liriodendri* and *C. macrodidymum*
314 associated with black foot disease of grapevine. *Mycological Research* **113**, 16-23.

- 315 Alfenas AC, Peters I, Brune W, Passador, GC, 1991. Eletroforese de proteínas e
316 isoenzimas de fungos e essências florestais. Viçosa, MG: UFV Imprensa universitária.
- 317 Bandelt HJ, Forster P, Röhl A, 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific
318 phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37–48.
- 319 Berbee ML, Pirseyedi M, Hubbard S, 1999. *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of
320 known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate
321 dehydrogenase gene sequences. *Mycologia* **91**, 964-77.
- 322 Borchardt DS, Welz HG, Geiger HH, 1998. Genetic structure of *Setosphaeria turcica*
323 populations in tropical and temperate climates. *Phytopathology* **88**, 322-29.
- 324 Burdon JJ, Roelfs AP, 1985. Isozyme and virulence variation in asexual reproducing
325 populations of *Puccinia graminis* and *P. recondita* on wheat. *Phytopathology* **75**, 907-13.
- 326 Burgess T, Wingfield MJ, Wingfield BD, 2001. Comparisons of genotypic diversity in
327 native and introduced populations of *Sphaeropsis sapinea* isolated from *Pinus radiata*.
328 *Mycological Research* **105**, 1331-339.
- 329 Correll JC, Gordon TR, McCain AH, 1992. Genetic diversity in California and Florida
330 populations of the pitch canker fungus *Fusarium subglutinans*. f. sp. *pini*. *Phytopathology*
331 **82**, 415-20.
- 332 Dice LR, 1945. Measures of the amount of ecological association between species.
333 *Ecology* **26**, 297-302.
- 334 Excoffier L, Laval G, Schneider S, 2005. Arlequin, version 3.0: an integrated software
335 package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**, 47-
336 50.
- 337 Ferreira ME, Grattapaglia D, 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em
338 análise genética. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN.

- 339 Glass NL, Donaldson GC, 1995. Development of primer sets designed for use with the
340 PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. Applied and
341 Environmental Microbiology **61**, 1323-330.
- 342 Gordon TR, Storer AJ, Okamoto D, 1996 Population structure of the pitch canker
343 pathogen, *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*, in California. Mycological Research **100**, 850-
344 54.
- 345 Grunwald NJ, Goodwin SB, Milgroom, MG, Fry, WE, 2003. Analysis of genotypic
346 diversity data for populations of microorganisms. Phytopathology **93**, 738-746.
- 347 Gupta M, Chyi YSI., Romero-Severson J, Owen JL, 1994. Amplification of DNA markers
348 from evolutionary diverse genomes using single primers of simple sequence repeats.
349 Theoretical and Applied Genetics **89**, 998-1006.
- 350 Hall T, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis
351 program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series **41**, 95-8.
- 352 Hantula J, Dusabenyagasani M, Hamelin RC, 1996. Random amplified microsatellites
353 (RAMS) - a novel method for characterizing genetic variation within fungi. European
354 Journal of Forest Pathology **26**, 159-66.
- 355 Mahuku GS, Riascos JJ, 2004. Virulence and molecular diversity within *Colletotrichum*
356 *lindemuthianum* isolates from Andean and Mesoamerican bean varieties and regions.
357 European Journal of Plant Pathology **110**, 253-63.
- 358 McDonald, BA, 1997. The Population Genetics of Fungi: Tools and Techniques.
359 Phytopathology **87**, 448-53.
- 360 McDonald BA, Linde C, 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and
361 durable resistance. Annual Review of Phytopathology **40**, 349-79.

- 362 Michereff SJ, Pedrosa RA, Noronha MA, Martins RB, 1999. Influencia de la irrigacion en
363 el atizonamiento de las hojas de ñame (*Dioscorea cayennensis*) por *Curvularia*
364 *eragrostidis* en el NE de Brasil. Boletin Micologico **14**, 49-56.
- 365 Milgroom MG, 1996. Recombination and the multilocus structure of fungal populations.
366 Annual Review of Phytopathology **34**, 457-77.
- 367 Moura, RM, 2005. Doenças do inhame-da-costa (*Dioscorea cayennensis*). In: Kimati H,
368 Amorim L, Rezende, JAM, Bergamin Filho, A, Camargo, LEA. Manual de Fitopatologia:
369 doenças das plantas cultivadas. 4 ed. São Paulo, SP: Agronômica Ceres, 415-19.
- 370 Paula H, Michereff SJ, Oliveira VS, Oliveira SMA, Laranjeira D, 2000. Variabilidad de
371 Alisiamientos de *Curvulaia eragrostidis* que Causan Atizonamiento de lãs Hojas de Ñame
372 (*Dioscorea cayennensis*) em Pernambuco, Brasil. Boletin Micológico **15**, 85-92.
- 373 Qi Y, Xie Y, Zhang X, Zhang X, Pu J, Zhang H, Huang S, Zhang H, 2009. Molecular and
374 pathogenic variation identified among isolates of *Corynespora cassiicola*. Molecular
375 Biotechnology **41**, 145–51.
- 376 Santos, ES, 1996. Inhame (*Dioscorea* spp.): aspectos básicos da cultura. João Pessoa, PB:
377 EMEPA-PB, SEBRAE.
- 378 Santos, ES, 2002. Manejo sustentável da cultura do inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste do
379 Brasil. In: II Simpósio Nacional sobre as Culturas do Inhame e do Taro. Anais eletrônicos.
380 João Pessoa, PB: EMEPA-PB. Online [http://www.emepa.org.br/anais/an_sincit2_v1.php]
- 381 Sivanesan A, 1990. *Cochliobolus eragrostidis*. Mycopathologia **111**, 113-114. (CMI
382 Descriptions of Fungi and Bacteria, 1002).
- 383 Stukenbrock EH, Banke S, McDonald BA, 2006. Global migration patterns in the fungal
384 wheat pathogen *Phaeosphaeria nodorum*. Molecular Ecology **15**, 2895-904.
- 385 Tsuda M, Ueyama A, 1985. Two new *Pseudocochliobolus* and a new species of
386 *Curvularia*. Transactions of the Mycological Society of Japan **26**, 321-30.

- 387 White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal
388 ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky, J. J, White
389 TJ (Eds). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, New York: Academic
390 Press Inc., 315-22.
- 391 Van der Waals JE, Korsten L, Slippers B, 2004. Genetic diversity among *Alternaria solani*
392 isolates from potatoes in South Africa. Plant Disease **88**, 959-64.
- 393 Zhan J, Kema GHJ, Waalwijk C, McDonald BA, 2002. Distribution of mating type alleles
394 in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* over spatial scales from lesions to
395 continents. Fungal Genetics and Biology **36**, 128-36.
- 396

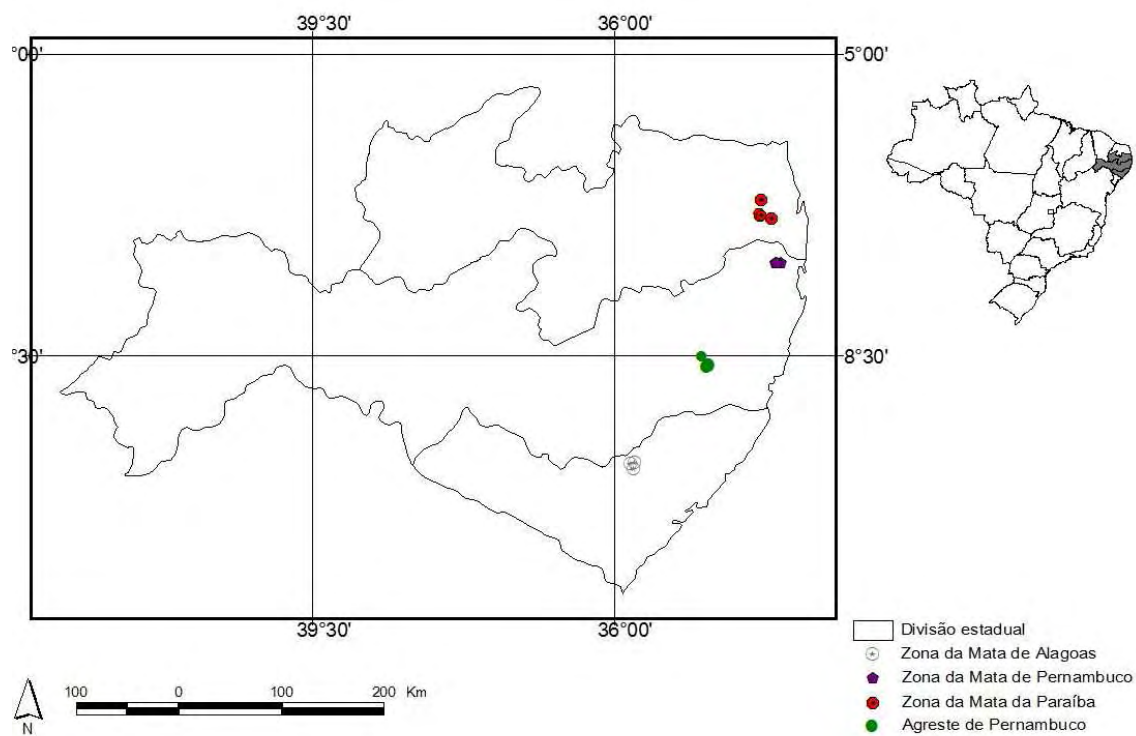


Figura 1: Mapa indicando os locais de coleta em áreas de cultivos de inhame *Dioscorea cayenensis* nos Estados de Paraíba, Pernambuco e Alagoas.

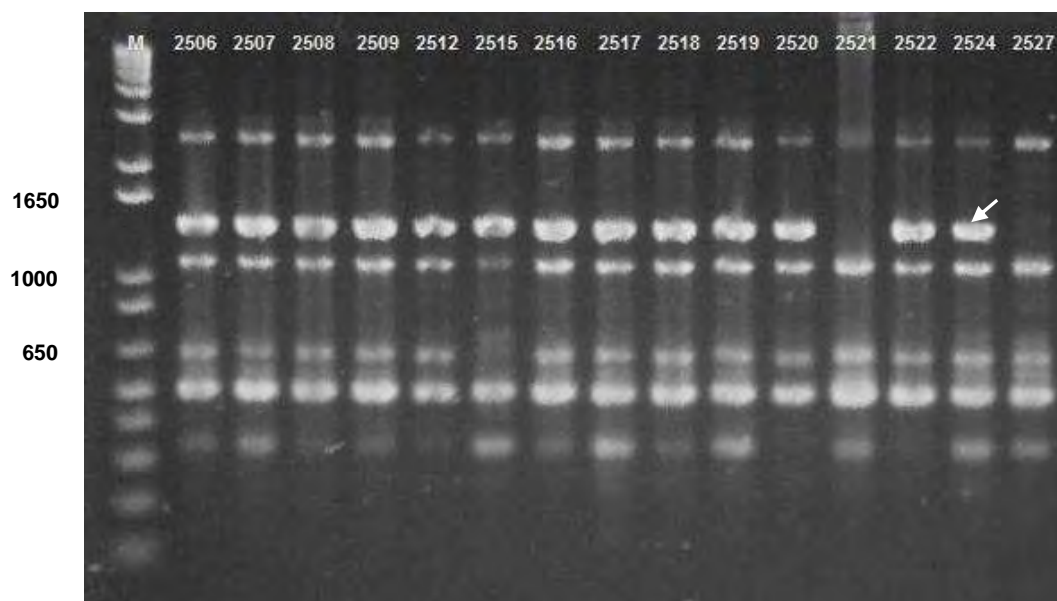


Figura 2: Produtos da amplificação obtidos por análise de ISSR utilizando o oligonucleotídeo arbitrário ACA₅. Banda polimórfica indicada pela seta. M = Marcador 1kd Plus DNA Ladder.

