

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS  
CURSO DE MESTRADO**

**ESTRUTURA GENÉTICA DE ISOLADOS DO FUNGO CAUSADOR DA  
SIGATOKA AMARELA EM BANANEIRA**

**YSLAI SILVA PEIXOUTO**

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA  
MAIO 2013**

# **ESTRUTURA GENÉTICA DE ISOLADOS DO FUNGO CAUSADOR DA SIGATOKA AMARELA EM BANANEIRA**

**YSLAI SILVA PEIXOUTO**

Bióloga  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2010

Dissertação submetida ao Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

**Orientador: Dr. EDSON PERITO AMORIM**

**Co-Orientador: Dra. CLÁUDIA FORTES FERREIRA**

**Co-Orientador: Dr. FERNANDO HADDAD**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
MESTRADO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS  
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA - 2013

## FICHA CATALOGRÁFICA

P377 Peixoto, Yslai Silva.  
Estrutura genética de isolados do fungo causador da sigatoka-amarela em bananeira / Yslai Silva Peixoto. \_ Cruz das Almas, BA, 2013.  
70f.; il.

Orientador: Edson Perito Amorim.  
Coorientador: Cláudia Fortes Ferreira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Mal de Sigatoka – Banana. 3.Fungos fitopatogênicos – Controle. 3.Marcador genético. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Haddad, Fernando. III.Título.

CDD: 632.3

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS  
CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE  
YSLAI SILVA PEIXOUTO**

---

Prof. Dr. Edson Perito Amorim  
Embrapa Mandioca e Fruticultura - CNPMF  
(Orientador)

---

Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira  
Embrapa Mandioca e Fruticultura - CNPMF

---

Dra. Karina Peres Gramacho  
Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira - CEPEC

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais em .....

Conferindo o Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais em .....

*'O SENHOR é o meu pastor, nada me faltará. Deitar-me faz em verdes pastos, guia-me mansamente a águas tranquilas. Refrigerera a minha alma; guia-me pelas veredas da justiça, por amor do seu nome. Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum, por que tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam. Preparas uma mesa perante mim na presença dos meus inimigos, unges a minha cabeça com óleo, o meu cálice transborda. Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da minha vida; e habitarei na casa do SENHOR por longos dias. '*

Salmos 23:1-6

*'Amigos são anjos que nos deixam em pé quando nossas asas têm problemas em se lembrar como voar. '*

Silene B. Ayub

Aos meus pais Jorge e Ysnarkaio, cujo valor e princípios foram essenciais para minha formação moral, por todo seu incentivo, perseverança, na certeza que o seu apoio foi fundamental para a concretização desta etapa em minha vida.

## **DEDICO**

A Leandro, amor da minha vida, meu marido, companheiro, amigo, amante. Você é uma luz no meu caminho e meu grande incentivador. E ao presente mais maravilhoso que Deus me deu, minha princesa Ysali! Amo vocês!

## **OFEREÇO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela minha existência, por me conduzir sempre no caminho certo. Presença constante em minha vida, fortalecendo-me principalmente nos momentos mais difíceis.

A Nossa Senhora do Bom Sucesso, que me amparou no seu colo de mãe nos momentos mais difíceis durante a realização deste trabalho e em toda minha vida.

Aos meus pais, Jorge e Ysnarkai, que sempre me apoiaram em minha vida acadêmica, pelo amor e confiança, agradeço pelos ensinamentos, criação e formação do meu caráter. Ao meu irmão Farley, pelo apoio e confiança que sempre depositou em mim.

Aos amores da minha vida, Ysali e Leandro, meus tesouros. Minha princesa e meu amor sempre me motivando, me apoiando e me fortalecendo com seu amor.

Ao meu orientador, Dr. Edson Perito Amorim, pela oportunidade, ensinamentos, conselhos e orientação, contribuindo para meu desenvolvimento pessoal e intelectual.

Aos meus co-orientadores, Dra. Cláudia Fortes Ferreira e Dr. Fernando Haddad, por compartilharem o seu saber, pelo apoio, incentivo, contribuindo para a minha formação acadêmica.

Ao Dr. Ricardo Franco Cunha Moreira, pelo apoio e amizade, incentivo, auxílio nas análises e conselhos.

Ao Dr. Saulo Oliveira, pelos ensinamentos contribuindo com o desenvolvimento do trabalho.

Ao Dr. Zilton José Maciel Cordeiro, pelos ensinamentos, ética e acessibilidade em todos os momentos.

Aos funcionários do Laboratório de Biologia Molecular, Fernanda, Vanderson e, em especial, Raimundão, 'Sr. Raimundo'; e do Laboratório de Fitopatologia, Eliane e Paulo, que contribuíram me ensinando a parte prática do trabalho, essencial para a realização do mesmo.

A toda equipe do Laboratório de Práticas Culturais, pelo apoio na coleta dos materiais, especialmente aos funcionários Raimundo “Bizunga” e Rafael.

A Wilma Brandão de Andrade, pela amizade, torcida e apoio na execução dos trabalhos.

Aos meus tios e tias, que contribuíram me fortalecendo com palavras de incentivo durante a realização desta etapa na minha vida.

A minha sogra Edna, cunhada Livia e sobrinhos Alexandre e Tiago, pela torcida e incentivo, sempre acreditando no meu potencial.