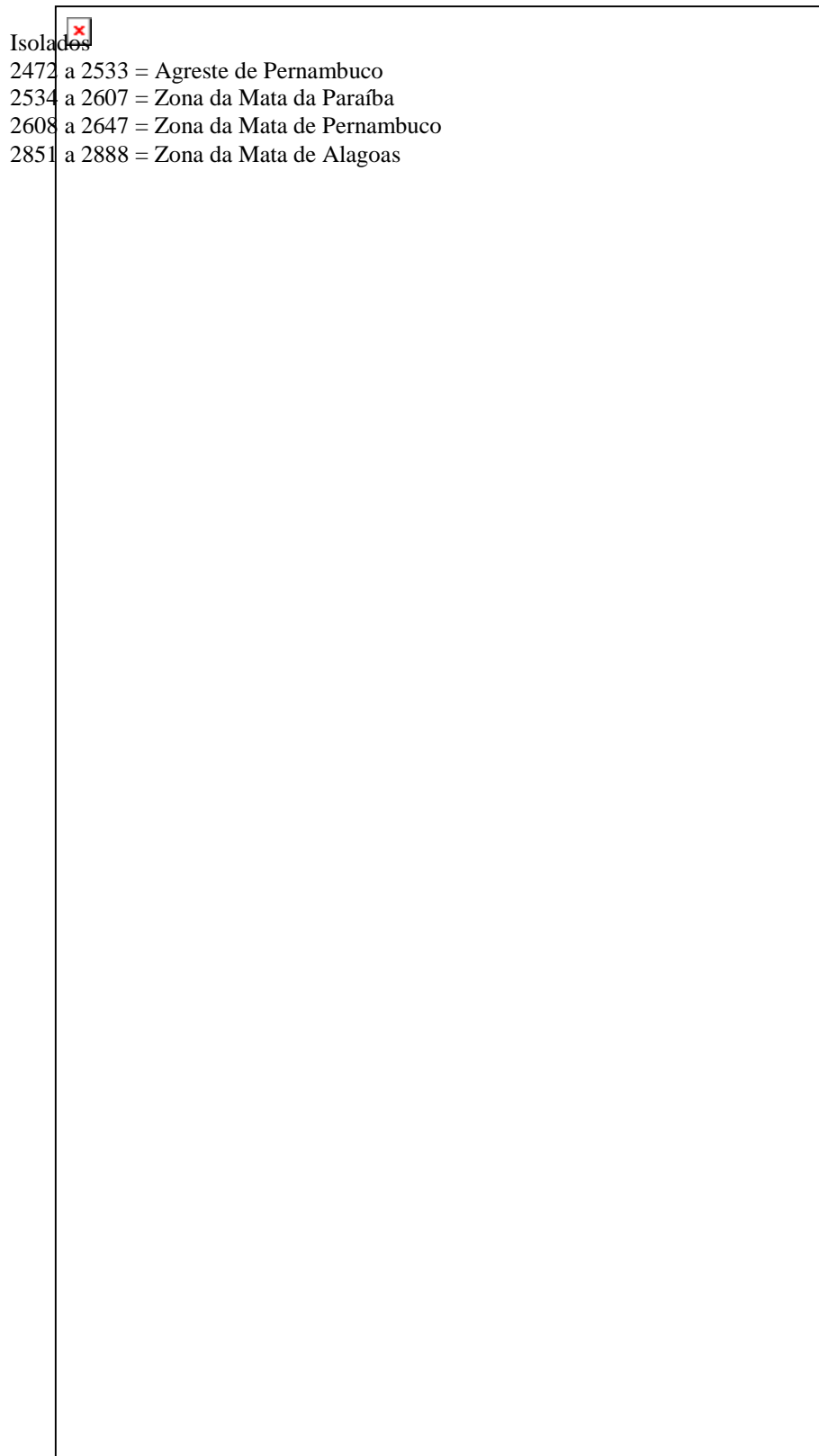


Figura 3: Dendrograma UPGMA obtido por meio da matriz do coeficiente de similaridade de Dice entre os padrões de bandas geadas com os iniciadores ACA5, CGA5 e ACA5 + CA8 para os 151 isolados de *C. eragrostidis*.

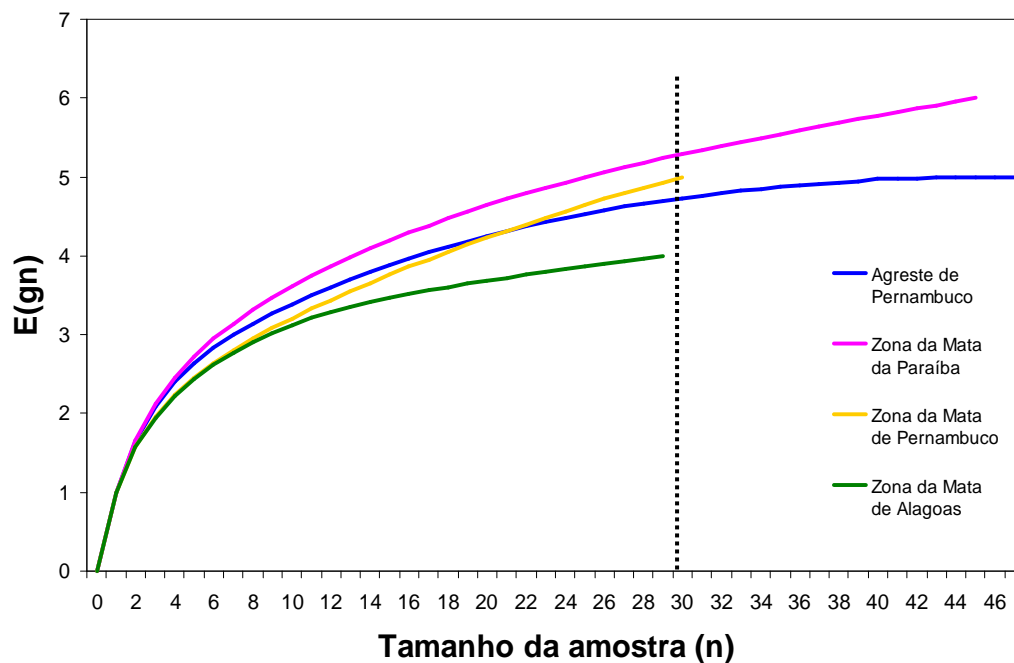


Figura 4: Riqueza estimada pelo método da rarefação, $E_{(g29)}$, para as quatro populações de *Curvularia eragrostidis* do nordeste do Brasil. O menor tamanho amostral $n = 29$ (linha pontilhada) das populações analisadas foi utilizado para comparar a riqueza estimada entre as populações, a qual ficou entre quatro e cinco haplótipos.

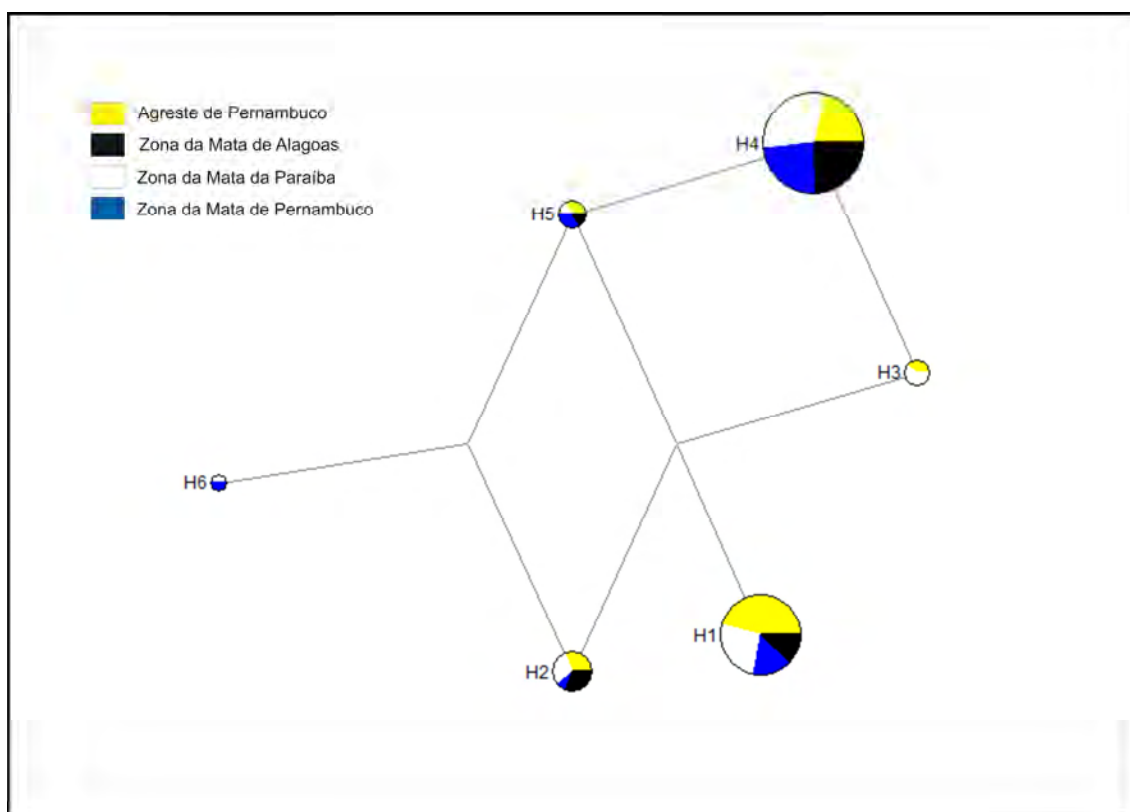


Figura 5: Rede de haplótipos *median-joining* de *Curvularia eragrostidis* do inhame, com base nos dados dos marcadores ISSR. O tamanho do círculo de cada haplótipo indica a sua frequência. As subpopulações geográficas do patógeno são indicadas pelas diferentes cores.

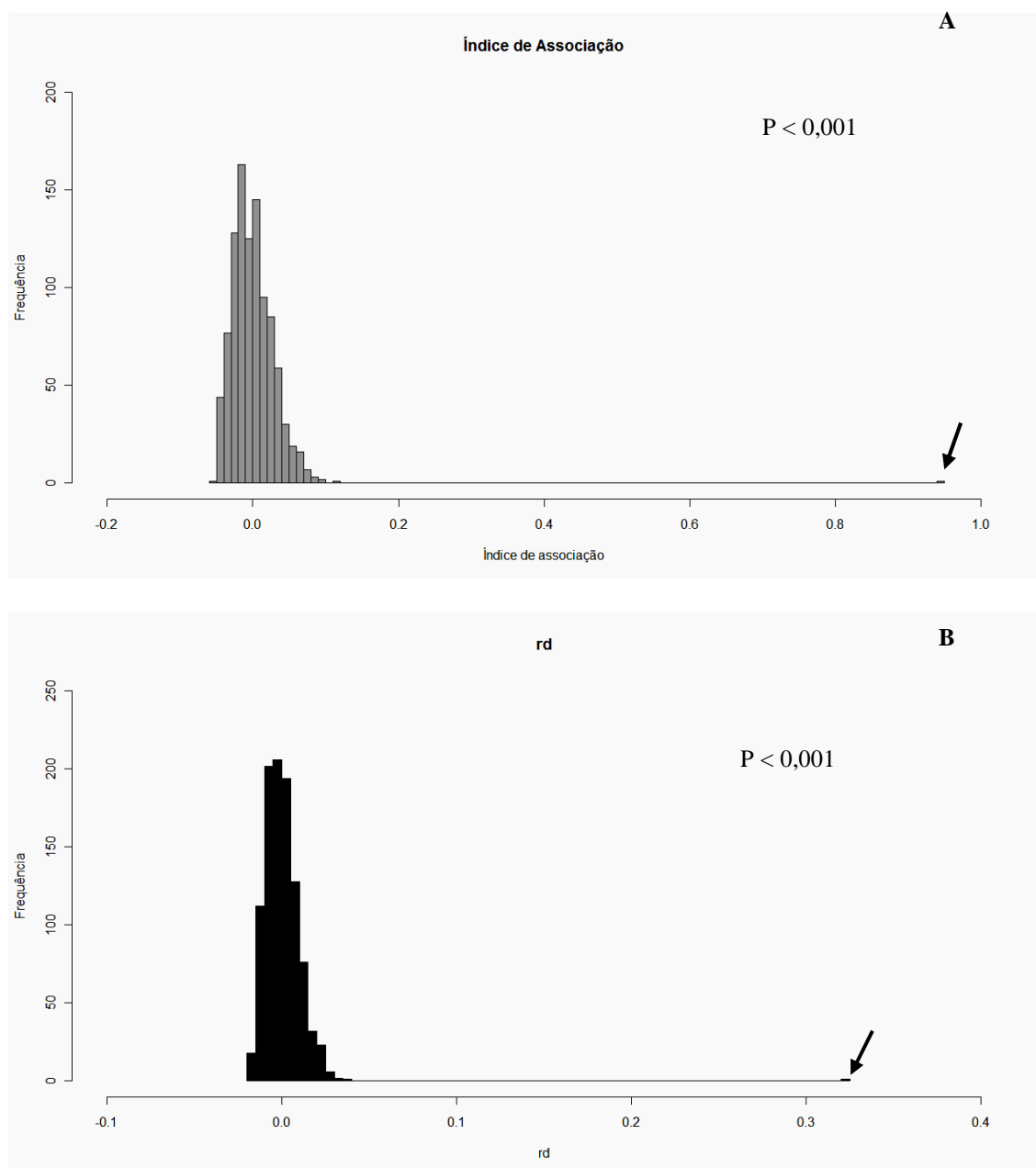


Figura 6: Teste de randomização comparando os índices de associação, IA, (A) e de desequilíbrio de associação multilocos, rd, (B) observados no conjunto de dados de 151 isolados de *C. eragrostidis* com o IA e rd de 1.000 conjuntos de dados recombinados artificialmente.

Tabela 1: Locais de coleta das amostras nos cultivos de inhame (*Dioscorea cayenensis*) amostrados nas quatro regiões geográficas dos Estados do nordeste do Brasil, com os números de isolados por área e total por região.

<i>Região/Locais de coleta</i>	<i>Coordenada geográfica (Lat./Long.)</i>	<i>Ano de coleta</i>	Número de isolados
Agreste de Pernambuco		2008	47
Área 2	08°24'00.5"S/35°45'04.6"W	2008	9
Área 3	08°29'32.3"S/35°42'21.3"W	2008	10
Área 4	08°28'55.1"S/35°41'46.7"W	2008	9
Área 6	08°28'27.0"S/35°41'02.3"W	2008	10
Área 7	08°28'56.6"S/35°41'02.5"W	2008	9
Zona de mata da Paraíba		2008	45
Área 8	07°10'40.8"S/35°13'50.9"W	2008	8
Área 9	07°02'17.3"S/35°13'19.5"W	2008	9
Área 10	07°09'28.2"S/35°14'25.1"W	2008	10
Área 11	07°12'06.6"S/35°07'54.3"W	2008	9
Área 12	07°10'25.7"S/35°13'34.4"W	2008	9
Zona da mata de Pernambuco		2008	30
Área 13	07°34'53.0"S/35°03'01.0"W	2008	10
Área 14	07°34'53.6"S/35°06'09.3"W	2008	10
Área 15	07°35'05.6"S/35°05'33.0"W	2008	10
Zona da mata de Alagoas		2009	29
Área 16	09°22'50.4"S/36°20'06.1"W	2009	10
Área 17	09°19'25.4"S/36°19'53.9"W	2009	10
Área 18	09°20'01.7"S/36°21'45.4"W	2009	9

Tabela 2: Lista dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados neste estudo.

Nome	Sequência (5' → 3')	Referência	Ta (°C) *
ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White <i>et al.</i> , 1990	55
ITS 5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White <i>et al.</i> , 1990	55
Bt1a	TTCCCCCGTCTCCACTTCTTCATG	Glass e Donaldson, 1995	53
Bt1b	GACGAGATCGTTCATGTTGAACTC	Glass e Donaldson, 1995	53
Gpd1F	CAACGGCTTCGGTCGCATTG	Berbee <i>et al.</i> , 1999	57
Gpd2R	GCCAAGCAGTTGGTTGTGC	Berbee <i>et al.</i> , 1999	57
CGA ₅	DHB(CG A) ₅	Hantula <i>et al.</i> , 1996	60
GT ₅	YHY(GT) ₅ G	Hantula <i>et al.</i> , 1996	58
GACA ₄	HBDB(GACA) ₄	Van der Waals <i>et al.</i> , 2004	45
ACA ₅	BDB(ACA) ₅	Hantula <i>et al.</i> , 1996	49
AG ₇	HBH(AG) ₇ A	Mahuku e Riascos, 2004	50
ACTG ₄	ACTG ₄	Gupta <i>et al.</i> , 1994	48
CA ₈	(CA) ₈ T	Qi <i>et al.</i> , 2009	52
AG ₈	(AG) ₈ YT	Qi <i>et al.</i> , 2009	50
TCG ₅	DHB(TCG) ₅	Alaniz <i>et al.</i> , 2009	61
CCA ₅	DDB(CCA) ₅	Alaniz <i>et al.</i> , 2009	55
GA ₈	(GA) ₈ YG	Qi <i>et al.</i> , 2009	48

As seguintes denominações foram utilizadas para os sítios degenerados: B (G, T ou C), D (G, A ou T), H (A, T ou C) e Y (A, C ou G).

* Ta = Temperatura de anelamento.

Tabela 3: Estimativas dos índices de riqueza, equitabilidade e diversidade de populações de *Curvularia eragrostidis* obtidas de cultivos de inhame em quatro regiões do nordeste do Brasil.

Estatística	Agreste de Pernambuco	Zona da Mata da Paraíba	Zona da Mata de Pernambuco	Zona da Mata de Alagoas	<i>População total</i>
Tamanho da amostra (n)	47	45	30	29	151
Índices de riqueza					
<i>g_{obs}</i>	5	6	5	4	6
<i>E(g₂₉)</i>	4,7	5,2	4,9	4	
Fração clonal	0,89	0,87	0,83	0,86	0,96
Índices de equitabilidade					
<i>E₅</i>	0,75	0,70	0,67	0,70	0,72
Índices de diversidade					
<i>H'</i>	1,19 (0,96-1,43)	1,27 (1,01-1,53)	1,07 (0,75-1,38)	1,01 (0,74-1,28)	1,22 (1,09-1,36)
<i>N_I</i>	3,30 (2,58-4,02)	3,55 (2,72-4,38)	2,90 (2,05-3,76)	2,75 (2,02-3,48)	3,40 (2,95-3,85)
<i>G</i>	2,73 (2,13-3,33)	2,79 (2,06-3,53)	2,28 (1,55-3,02)	2,23 (1,50-2,96)	2,73 (2,36-3,10)
<i>λ</i>	0,37 (0,28-0,46)	0,36 (0,26-0,46)	0,44 (0,29-0,58)	0,45 (0,28-0,61)	0,37 (0,31-0,42)

g_{obs} = número de genótipos diferentes observados.

E(g₂₉) = número de genótipos esperados para uma amostrar de 29 indivíduos.

H' = Índice de Shannon-Wiener.

N_I = Índice N1 de Hill.

G = Índice de Stoddart & Taylor.

λ = Índice de Simpson.

Tabela 4: Análise de variação molecular (AMOVA) dos grupos de amostras de *Curvularia eragrostidis* de inhame, organizados em quatro regiões (Agreste de Pernambuco, Zona da mata de Paraíba, Zona da mata de Pernambuco e Zona da mata d Alagoas).

<i>Fontes de variação</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Componentes de variação</i>	<i>Porcentagem de variação</i>	Φ	Valor de P
Entre regiões	3	0,011	1,64	0,016	0,257
Entre populações dentro das regiões	12	0,028	4,12	0,418	0,124
Dentro das populações	135	0,645	94,24	0,057	0,047
Total	150	0,684			

Capítulo III

**FILOGENIA MOLECULAR DO GÊNERO *Cochliobolus* Drechsler COM ÊNFASE
NAS RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DO ANAMORFO *Curvularia eragrostidis*
(Henn.) J.A. Mey.**

1 **Filogenia molecular do gênero *Cochliobolus* Drechsler com ênfase nas relações**
2 **filogenéticas do anamorfo *Curvularia eragrostidis* (Henn.) J.A. Mey.**

3 I. F. de França¹, Câmara, M.P.S.¹, G. S. A. Lima^{2*}

4

5 ¹Departamento de Agronomia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco,
6 Brasil, 52171-900.

7 ²Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, Alagoas,
8 Brasil, 57100-000.

9

10 *Autor para correspondência: Gaus S. A. Lima

11 Email: gausandrade@yahoo.com.br

12

13

14 **Resumo**

15 Para elucidar as relações filogenéticas das espécies de *Bipolaris* e *Curvularia*, incluindo *C.*
16 *eragrostidis*, as quais apresentam teleomorfos classificados no gênero *Cochliobolus*, foram
17 inferidas árvores de sequências nucleotídicas das regiões ITS e LSU rDNA e do gene *gpd*.
18 Os resultados sugerem que o gênero *Cochliobolus* consiste em dois clados, com diferenças
19 morfológicas nos conídios. *C. eragrostidis* está no clado das espécies de
20 *Bipolaris/Curvularia* com conídios menores, mais próximo geneticamente de *C. clavata*,
21 *C. brachyspora*, *C. intermedia* e *C. oryzae*. Os dois clados observados podem consistir em
22 duas linhagens, correspondendo a dois teleomorfos distintos, no entanto evidências
23 adicionais precisam ser compiladas para maiores conclusões taxonômicas sobre estes
24 táxons.

25 **Palavras-chave:** Pleosporaceae, ITS-rDNA, LSU-rDNA, *gliceraldeído-3-fostato*
26 *desidrogenase*.

27

28 **Introdução**

29 Atualmente, são conhecidas mais de 30 espécies do ascomiceto *Cochliobolus*, a
30 maioria saprófita e presente em diferentes substratos vegetais e no solo. Contudo, muitas
31 espécies são fitopatogênicas, e causam manchas foliares, podridão de raízes e danos a
32 sementes. As espécies fitopatogênicas ocorrem predominantemente em monocotiledôneas,
33 principalmente gramíneas, como milho (*Zea mays* L.), arroz (*Oryza sativa* L.), cevada
34 (*Hordeum vulgare* L.), cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), trigo (*Triticum* spp.) e aveia
35 (*Avena sativa* L.) (Sivanesan, 1987, Berbee et al., 1999; Lu et al., 2003). Entretanto,
36 algumas espécies podem causar doenças em dicotiledôneas, como *C. eragrostidis* (Tsuda
37 & Ueyama) Sivan. (anamorfo *Curvularia eragrostidis*), agente causal da queima das folhas

38 do inhame (*Dioscorea cayenensis* Lam.), cultura de importância econômica-social em
39 várias regiões da África, Ásia e no Nordeste brasileiro (Santos, 2002).

40 O gênero *Cochliobolus* é caracterizado por ascoma peritecial, unilocular, com um
41 corpo globoso e um “pescoço” ostiolar longo e cilíndrico ou curto, marrom escuro a preto,
42 com pouco ou nenhum desenvolvimento estromático. As ascas são cilíndricas a clavadas,
43 bitunicadas, geralmente com oito ascósporos, que são filiformes, multiseptados e
44 arranjados em espiral nas ascas. Anamorfos *Bipolaris* Shoemaker e *Curvularia* Boedijn
45 possuem teleomorfos *Cochliobolus*, e apresentam características morfológicas
46 semelhantes, diferindo na morfologia dos conídios: tamanho, número de septos, curvatura
47 e presença ou ausência de uma célula desproporcionalmente aumentada (Sivanesan, 1987).

48 A identificação das espécies dentro desses gêneros é difícil devido à inconsistência
49 das características morfológicas usadas para a delimitação destas, como a morfologia dos
50 conídios que pode variar entre os isolados e condições culturais (Shimizu et al., 1988,
51 Hosokawa et al., 2003). Conseqüentemente, análises de filogenia molecular apresentam
52 potencial para elucidar questões taxonômicas de interesse. Berbee et al. (1999) analisaram
53 as relações filogenéticas de espécies de fungos da família Pleosporaceae, com base em
54 sequências da região do espaço interno transcrito (ITS), 5.8S do rDNA e do gene
55 *gliceraldeído-3-fostato desidrogenase (gpd)* e observaram que os gêneros *Cochliobolus*,
56 *Pyrenophora* Fr. (anamorfo *Drechslera* S. Ito) e *Setosphaeria* K.J. Leonard & Suggs
57 (anamorfo *Exserohilum* K.J. Leonard & Suggs) agrupavam em três clados, e o gênero
58 *Cochliobolus* estava dividido em dois grupos monofiléticos. Este trabalho contribuiu para
59 melhorar o entendimento desse grupo de fungos, porém foram analisadas apenas duas
60 regiões genômicas e a reconstrução filogenética foi baseada apenas em máxima
61 parcimônia.

62 Nos últimos anos, verificou-se avanço considerável de ferramentas analíticas e
63 métodos mais robustos de reconstrução filogenética como a máxima verossimilhança e a
64 inferência bayesiana (Felsenstein, 1981, Huelsenbeck et al., 2001). A máxima
65 verossimilhança permite a inferência de árvores filogenéticas usando complexos modelos
66 evolutivos, e leva em consideração todas as vias de mutação possíveis e compatíveis com
67 os dados (Whelan et al. 2001, Holder & Lewis 2003). Análise baseada em inferência
68 bayesiana tornou-se método muito usado em filogenia, pois permite análise rápida de
69 conjuntos de dados amplos, incorpora vários modelos de evolução de sequência, e
70 considera táxons com períodos de divergência antigos, como os fungos, nos quais a
71 homoplasia é muito frequente. A análise bayesiana também tem a vantagem de não ser
72 restrita a uma única melhor árvore (Padovan et al., 2005).

73 Métodos bayesianos têm sido utilizados para resolver questões taxonômico-
74 filogenéticas importantes relativas a fungos e Oomycetes de interesse fitopatológico,
75 principalmente nos gêneros com complexos de espécies difíceis de serem delimitadas
76 morfologicamente, tais como *Alternaria* (Andrew et al., 2009), *Ceratocystis* (Van Wyk et
77 al., 2009, 2010), *Fusarium* (Scott & Chakraborty, 2006, Obanor et al., 2010, Sarmiento-
78 Ramírez et al., 2010), *Phytophthora* (Blair et al., 2008, Jung & Burgess, 2009, Jung et al.,
79 2011), *Phoma* (Gruyter et al. 2009, 2010, Aveskamp et al. 2009, 2010), *Pythium* (Moralejo
80 et al., 2008, McLeod et al., 2009, Bala, 2010).

81 O objetivo do presente estudo foi avaliar as relações filogenéticas de espécies do
82 gênero *Cochliobolus* e isolados de *C. eragrostidis* do nordeste do Brasil, através da análise
83 de sequências de fungos da família Pleosporaceae, usando métodos de reconstrução
84 filogenética baseados em algoritmos de máxima verossimilhança e Bayesianos.

85

86 **Material e Métodos**

87

88 Obtenção dos isolados

89 Foram coletadas folhas com sintomas de queima em 16 áreas de cultivo (Tabela 1)
90 de inhame, *D. cayenensis*, nas principais regiões produtoras dos estados de Alagoas (Zona
91 da Mata), Pernambuco (Zona da Mata e Agreste) e Paraíba (Zona da Mata). No
92 laboratório, as folhas foram incubadas em câmara úmida por 48 h para o posterior
93 isolamento direto, sob microscópio estereoscópico. Nesta etapa, os conídios foram
94 transferidos para placas contendo meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) em placas de
95 Petri que foram mantidas a temperatura ambiente. Também foi realizado isolamento
96 indireto, a partir de fragmentos da região de transição de tecido foliar sadio e lesionado, os
97 quais foram imersos em solução de álcool 70% durante 30 s e em seguida em hipoclorito
98 de sódio a 1,5% por 1 min para a desinfestação. Os fragmentos foram lavados por duas
99 vezes consecutivas em água destilada esterilizada (ADE), secos em papel filtro esterilizado
100 e transferidos para BDA em placas de Petri mantidas a temperatura ambiente.

101 Foram selecionados 16 isolados para as análises filogenéticas com dados de ITS e
102 *gpd*, e apenas um para a região LSU do rDNA.

103

104 Extração de DNA dos isolados

105 Discos de micélio cultivados em BDA foram transferidos para Erlenmeyers
106 contendo 30 mL do meio líquido sacarose-extrato de levedura-asparagina (Alfenas et al.,
107 1991). Após oito dias, o micélio foi retirado e o excesso de meio foi lavado com ADE e o
108 micélio foi armazenado a -86°C. Para a extração, aproximadamente 200 mg de micélio
109 foram transferidos para almofariz e refrigerados a -86°C por 5 min. Em seguida, o micélio
110 foi macerado e o DNA genômico foi então extraído seguindo o protocolo CTAB (*cationic*
111 *hexadecyl trimethyl ammonium bromide*) (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

112

113 Amplificação e sequenciamento da região ITS, LSU e GPD

114 As sequências parciais da região ITS, LSU e do gene *gpd* foram amplificadas via
115 PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores ITS4 e ITS5 (White et al., 1990) LROR e
116 LR7 (Vilgalys & Hester, 1990), e *gpd1* e *gpd2*, respectivamente (Berbee et al., 1999).

117 As reações foram realizadas em volume total de 60 µL, contendo 6 µL de tampão
118 10X (KCl 100 mM; Tris-HCl 100 mM pH 9,0; Triton-X 1%), 4,8 µL de dNTPs 2,5 mM,
119 1,8 µL de MgCl₂ 50 mM, 3 µL de cada oligonucleotídeo 10 µM, 1U da DNA Taq
120 Polimerase, 1 µL de DNA (10 a 100 ng) e 40 µL de água ultrapura. As amplificações
121 foram feitas usando as seguintes condições de ciclagem: um ciclo de desnaturação inicial a
122 95°C por 5 min; 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 30 s; anelamento a
123 55°C por 1 min e 30 s e extensão a 72°C por 1 min); extensão final a 72°C por 5 min para a
124 região ITS e LSU e um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 5 min; 35 ciclos de
125 amplificação (desnaturação a 94°C por 30 s; anelamento a 57°C por 1 min e 30 s e
126 extensão a 72°C por 1 min); extensão final a 72°C por 5 min, para *gpd*.

127 Os produtos foram analisados em gel de agarose a 1,5% (p/v), após eletroforese em
128 tampão TAE (Tris-Ácido Acético, EDTA 0,5M pH 8,0) a 80 V por 1 h, corados com
129 brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta. As amplificações de PCR ITS e *Gpd*
130 foram purificadas utilizando illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE
131 Healthcare). O sequenciamento foi realizado pela Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul)
132 diretamente dos produtos de PCR purificados. As sequências geradas foram editadas e
133 alinhadas com auxílio do programa Bioedit 7.0.9 (Hall, 1999).

134 Sequências de outras espécies pertencentes à família Pleosporaceae, geradas em
135 estudos anteriores e disponíveis no GenBank, foram incluídas nas análises (Tabela 1). As
136 sequências foram alinhadas com o programa Muscle (Edgar, 2004) disponível no pacote

137 computacional MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura et al., 2007).
138 Os alinhamentos foram manipulados manualmente e as regiões que não foram alinhadas
139 com segurança foram excluídas da análise. Dois métodos de reconstrução filogenética
140 foram empregados: máxima verossimilhança (ML) e inferência Bayesiana (IB).

141 A análise de ML, realizadas apenas para ITS e *gpd*, foram feitas no PAUP 4.0 b10
142 (Swofford, 2002) e as de IB no MrBayes versão 3.0 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Os
143 modelos de substituição mais adequados para a análise ML e IB foram determinados pelo
144 Modeltest 3.7 (Posada e Crandall, 1998) e MrModeltest v. 2.2 (Nylander 2004),
145 respectivamente. A confiabilidade das árvores de ML geradas foi avaliada por meio de
146 1000 repetições bootstrap. Na IB, cada corrida de quatro cadeias de Markov (MCMC) com
147 parâmetro “*heated*” de 0,1 e 5.000.000 gerações. As árvores foram salvas a cada 100
148 gerações, resultando em 50.000 árvores salvas. O *burn-in* foi fixado em 1.250.000
149 gerações, após o qual os valores de probabilidade foram fixados.

150

151 **Resultados**

152

153 **Análises dos dados de sequências e filogenia da região ITS**

154 O alinhamento das 16 sequências da região ITS dos isolados obtidos neste trabalho
155 resultou em 547 pares de bases, sem variabilidade entre elas. Através da análise de
156 BLAST, a sequência dos isolados do nordeste brasileiro apresentou alta similaridade com a
157 sequência de *C. eragrostidis* depositada no GenBank (AF163077), com E-value igual a
158 0,0, confirmando a identificação molecular da espécie.

159 O conjunto de dados de ITS, para as análises filogenéticas, consistiu de 63 táxons
160 (Tabela1), com 588 nucleotídeos alinhados, dos quais 203 foram informativos para
161 parcimônia. Foi utilizado como grupo externo *Phoma sclerotioides*. Na ML e IB, o melhor

162 modelo evolutivo selecionado foi GTR+I+G, seguindo critério de informação Akaike
163 (AIC), implementado pelo Modeltest e MrModeltest.

164 Dois clados foram formados com as espécies de *Cochliobolus* analisadas nesse
165 trabalho, tanto nas árvores de ML quanto nas de IB, em topologias quase idênticas. Estes
166 grupos estão de acordo com os encontrados por Berbee et al. (1999). O primeiro grupo está
167 suportado por 80% de bootstrap e 89% de probabilidade *a posteriori* (Figuras 1 e 2), e
168 inclui *C. sativus*, *C. carbonum*, *C. victoriae* e *C. heterostrophus*, fitopatógenos
169 economicamente importantes. As espécies encontradas nesse grupo compreendem
170 anamorfos do gênero *Bipolaris* que possuem esporos curvados (levemente ao longo de
171 todo o esporo), fusiformes, compridos, variando de 60 até 250 μm de comprimento.

172 *Setosphaeria* e o segundo grupo de *Cochliobolus* formam um clado com 50% de
173 bootstrap e 76% de probabilidade *a posteriori*. *Cochliobolus homomorphus* forma um
174 grupo irmão com as espécies de *Cochliobolus* do grupo 2, com 68% de bootstrap e 89% de
175 probabilidade *a posteriori* (Figuras 1 e 2). As espécies encontradas neste grupo possuem
176 anamorfos dos gêneros *Curvularia* e *Bipolaris*, que apresentam conídios retos ou curvados,
177 mas não ao longo de todo o esporo, e mais curtos que os do primeiro grupo, normalmente
178 menores que 80 μm .

179 Os isolados de *C. eragrostidis*, sequenciados neste estudo, foram posicionados no
180 segundo grupo de *Cochliobolus*, formando um clado único com os isolados de *C.*
181 *eragrostidis* (HM053668) e de *C. clavata* (AF071336), altamente suportado com valores
182 de 87% de *bootstrap* e 97% de probabilidade *a posteriori*.

183

184 **Análises dos dados de sequências e filogenia do gene *gpd***

185

186 A amplificação e o alinhamento da sequência de parte do gene *gpd* resultou em 546
187 pares de bases, apresentando alta similaridade (99%) com a sequência de *C. eragrostidis*
188 (HM053657), com E-value igual a 0,0.

189 Sequências parciais de *gpd* dos 63 táxons estudados para a região ITS foram
190 obtidas e analisadas. A matriz final do conjunto de dados continha 648 nucleotídeos
191 alinhados, dos quais 210 foram informativos para parcimônia. *Phoma sclerotioides*
192 também foi utilizado como grupo externo. Na ML e IB, o melhor modelo foi TVM+I+G e
193 GTR+I+G, respectivamente, seguindo o AIC.

194 Na árvore gerada pela ML (Figura 3), o gênero *Cochliobolus* também foi dividido
195 em dois grupos, semelhante ao constatado para a região ITS, com topologias similares. E a
196 composição das espécies pertencentes a cada um dos grupos também foi semelhante. No
197 entanto, *Setosphaeria* aparece como grupo irmão do grupo 1, porém o clado não foi
198 suportado estatisticamente.

199 Na inferência bayesiana, os dois grupos de *Cochliobolus* foram monofiléticos com
200 suporte de 100% de probabilidade *a posteriori*. *Setosphaeria* novamente aparece como
201 grupo irmão do grupo 1. As espécies *Cochliobolus kusanoi*, *Bipolaris indica*, *C.*
202 *intermedius*, *Curvularia brachyspora*, *C. clavata* e *C. eragrostidis*, incluindo os isolados
203 de inhame do nordeste do Brasil, não agruparam com os isolados das espécies de nenhum
204 dos dois grupos.

205 Na análise de ML do gene *gpd*, assim como os resultados obtidos para o ITS, os
206 isolados de *C. eragrostidis*, sequenciados neste estudo, foram posicionados no segundo
207 grupo de *Cochliobolus*, formando um clado único com os isolados de *C. eragrostidis*
208 (HM053657) e de *C. clavata* (AF081391), com suporte de 100% de *bootstrap*. O resultado
209 da inferência bayesiana mostrou que os isolados do Brasil também formam um clado com
210 suporte de 100% de probabilidade *a posteriori* com estes mesmos isolados de *C.*

211 *eragrostidis* e *C. clavata*. No entanto, este clado não estava relacionado com o segundo
212 grupo de *Cochliobolus*.

213

214 **Análises dos dados de sequências e filogenia na região LSU ou 28S do rDNA**

215

216 A amplificação e sequenciamento de parte da região LSU do rDNA do isolado
217 2854 resultou em um fragmento de 1284 pares de bases. A análise de BLAST desta
218 sequência resulta em 100% de similaridade com 1153 pares de bases do isolado de *C.*
219 *brachyspora* (AF279380), com E-value igual a 0,0. Para esta região genômica, a única
220 sequência disponível da espécie *C. eragrostidis* no genbank é a AF163983, cujo BLAST
221 com o isolado 2854 resulta no alinhamento de 672 pares de base com 99% de similaridade,
222 diferindo apenas em duas bases.

223 Para a inferência Bayesiana, foi gerada uma matriz com o alinhamento de
224 sequências de 19 táxons, resultando em 654 nucleotídeos sendo apenas 18 informativos
225 para parcimônia. *Lewia eureka* foi utilizado como grupo externo. Seguindo o AIC, o
226 melhor modelo de substituição foi o GTR+I.

227 Na árvore gerada (Figura 5), o gênero *Cochliobolus* aparece como um grupo
228 monofilético, incluindo a espécie *Setosphaeria monoceras* no clado. Podem ser
229 identificados três subgrupos dentro do gênero. As espécies *B. crustacea*, *B. papendorfii*, *C.*
230 *heteropogonicola*, *C. pallescens* e *C. hawaiiensis*, formam um clado com 100% de
231 probabilidade *a posteriori*.

232 As espécies *C. sativus* e *C. heterostrophus*, representantes do grupo 1, formaram
233 um clado com *C. cynodontis*, *C. nodulosus* e *C. heliconiae*, porém com baixo suporte (62%
234 de probabilidade *a posteriori*). Os anamorfos destas espécies são *Bipolaris* que possuem
235 conídios maiores e levemente curvados ao longo de todo o conídio.

236 Um terceiro subgrupo foi formado, com as espécies *C. oryzae*, *C. brachyspora* e *C.*
237 *eragrostidis*, incluindo o isolado 2854 gerado neste estudo, com suporte de 81% de
238 probabilidade *a posteriori*. As espécies deste subgrupo possuem conídios retos ou
239 levemente curvados, elipsóides a clavados, com 3 septos, e as células distais mais claras
240 que as células centrais.

241

242 **Discussão**

243 O conjunto de dados das três regiões genômicas analisadas neste estudo suportam a
244 divisão do gênero *Cochliobolus* nos dois grandes grupos, observados por Berbee et al.
245 (1999) e Dela Paz et al. (2006), com fortes evidências de representarem duas linhagens
246 evolutivas. Estas informações indicam que este gênero necessita de uma revisão
247 taxonômica, com base nas características morfológicas, tanto dos anamorfos quanto dos
248 teleomorfos, em busca de caracteres confiáveis para a separação dos dois grupos.

249 A separação de *Bipolaris* e *Curvularia* se baseia apenas na morfologia dos
250 conídios: retos ou curvos, número de septos, hilo protraído ou não, e presença ou ausência
251 de célula desproporcionalmente aumentada (Sivanesan, 1987). Porém, essa classificação
252 pode ser artificial, visto que algumas espécies de *Bipolaris* e *Curvularia* possuem conídios
253 com características intermediárias entre os dois gêneros. Por exemplo, *B. ellisii* e *B.*
254 *papendorffii* possuem conídios curvados com 3 a 5 septos e são *Curvularia*-like, enquanto
255 que *C. inaequalis*, apresenta conídios retos sem a conspícua célula aumentada, sendo
256 *Bipolaris*-like (Goh et al., 1998).

257 Com relação ao teleomorfo, Tsuda et al. (1977) observaram que algumas espécies
258 desenvolvem ascomas a partir de estromas colunares ou planos, que são firmemente
259 aderidos ao substrato na base e com ascósporos dispostos muitas vezes paralelos à
260 frouxamente enrolados dentro das ascas. Estes autores designaram o gênero

261 *Pseudocochliobolus* para incluir as espécies *P. nisikadoi* Tsuda, Ueyama & Nishih., *P.*
262 *lunatus* (R.R. Nelson & F.A. Haasis) Tsuda, Ueyama & Nishih., *P. geniculatus* (R.R.
263 Nelson) Tsuda, Ueyama & Nishih. e *P. spicifer* (R.R. Nelson) Tsuda, Ueyama & Nishih., e
264 diferenciá-las dos *Cochliobolus* que desenvolvem os pseudotécios sem estroma basal e
265 com os ascósporos arrançados fortemente em espirais dentro das ascas. Posteriormente, *P.*
266 *australiensis* Tsuda & Ueyama, *P. hawaiiensis* (Alcorn) Tsuda & Ueyama, *P. verruculosus*
267 Tsuda & Ueyama, *P. pallescens* Tsuda & Ueyama, *P. akaii* Tsuda & Ueyama e *P.*
268 *eragrostidis* Tsuda & Ueyama (Tsuda & Ueyama, 1981, 1982, 1983, 1985) foram
269 adicionadas ao gênero.

270 No entanto, devem ser realizadas análises filogenéticas adicionais com as demais
271 espécies de *Cochliobolus* (*Bipolaris* e *Curvularia*) que produzem ou não o estroma para se
272 inferir se esta pode ser considerada característica importante para distinguir estes dois
273 supostos gêneros. Berbee et al. (1999) sugere que caso se separem os teleomorfos dos dois
274 grupos de *Cochliobolus*, *Bipolaris* poderia se restringir às espécies do primeiro grupo que
275 apresentam conídios maiores, em forma de canoa, levemente curvado ao longo de toda a
276 extensão do esporo, e *Curvularia* aquelas espécies do grupo 2.

277 Análises filogenéticas com outras regiões genômicas, podem contribuir ainda mais
278 para o conhecimento das relações filogenéticas destas espécies, uma vez que para se
279 aumentar a precisão de uma inferência filogenética pode-se incluir mais sequências aos
280 dados ou aumentar o comprimento das sequências utilizadas (Whelan et al., 2001).

281 Algumas questões sobre a sistemática deste grupo ainda continuam incertas, como a
282 posição taxonômica do gênero *Setosphaeria*. Na análise da região LSU, este gênero está
283 dentro do clado de *Cochliobolus* senso lato. Sivanesan (1987), em sua monografia,
284 reavaliou vinte espécies de *Exserohilum*, das quais sete foram relacionadas com
285 teleomorfos *Setosphaeria*. Destas, poucas espécies possuem sequências de DNA

286 disponíveis, sendo necessária a geração de sequências de outras espécies para se tentar
287 elucidar a taxonomia e sistemática deste gênero, o qual neste trabalho apareceu como um
288 clado único nas análises de ITS e *gpd*.

289 As análises filogenéticas dos isolados de *C. eragrostidis*, procedentes do nordeste
290 do Brasil, suportam que estes formam um clado com *C. clavata*, e estão próximos das
291 espécies *C. brachyspora*, *C. intermedia* e *C. oryzae*. Na monografia de Sivanesan (1987),
292 estas espécies apresentam morfologia de conídios semelhantes, e *C. eragrostidis* se
293 diferencia das demais por apresentar conídios retos, com o septo mediano mais espesso e
294 escuro. Tsuda & Ueyama (1985) relataram que *C. eragrostidis* pode ser diferenciada de *C.*
295 *brachyspora* e *C. intermedia* pela morfologia dos conídios, e que cruzamentos com
296 isolados típicos de cada espécie não resultou na formação de ascocarpos. No entanto,
297 cruzamentos de isolados *C. brachyspora* e *C. intermedia* foram férteis, sugerindo a
298 possível identidade das duas espécies. Desta forma, além das análises de filogenia
299 molecular, pode-se também utilizar o conceito de isolamento reprodutivo sexual, utilizando
300 cruzamento entre isolados monospóricos, para a limitação das espécies, pois a hibridação
301 interespecífica é rara ou difícil no gênero *Cochiobolus* (Hosokawa et al., 2003).

302 Trabalhos futuros visando resolver a correta delimitação das espécies devem ser
303 realizados, utilizando diferentes isolados das mesmas espécies e dados de múltiplos genes
304 heterogêneos, para se construir a árvore de espécies. Estas árvores especificam as relações
305 ancestrais (topologia), os tempos de separação das espécies ancestrais em duas espécies
306 (tempo de divergência), e a história do tamanho da população de cada espécie (Heled &
307 Drummond, 2009).

308

309 **Agradecimentos**

310 A primeira autora agradece à CAPES pela concessão de bolsa de estudo e à FACEPE pelo
311 auxílio mobilidade discente fornecido como complemento para a realização dos trabalhos.
312 Os autores agradecem a Braz da Hora-Júnior e ao Dr. Eduardo Mizubuti pela assistência
313 nas análises dos dados.

314

315 **Referências**

316

317 Andrew M, Peever TL, Pryor BM, 2009. An expanded multilocus phylogeny does not
318 resolve morphological species within the small-spored *Alternaria* species complex
319 *Mycologia* **101**, 95-109.

320 Andrieu RM, Schoch CL, Hedges R, Spatafora JW, Ciuffetti LM, 2008. Homologs of ToxB,
321 a host-selective toxin gene from *Pyrenophora tritici-repentis*, are present in the genome of
322 sister-species *Pyrenophora bromi* and other members of the Ascomycota. *Fungal Genetics*
323 *and Biology* **45**, 363-77.

324 Aveskamp MM, Gruyter J de, Murace MA, Perelló, A, Woudenberg JHC, Groenewald JZ,
325 Crous, PW, 2009. DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and
326 multiple taxonomic novelties. *Mycologia* **101**, 363-82.

327 Aveskamp MM, Gruyter J de, Woudenberg JHC, Verkley GJM, Crous, PW, 2010.
328 Highlights of the Didymellaceae: A polyphasic approach to characterise *Phoma* and related
329 pleosporalean genera. *Studies in Mycology* **65**, 1-60.

330 Bala K, Robideau GP, Désaulniers N, de Cock AWAM, Lévesque CA, 2010. Taxonomy,
331 DNA barcoding and phylogeny of three new species of *Pythium* from Canada. *Persoonia*
332 **25**, 22-31.

- 333 Berbee ML, Pirseyedi M, Hubbard S, 1999. *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of
334 known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate
335 dehydrogenase gene sequences. *Mycologia* **91**, 964-77.
- 336 Blair JE, Coffey MD, Park S-Y, Geiser DM, Kang S, 2008. A multi-locus phylogeny for
337 *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal*
338 *Genetics and Biology* **45**, 266-77.
- 339 Dela Paz MAG, Goodwin PH, Raymundo AK, Ardales EY, Vera Cruz CM, 2006.
340 Phylogenetic analysis based on ITS sequences and conditions affecting the type of conidial
341 germination of *Bipolaris oryzae*. *Plant Pathology* **55**, 756-65
- 342 Edgar RC, 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and
343 space complexity. *BMC Bioinformatics* **5**, 113.
- 344 Felsenstein J, 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood
345 approach. *Journal of Molecular Evolution* **17**, 368-76.
- 346 Ferreira ME, Grattapaglia D, 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em
347 análise genética. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN.
- 348 Goh T-K, Hyde KD, Lee DKL, 1998. Generic distinction in the *Helminthosporium-*
349 *complex* based on restriction analysis of the nuclear ribosomal RNA gene. *Fungal*
350 *Diversity* **1**, 85-107.
- 351 Gruyter J de, Aveskamp MM, Woudenberg JHC, Verkley GJM, Groenewald JZ, Crous
352 PW, 2009. Molecular phylogeny of *Phoma* and allied anamorph genera: Towards a
353 reclassification of the *Phoma* complex. *Mycological research* **113**, 508-19.
- 354 Gruyter J de, Woudenberg JHC, Aveskamp MM, Verkley GJM, Groenewald JZ, Crous
355 PW, 2010. Systematic reappraisal of species in *Phoma* section *Paraphoma*, *Pyrenochaeta*
356 and *Pleurophoma*. *Mycologia* **102**, 1066-81.

- 357 Hall T, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis
358 program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series **41**, 95-98.
- 359 Heled J, Drummond AJ, 2010. Bayesian inference of species trees from multilocus data.
360 Molecular Biology and Evolution **27**:570–80.
- 361 Holder M, Lewis PO, 2003. Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches.
362 Nature Reviews Genetics **4**, 275-84.
- 363 Hosokawa M, Tanaka C, Tsuda M, 2003. Conidium morphology of *Curvularia geniculata*
364 and allied species. Mycoscience **44**, 227-37.
- 365 Huelsenbeck JP, Ronquist F, Nielsen R, Bollback, JP, 2001. Bayesian inference of
366 phylogeny and its impact on evolutionary biology. Science **294**, 2310-14.
- 367 Jung T, Burgess TI, 2009. Re-evaluation of *Phytophthora citricola* isolates from multiple
368 woody hosts in Europe and North America reveals a new species, *Phytophthora plurivora*
369 sp. nov. Persoonia **22**, 95-110.
- 370 Jung T, Stukely MJC, Hardy GESTJ, White D, Paap T, Dunstan WA, Burgess TI, 2011.
371 Multiple new *Phytophthora* species from ITS Clade 6 associated with natural ecosystems
372 in Australia: evolutionary and ecological implications. Persoonia **26**, 13-39.
- 373 Kodsueb R, Dhanasekaran V, Aptroot A, Lumyong S, McKenzie EH, Hyde KD, Jeewon
374 R, 2006. The family Pleosporaceae: intergeneric relationships and phylogenetic
375 perspectives based on sequence analyses of partial 28S rDNA. Mycologia **98**, 571-83.
- 376 Kruys A, Eriksson OE, Wedin M, 2006. Phylogenetic relationships of coprophilous
377 Pleosporales (Dothideomycetes, Ascomycota), and the classification of some bitunicate
378 taxa of unknown position. Mycological Research **10**, 527-36.
- 379 Lu S-W, Kroken S, Lee B-N, Robertsse B, Churchill ACL, Yoder OC, Turgeon BG, 2003.
380 A novel class of gene controlling virulence in plant pathogenic ascomycete fungi.

- 381 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**,
382 5980-85.
- 383 Lumbsch HT, Lindemuth R, 2001. Major lineages of Dothideomycetes (Ascomycota)
384 inferred from SSU and LSU rDNA sequences. Mycological Research **105**, 901-08.
- 385 Moralejo E, Clemente A, Descals E, Belbahri L, Calmin G, Lefort F, Spies CFJ, McLeod
386 A, 2008. *Pythium recalcitrans* sp. nov. revealed by multigene phylogenetic analysis
387 Mycologia **100**, 310-19.
- 388 McLeod A, Botha WJ, Meitz JC, Spies CFJ, Tewoldemedhin YT, Mostert L, 2009.
389 Morphological and phylogenetic analyses of *Pythium* species in South Africa. Mycological
390 research **113**, 933-51.
- 391 Nylander JAA (2004) MrModeltest v 2.2. Program distributed by the author.
- 392 Obanor F, Erginbas-Orakci G, Tunali B, Nicol JM, Chakraborty S, 2010. *Fusarium*
393 *culmorum* is a single phylogenetic species based on multilocus sequence analysis. Fungal
394 Biology **114**, 753-65.
- 395 Padovan AC, Sanson GF, Brunstein A, Briones MR, 2005 Fungi evolution revisited:
396 application of the penalized likelihood method to a Bayesian fungal phylogeny provides a
397 new perspective on phylogenetic relationships and divergence dates of Ascomycota
398 groups. Journal of Molecular Evolution **60**, 726-35.
- 399 Posada D, Crandall KA, 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution.
400 Bioinformatics 14, 817-818.
- 401 Ronquist F, Huelsenbeck JP, 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under
402 mixed models. Bioinformatics **19**, 1572-74.
- 403 Santos, ES, 2002. Manejo sustentável da cultura do inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste do
404 Brasil. In: II Simpósio Nacional sobre as Culturas do Inhame e do Taro. Anais eletrônicos.
405 João Pessoa, PB: EMEPA-PB. Online [http://www.emepa.org.br/anais/an_sincit2_v1.php]

- 406 Sarmiento-Ramírez JM, Abella E, Martín MP, Tellería MT, López-Jurado LF, Marco A,
407 Diéguez-Uribeondo J, 2010. *Fusarium solani* is responsible for mass mortalities in nests of
408 loggerhead sea turtle, *Caretta caretta*, in Boavista, Cape Verde. FEMS Microbiology
409 Letters **312**, 192-200.
- 410 Scott JB, Chakraborty S, 2006. Multilocus sequence analysis of *Fusarium*
411 *pseudograminearum* reveals a single phylogenetic species. Mycological Research **110**,
412 1413-25.
- 413 Shimizu K, Tanaka C, Peng Y-L, Tsuda M, 1998. Phylogeny of *Bipolaris* inferred from
414 nucleotide sequences of Brn1, a reductase gene involved in melanin biosynthesis. Journal of
415 General and Applied Microbiology **44**, 251-58.
- 416 Sivanesan A, 1987. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*,
417 *Exserohilum* and their teleomorphs. Mycological Papers **158**, 1-261.
- 418 Swofford DL, 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other
419 Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- 420 Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics
421 Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution **24**, 1596-1599.
- 422 Tsuda M, Ueyama A, 1981. *Pseudocochliobolus australiensis* the ascigerous state of
423 *Bipolaris australiensis*. Mycologia **73**, 88-96.
- 424 Tsuda M, Ueyama A, 1982. *Pseudocochliobolus verruculosus* and variability of conidium
425 morphology. Mycologia **74**, 563-68.
- 426 Tsuda M, Ueyama A, 1983. *Pseudocochliobolus pallescens* and variability of conidium
427 morphology. Memoirs of the College Agriculture Kyoto University **122**, 85-91.
- 428 Tsuda M, Ueyama A, 1985. Two new *Pseudocochliobolus* and a new species of
429 *Curvularia*. Transactions of the Mycological Society of Japan **26**, 321-30.

- 430 Tsuda M, Ueyama A, Nishihara N, 1977. *Pseudocochliobolus nisikadoi*, the perfect state
431 of *Helminthosporium coicis*. Mycologia **69**, 1109-20.
- 432 Whelan S, Liò P, Goldman N, 2001. Molecular phylogenetics: State-of-the art methods for
433 looking into the past. Trends in Genetics **17**, 262-72.
- 434 White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal
435 ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky, J. J, White
436 TJ (Eds). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, New York: Academic
437 Press Inc., 315-22.
- 438 Van Wyk M, Wingfield BD, Mohali S, Wingfield MJ, 2009. *Ceratocystis fimbriatomima*, a
439 new species in the *C. fimbriata sensu lato* complex isolated from Eucalyptus trees in
440 Venezuela. Fungal Diversity **34**, 173-83.
- 441 Van Wyk M, Wingfield BD, Marin M, Wingfield MJ, 2010. New *Ceratocystis* species
442 infecting coffee, cacao, citrus and native trees in Colombia. Fungal Diversity **40**, 103-17.
- 443 Vilgalys R, Hester M, 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically
444 amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. Journal of Bacteriology,
445 **172**, 4238-46.
- 446 Zhang Y, Schoch CL, Fournier J, Crous PW, Gruyter Jde, Woudenberg JHC, Hirayama K,
447 Tanaka K, Pointing SB, Spatafora JW, Hyde KD, 2009. Multi-locus phylogeny of
448 Pleosporales: a taxonomic, ecological and evolutionary re-evaluation. Studies in Mycology
449 **64**, 85-102.
- 450

Tabela 1: Lista de táxons utilizados neste estudo, com seus isolados, número de acesso no Genbank e depositante.

Teleomorfo	Anamorfo	Isolado	Número de acesso			Depositante (Referência)
			ITS	GPD	LSU	
Teleomorfo desconhecido	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	EGSimmons 34-016	AF071346	AF081400	-	Berbee (Berbee et al., 1999)
Teleomorfo desconhecido	<i>Bipolaris australis</i> Alcorn	Turgeon 77139	AF081448	AF081409	-	Berbee (Berbee et al., 1999)
Teleomorfo desconhecido	<i>Bipolaris crustacea</i> (Henn.) Alcorn	NI*	-	-	AF163977	Goh e Hyde (Não publicado)
Teleomorfo desconhecido	<i>Bipolaris indica</i> J.N. Rai, Wadhvani & J.P. Tewari	BRIP17439	AF081449	AF081406	-	Berbee (Berbee et al., 1999)
Teleomorfo desconhecido	<i>Bipolaris papendorfii</i> (Aa) Alcorn	NI	-	-	AF163980	Goh e Hyde (Kodsueb et al., 2006)
Teleomorfo desconhecido	<i>Bipolaris zaeae</i> Sivan.	Alcorn 8641a	AF081452	AF081407	-	Berbee (Berbee et al., 1999)
<i>Cochliobolus australiensis</i> (Tsuda & Ueyama) Alcorn	<i>Bipolaris australiensis</i> (M.B. Ellis) Tsuda & Ueyama	Alcorn 8320b	AF081450	AF081408	-	Berbee (Berbee et al., 1999)
<i>Cochliobolus carbonum</i> R.R. Nelson	<i>Bipolaris zeicola</i> (G.L. Stout) Shoemaker	Leonard NI1243	AF071326	AF081382	-	Berbee (Berbee et al., 1999)
<i>Cochliobolus cymbopogonis</i> J.A. Hall & Sivan.	<i>Curvularia cymbopogonis</i> (C.W. Dodge) J.W. Groves & Skolko	Alcorn 88109-1	AF071351	AF081403	-	Berbee (Berbee et al., 1999)
<i>Cochliobolus cynodontis</i> R.R. Nelson	<i>Bipolaris cynodontis</i> (Marignoni) Shoemaker	NI	-	-	AF163982	Goh e Hyde (Kodsueb et al., 2006)
<i>Cochliobolus dactyloctenii</i> Alcorn	<i>Bipolaris dactyloctenii</i> Alcorn	Alcorn 7938-9	AF071322	AF081376	-	Berbee (Berbee et al., 1999)
<i>Cochliobolus eleusines</i> Alcorn	<i>Bipolaris eleusines</i> Alcorn & R.G. Shivas	Alcorn 8749c	AF081451	AF081405	-	Berbee (Berbee et al., 1999)

Cont. da Tabela 1.

Teleomorfo	Anamorfo	Isolado	Número de acesso			Depositante (Referência)
			ITS	GPD	LSU	
<i>Cochliobolus ellisii</i> Alcorn	<i>Bipolaris ellisii</i> (Danquah) Alcorn	Alcorn 81154-1	AF071323	AF081377	-	Berbee (Berbee et al., 1999)
<i>Cochliobolus eragrostidis</i> (Tsuda & Ueyama) Sivan.	<i>Curvularia eragrostidis</i>	ZGZ990780	HM053668	HM053657	-	Wang, Zhang e Tsukiboshi (Não publica do)
<i>Cochliobolus eragrostidis</i>	<i>Curvularia eragrostidis</i>	NI	-	-	AF163983	Goh e Hyde (Não publicado)
<i>Cochliobolus eragrostidis</i>	<i>Curvularia eragrostidis</i>	2479	**	**		
<i>Cochliobolus eragrostidis</i>	<i>Curvularia eragrostidis</i>	2485	**	**	**	
<i>Cochliobolus eragrostidis</i>	<i>Curvularia eragrostidis</i>	2499	**	**		
<i>Cochliobolus eragrostidis</i>	<i>Curvularia eragrostidis</i>	2507	**	**		
<i>Cochliobolus eragrostidis</i>	<i>Curvularia eragrostidis</i>	2527	**	**		
<i>Cochliobolus eragrostidis</i>	<i>Curvularia eragrostidis</i>	2541	**	**		
<i>Cochliobolus eragrostidis</i>	<i>Curvularia eragrostidis</i>	2554	**	**		
<i>Cochliobolus eragrostidis</i>	<i>Curvularia eragrostidis</i>	2576	**	**		
<i>Cochliobolus eragrostidis</i>	<i>Curvularia eragrostidis</i>	2584	**	**		
<i>Cochliobolus eragrostidis</i>	<i>Curvularia eragrostidis</i>	2601	**	**		
<i>Cochliobolus eragrostidis</i>	<i>Curvularia eragrostidis</i>	2615	**	**		
<i>Cochliobolus eragrostidis</i>	<i>Curvularia eragrostidis</i>	2630	**	**		
<i>Cochliobolus eragrostidis</i>	<i>Curvularia eragrostidis</i>	2639	**	**		
<i>Cochliobolus eragrostidis</i>	<i>Curvularia eragrostidis</i>	2855	**	**		
<i>Cochliobolus eragrostidis</i>	<i>Curvularia eragrostidis</i>	2870	**	**		
<i>Cochliobolus eragrostidis</i>	<i>Curvularia eragrostidis</i>	2888	**	**		

Cont. da Tabela 1.

Teleomorfo	Anamorfo	Isolado	Número de acesso			Depositante (Referência)
			ITS	GPD	LSU	
<i>Cochliobolus hawaiiensis</i> Alcorn	<i>Bipolaris hawaiiensis</i> (M.B. Ellis) J.Y. Uchida & Aragaki	Alcorn 7612(b)-6	AF071324	AF081378	-	Berbee (Berbee et al., 1999)
<i>Cochliobolus hawaiiensis</i>	<i>Bipolaris hawaiiensis</i>	NI	-	-	AF163979	Goh e Hyde (Kodsueb et al., 2006)
<i>Cochliobolus heliconiae</i> Alcorn	<i>Bipolaris heliconiae</i> Alcorn	NI	-	-	AF163978	Goh e Hyde (Não publicado)
<i>Cochliobolus heterostrophus</i> (Drechsler) Drechsler	<i>Bipolaris maydis</i> (Y. Nisik. & C. Miyake) Shoemaker	C4	EF452445	EF513207	-	Andrie, Schoch, Hedges, Spatafora e Ciuffetti (Andrie et al., 2008)
<i>Cochliobolus heterostrophus</i>	<i>Bipolaris maydis</i>	Yoder C5 (141-1-2)	AF071325	AF081380	-	Berbee (Berbee et al., 1999)
<i>Cochliobolus heterostrophus</i>	<i>Bipolaris maydis</i>	AFTOL-ID 54	-	-	AY544645	AFTOL (Zhang et al., 2009)
<i>Cochliobolus homomorphus</i> Luttr. & Rogerson	<i>Bipolaris homomorpha</i> (Luttr. & Rogerson) Subram. ex Alcorn	ATCC 13409	EF452446	EF513208	-	Andrie, Schoch, Hedges, Spatafora e Ciuffetti (Andrie et al., 2008)
<i>Cochliobolus intermedius</i> R.R. Nelson	<i>Curvularia intermedia</i> Boedijn	Alcorn 8797-1	AF071327	AF081383	-	Berbee (Berbee et al., 1999)
<i>Cochliobolus kusanoi</i> (Y. Nisik.) Drechsler ex Dastur	<i>Bipolaris kusanoi</i> (Y. Nisik.) Shoemaker	Tsuda Ck2	AF071352	AF081404	-	Berbee (Berbee et al., 1999)
<i>Cochliobolus lunatus</i> R.R. Nelson & F.A. Haasis	<i>Curvularia lunata</i> (Wakker) Boedijn	UAMH 1349	AF071339	AF081394	-	Berbee (Berbee et al., 1999)
<i>Cochliobolus luttrellii</i> Alcorn	<i>Bipolaris luttrellii</i> Alcorn	Alcorn 14643-1	AF071350	AF081402	-	Berbee (Berbee et al., 1999)
<i>Cochliobolus melinidis</i> Alcorn	<i>Bipolaris melinidis</i> Alcorn	Alcorn 8795-6	AF071319	AF081373	-	Berbee (Berbee et al., 1999)

Cont. da Tabela 1.

Teleomorfo	Anamorfo	Isolado	Número de acesso			Depositante (Referência)
			ITS	GPD	LSU	
<i>Cochliobolus nisikadoi</i> (Tsuda, Ueyama & Nishih.) Alcorn	<i>Bipolaris coicis</i> (Y. Nisik.) Shoemaker	CBS 192.29	AF081447	AF081410	-	Berbee (Berbee et al., 1999)
<i>Cochliobolus nodulosus</i> Luttr.	<i>Bipolaris nodulosa</i> (Berk. & M.A. Curtis) Shoemaker	ICMP10306	-	-	AY849940	Kodsueb, Jeewon e Hyde (Kordsueb et al., 2006)
<i>Cochliobolus pallescens</i> (Tsuda & Ueyama) Sivan.	<i>Curvularia pallescens</i> Boedijn 1933	ICMP11023	-	-	AY849941	Kodsueb, Jeewon e Hyde (Kordsueb et al., 2006)
<i>Cochliobolus peregianensis</i> Alcorn	<i>Bipolaris peregianensis</i> Alcorn	Alcorn 7656-3	AF071328	AF081384	-	Berbee (Berbee et al., 1999)
<i>Cochliobolus perotidis</i> Alcorn	<i>Bipolaris perotidis</i> Alcorn	Alcorn 7846-2	AF071320	AF081374	-	Berbee (Berbee et al., 1999)
<i>Cochliobolus ravenelii</i> Alcorn	<i>Bipolaris ravenelii</i> (M.A. Curtis) Shoemaker	Alcorn 7979-6	AF071321	AF081375	-	Berbee (Berbee et al., 1999)
<i>Cochliobolus sativus</i> (S. Ito & Kurib.) Drechsler ex Dastur	<i>Bipolaris sorokiniana</i> (Sacc.) Shoemaker	AFTOL-ID 271	-	-	DQ678045	Schoch (Zhang et al., 2009)
<i>Cochliobolus sativus</i>	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	Tinline A20	AF071329	AF081385	-	Berbee (Berbee et al., 1999)
<i>Cochliobolus verruculosus</i> (Tsuda & Ueyama) Sivan.	<i>Curvularia verruculosa</i> Tandon & Bilgrami ex M.B. Ellis	MAFF 235540	AF071333	AF081388	-	Berbee (Berbee et al., 1999)
<i>Cochliobolus verruculosus</i>	<i>Curvularia verruculosa</i>	ZTY98400	HM053661	HM053648	-	Wang, Zhang e Tsukiboshi (Não publicado)
<i>Cochliobolus victoriae</i> R.R. Nelson	<i>Bipolaris victoriae</i> (F. Meehan & H.C. Murphy) Shoemaker	Macko HV033	AF071331	AF081386	-	Berbee (Berbee et al., 1999)
Teleomorfo desconhecido	<i>Curvularia affinis</i> Boedijn	DAOM 46365	AF071335	AF081390	-	Berbee (Berbee et al., 1999)
Teleomorfo desconhecido	<i>Curvularia brachyspora</i> Boedijn	ZW020185	HM053667	HM053655	-	Wang, Zhang e Tsukiboshi (Não publicado)

Cont. da Tabela 1.

Teleomorfo	Anamorfo	Isolado	Número de acesso			Depositante (Referência)
			ITS	GPD	LSU	
Teleomorfo desconhecido	<i>Curvularia brachyspora</i> Boedijn	ZW020644	HM053666	HM053654	-	Wang, Zhang e Tsukiboshi (Não publicado)
Teleomorfo desconhecido	<i>Curvularia brachyspora</i> Boedijn	NI	-	-	AF279380	Lutzoni e Reeb (Kodsueb et al., 2006)
Teleomorfo desconhecido	<i>Curvularia clavata</i>	DAOM 148084	AF071336	AF081391	-	Berbee (Berbee et al., 1999)
Teleomorfo desconhecido	<i>Curvularia inaequalis</i> (Shear) Boedijn	ZM020029	HM053665	HM053653	-	Wang, Zhang e Tsukiboshi (Não publicado)
Teleomorfo desconhecido	<i>Curvularia gladioli</i> Boerema & Hamers	DAOM 164725	AF071337	AF081392	-	Berbee (Berbee et al., 1999)
Teleomorfo desconhecido	<i>Curvularia gudauskasii</i> Morgan-Jones & Karr	DAOM 165085	AF071338	AF081393	-	Berbee (Berbee et al., 1999)
<i>Lewia eureka</i> E.G. Simmons	<i>Embellisia eureka</i> (E.G. Simmons) E.G. Simmons	AFTOL-ID 267	-	-	DQ678044	Schoch (Zhang et al., 2009)
Teleomorfo desconhecido	<i>Phoma sclerotoides</i> Preuss ex Sacc.	SK 7-12	HM589500	HM158042	-	Wunsch e Bergstrom (Não publicado)
<i>Pleospora herbarum</i> P. Karst.	<i>Stemphylium herbarum</i> E.G. Simmons	CBS 191.86	-	-	AF382386	Jeewon, Liew, Hodgkiss, Hyde (Kodsueb et al., 2006)
<i>Pleospora tarda</i> E.G. Simmons	<i>Stemphylium botryosum</i> Wallr.	EGSimmons 08-069	AF071345	AF081399	-	Berbee (Berbee et al., 1999)
<i>Pleospora alfalfae</i> E.G. Simmons	<i>Stemphylium alfalfae</i> E.G. Simmons	EGSimmons 36-088	AF071343	AF081397	-	Berbee (Berbee et al., 1999)
<i>Pyrenophora avenae</i> S. Ito & Kurib	<i>Drechslera avenae</i> (Eidam) Scharif	94-1b	EF452453	EF513215	-	Andrie, Schoch, Hedges, Spatafora e Ciuffetti (Andrie et al., 2008)

Cont. da Tabela 1.

Teleomorfo	Anamorfo	Isolado	Número de acesso			Depositante (Referência)
			ITS	GPD	LSU	
<i>Pyrenophora chaetomioides</i> (M.A. Curtis ex Cooke) Shoemaker	<i>Drechslera avenacea</i> (M.A. Curtis ex Cooke) Shoemaker	DAOM 208989	AF081445	AF081371	-	Berbee (Berbee et al., 1999)
<i>Pyrenophora japonica</i> S. Ito & Kurib.	<i>Drechslera japonica</i> (S. Ito & Kurib.) Shoemaker	DAOM 169286	AF071347	AF081369	-	Berbee (Berbee et al., 1999)
<i>Pyrenophora seminiperda</i> (Brittleb. & D.B. Adam) Shoemaker	<i>Drechslera verticillata</i> (O'Gara) Shoemaker	ICMP6169	-	-	AY849961	Kodsueb, Jeewon e Hyde (Kodsueb et al., 2006)
<i>Pyrenophora tritici-repentis</i> (Died.) Drechsler	<i>Drechslera tritici-repentis</i> (Died.) Shoemaker	DAOM 208990	AF071348	AF081370	-	Berbee (Berbee et al., 1999)
<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	<i>Drechslera tritici-repentis</i>	DAOM 197047	-	-	DQ384097	Kruys, Eriksson e Wedin (Kruys et al., 2006)
<i>Setosphaeria minor</i> Alcorn	Anamorfo desconhecido	ATCC 62323	AF071341	AF081396	-	Berbee (Berbee et al., 1999)
<i>Setosphaeria monoceras</i> Alcorn	<i>Exserohilum monoceras</i> (Drechsler) K.J.Leonard & Suggs	DAOM 208988	AF071340	AF081395	-	Berbee (Berbee et al., 1999)
<i>Setosphaeria monoceras</i>	<i>Exserohilum monoceras</i>	NI	-	-	AY016368	Lumbsch e Lindemuth (Lumbsch & Lindemuth, 2001)
<i>Setosphaeria rostrata</i> K.J. Leonard	Anamorfo desconhecido	ATCC 32197	AF071342	AF081379	-	Berbee (Berbee et al., 1999)

*NI = Não informado.

** Sequências a serem depositadas no genbank.

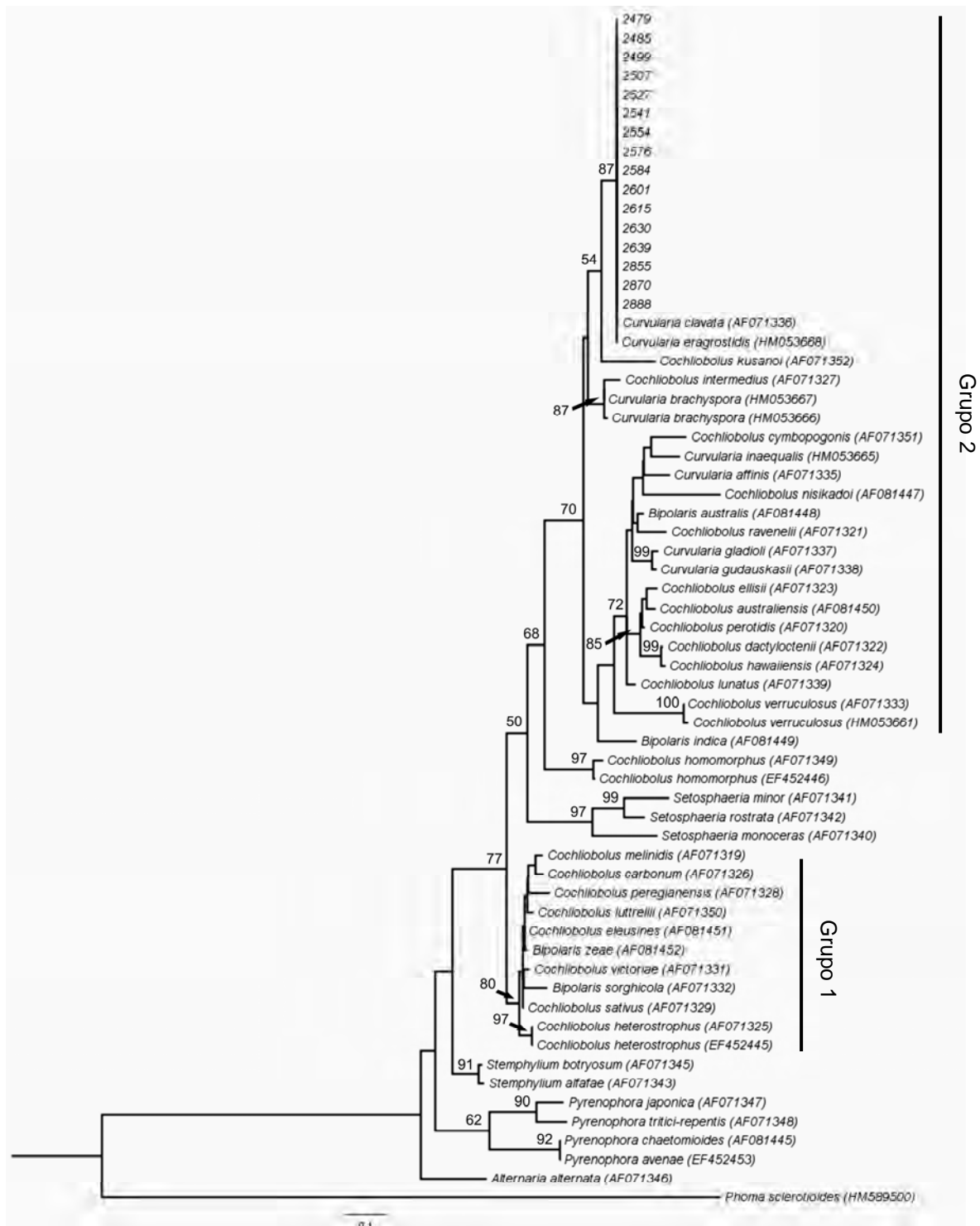


Figura 1: Árvore de máxima verossimilhança gerada com a região ITS de 63 táxons. Os números acima dos nós correspondem aos valores de *bootstrap* obtido em 1000 réplicas.

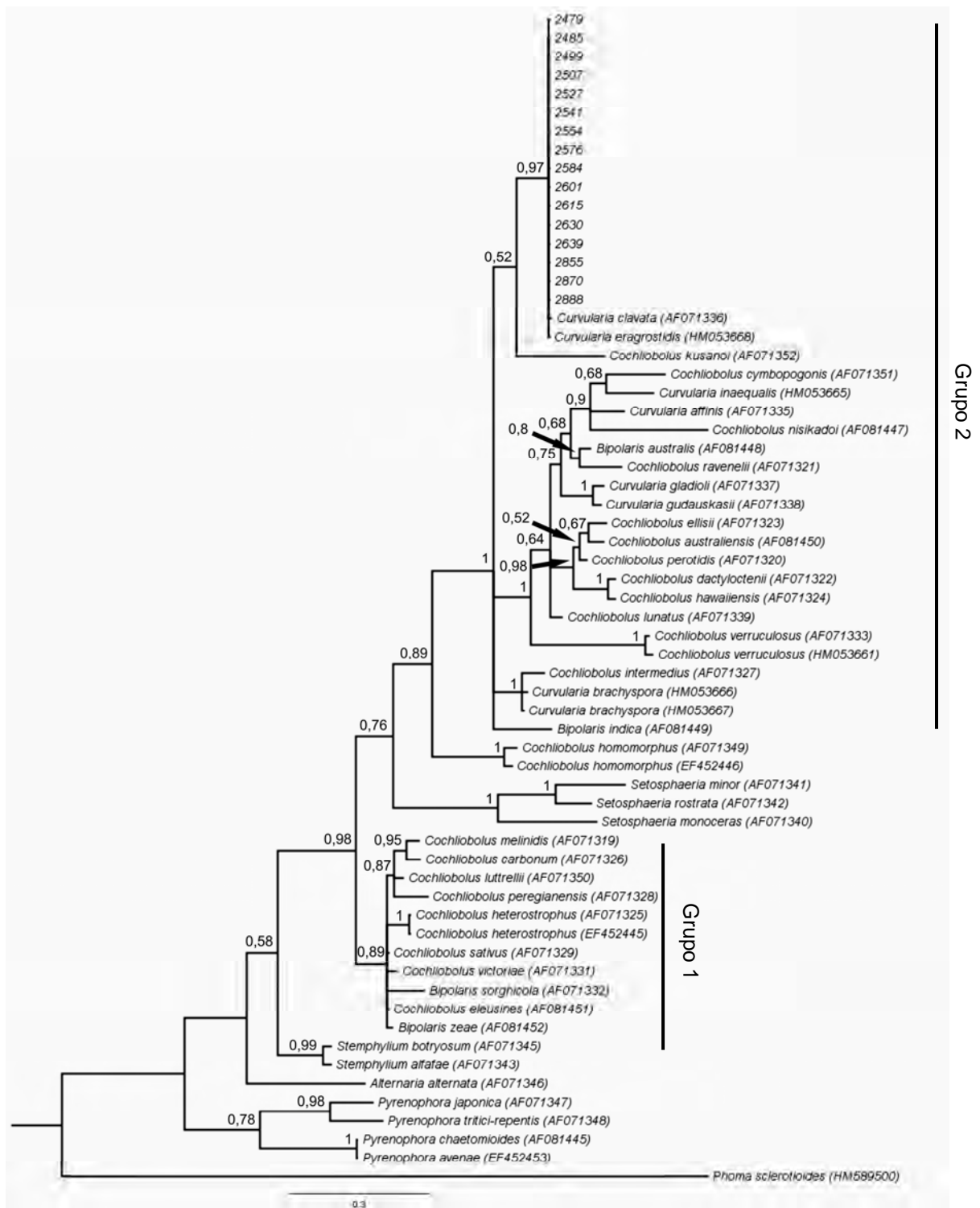


Figura 2: Árvore consenso obtida pela análise Bayesiana com dados de sequências da região ITS de 63 táxons. Os números acima dos nós correspondem aos valores de probabilidades *a posteriori*.

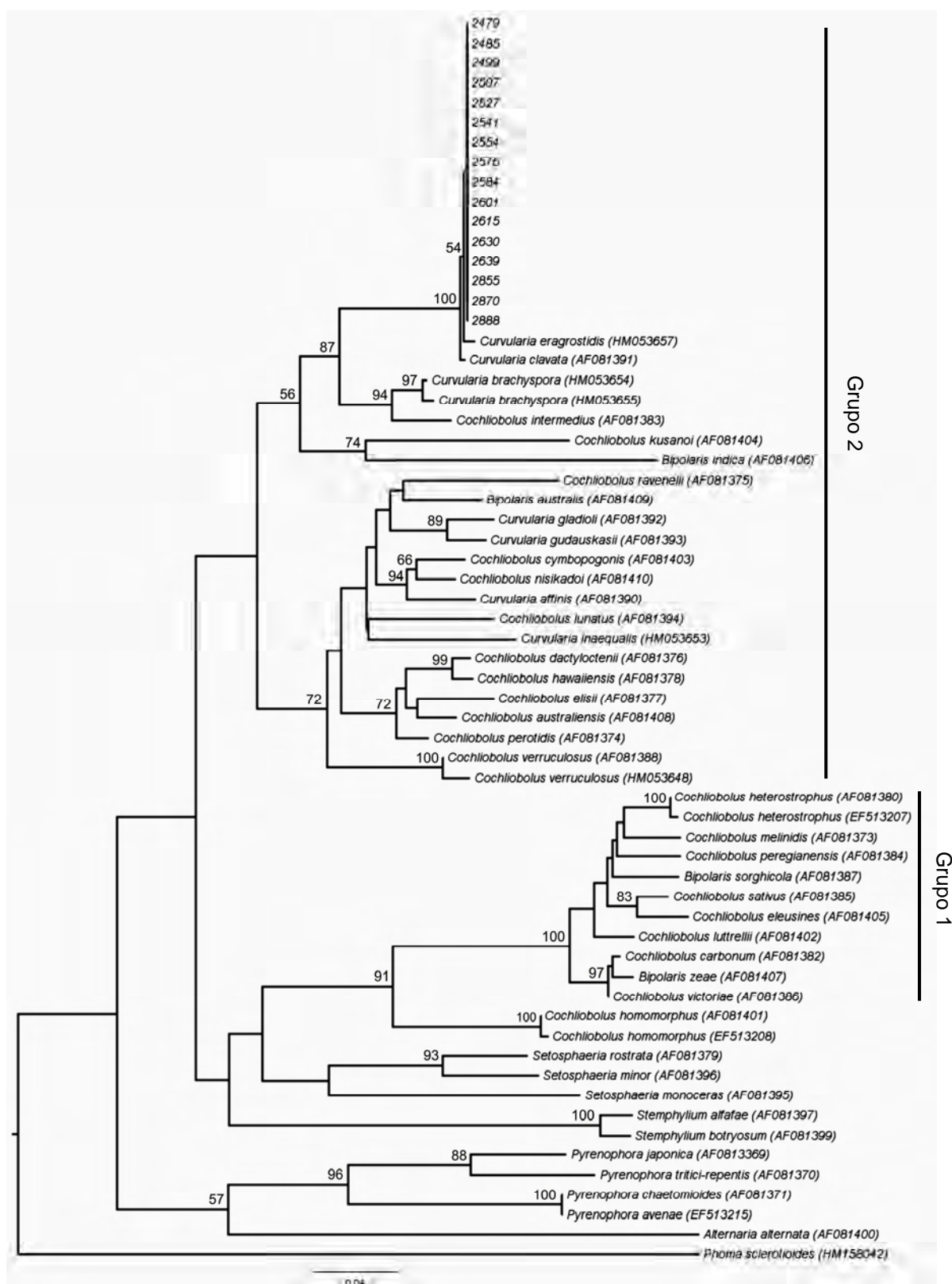


Figura 3: Árvore de máxima verossimilhança gerada com parte do gene *gpd* de 63 táxons. Os números acima dos nós correspondem aos valores de *bootstrap* obtido em 1000 réplicas.

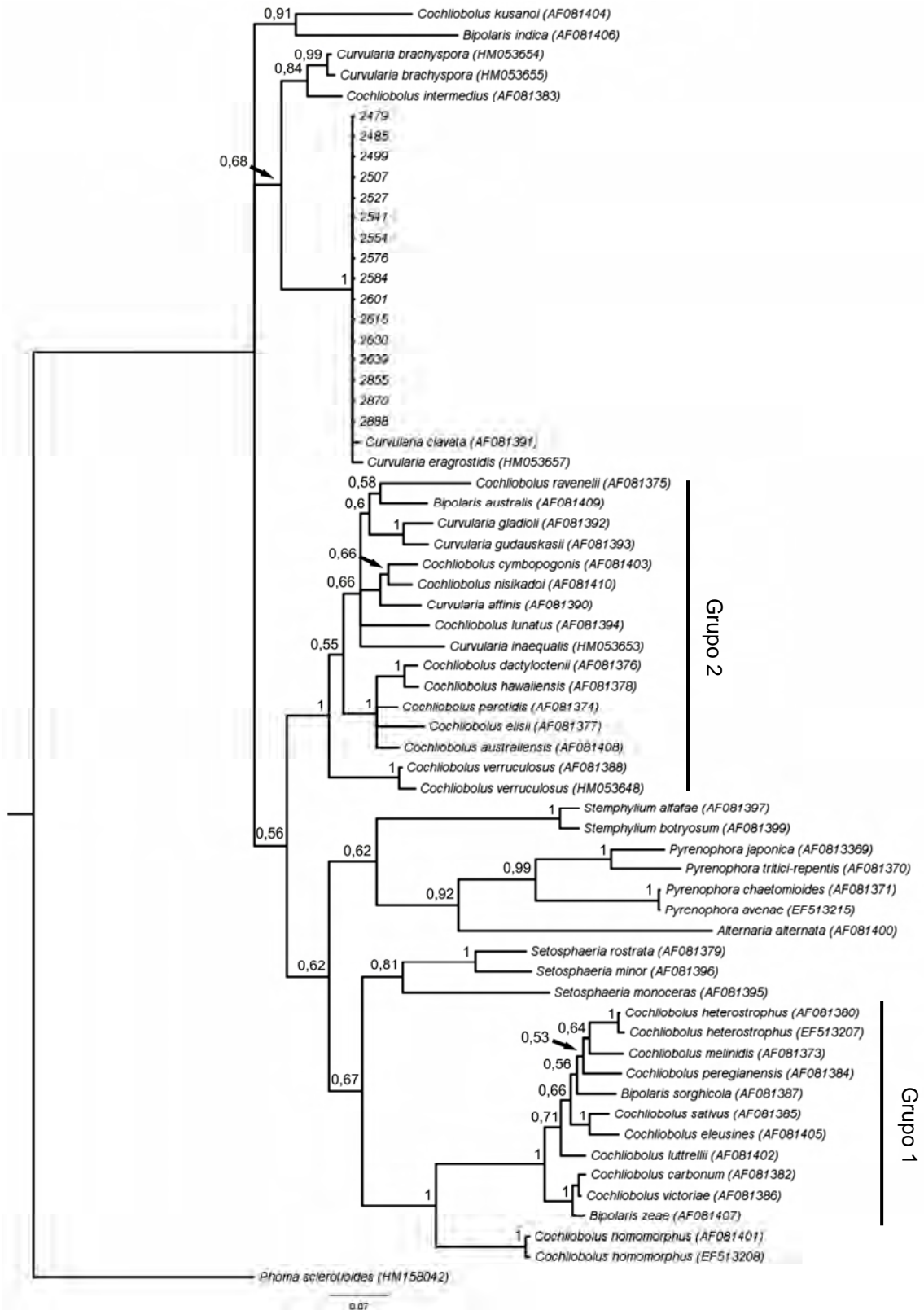


Figura 4: Árvore consenso obtida pela análise Bayesiana com dados de sequências do gene *gpd* de 63 táxons. Os números acima dos nós correspondem aos valores de probabilidades *a posteriori*.

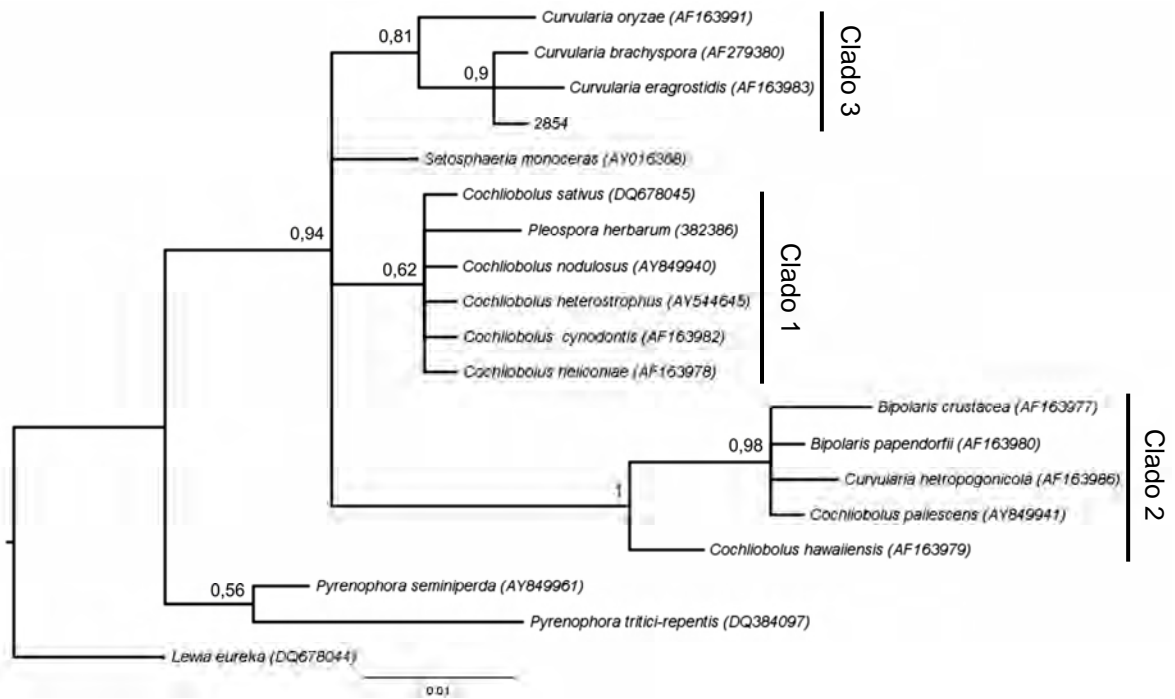


Figura 5: Árvore consenso obtida pela análise Bayesiana com dados de sequências da região LSU de 19 táxons. Os números acima dos nós correspondem aos valores de probabilidades *a posteriori*.

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

- ❖ A população de *Curvularia eragrostidis* patogênicas ao inhame, nos Estados de Alagoas, Pernambuco e Paraíba, é caracterizada pela baixa diversidade genética, fluxo de indivíduos entre as áreas de cultivo e provável ausência de reprodução sexuada, podendo ser classificada como de risco evolutivo intermediário.
- ❖ *Curvularia eragrostidis* está mais próxima filogeneticamente de *C. clavata*, *C. brachyspora*, *C. intermedia* e *C. oryzae*, pertencendo ao grupo correspondente às espécies do antigo gênero *Pseudocochliobolus*.
- ❖ As análises filogenéticas suportam evidências de divisão do gênero *Cochliobolus* em dois grandes grupos referentes a duas linhagens evolutivas.
- ❖ É necessário obter sequências adicionais de mais espécies de *Bipolaris*, *Curvularia* e *Exserohilum* para se tentar elucidar a taxonomia e sistemática destes gêneros, com a separação e validação dos teleomorfos.