Às amigas do laboratório de Biologia Molecular e Fitopatologia, pelo apoio e incentivo: Janáira, Shirley, Rafaela, Gilmara, Marciene, Dalma, Cátia, Naíra.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, pela disponibilidade em fornecer informações, por compartilhar seus conhecimentos.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura, pela disponibilidade do espaço físico, possibilitando a realização dos trabalhos do curso de Pós-Graduação.

Aos meus amigos técnicos da UFRB, Laura Xavier, Valber ‘Bob’, Carolina Yamamoto, Maria Carolina, Rodrigo, Vitória, Verônica, Zozilene, Ronaldo, Luana, que me apoiaram e incentivaram a alcançar a realização desse sonho.

Às minhas amigas Gisella Martha, Leila, Eliane ‘Verinha’, Eliana, que mesmo com a distância me apoiaram e incentivaram com sua amizade e carinho.

Aos vigilantes da Embrapa/CNPMF, Max, Rogério, Evandro, Bruno pelo cuidado e atenção.

A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, por ter me concedido a oportunidade de cursar o mestrado.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, que oraram por mim e pela minha família, que torceram e me incentivaram, o meu muito obrigada!



## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1. REVISÃO DE LITERATURA.....   | 12 |
| 1.1. A cultura.....   | 12 |
| 1.2. A doença.....  | 13 |
| 1.3. O patógeno.....  | 15 |
| 1.4. Biologia de populações.....  | 16 |
| 1.5. Variabilidade genética de <i>M. musicola</i> .....   | 19 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 20 |
| <br>  |    |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS.....  | 29 |
| 2.1. Coleta de amostras.....  | 29 |
| 2.2. Obtenção dos isolados.....   | 29 |
| 2.3. Preservação dos isolados de <i>M. musicola</i> .....   | 32 |
| 2.4. Estimativa da variabilidade genética e estrutura populacional entre isolados de <i>M. musicola</i> ..... | 34 |
| 2.4.1. Extração de DNA e condições de PCR.....  | 34 |
| 2.4.2. Amplificação dos <i>primers</i> SSR.....   | 34 |
| 2.4.3. Amplificação dos primers ISSR.....   | 35 |
| 2.4.4. Variabilidade genética.....  | 37 |
| 2.4.5. Estrutura populacional.....  | 37 |
| 2.5. Teste de patogenicidade.....   | 38 |
| <br>  |    |
| 3. RESULTADOS.....  | 40 |
| 3.1. Primers SSR.....   | 41 |
| 3.2. Primers ISSR.....  | 45 |
| 3.3. Primers combinados (SSR/ISSR).....   | 50 |
| 3.4. Teste de patogenicidade.....   | 55 |
| <br>  |    |
| 4. DISCUSSÃO.....   | 56 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 63 |
| <br>  |    |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS.....   | 68 |

# ESTRUTURA GENÉTICA DE ISOLADOS DO FUNGO CAUSADOR DA SIGATOKA AMARELA EM BANANEIRA

Autora: Yslai Silva Peixoto

Orientador: Edson Perito Amorim

Co-Orientadores: Cláudia Fortes Ferreira e Fernando Haddad

## RESUMO:

Dentre as principais doenças que afetam a bananeira está a Sigatoka-amarela, causada pelo fungo *Mycosphaerella musicola* Leach. O objetivo do trabalho foi estudar a diversidade genética e estrutura populacional do fungo *M. musicola* nas principais regiões produtoras de banana, assim como verificar se a estrutura populacional está correlacionada com a origem geográfica. Para isto, foram avaliados 83 isolados coletados nos Estados da Bahia (BA), Rio Grande do Norte (RN) e Minas Gerais (MG) por meio dos marcadores SSR, ISSR e pela combinação dos dois (SSR/ISSR). De acordo com a AMOVA, para as três análises ocorreu maior variação genética entre os haplótipos dentro de municípios, em que apenas com o uso dos ISSR não foi significativo. Alta variabilidade foi detectada entre os isolados, com os *primers* combinados observou-se 100% haplótipos distintos, com os SSR 98,79 % de haplotipos únicos e com os ISSR foram 83,13 % haplótipos diferentes. Em relação à composição genética com base no agrupamento Bayesiano, notou-se a presença de 21 prováveis grupos ancestrais para as localidades em estudo com os *primers* combinados, diferente do que ocorreu com o uso dos SSR e dos ISSR, em que foram encontrados 14 prováveis grupos ancestrais. O maior valor de  $G_{st}$  foi de 0,11 entre RN e MG para os SSR, já o  $N_m$  que indica o fluxo gênico foi alto entre todos os Estados. Em relação ao  $I_A$  e  $rd$ , a hipótese de recombinação sexual foi aceita para algumas microrregiões no estudo. Contudo, não foi detectada nenhuma estruturação da população de acordo com os locais de coleta, sendo que o conhecimento sobre a distribuição da variabilidade genética de *M. musicola* irá auxiliar nas estratégias para o controle da doença.

**Palavras-chave:** *Mycosphaerella musicola* Leach, estrutura populacional, marcadores moleculares

# GENETIC STRUCTURE OF ISOLATED YELLOW SIGATOKA FUNGUS THAT CAUSES AT BANANA

Author: Yslai Silva Peixouto

Adivisor: Edson Perito Amorim

Co - advisor: Cláudia Fortes Ferreira e Fernando Haddad

## ABSTRACT:

Among the major diseases affecting banana is yellow Sigatoka, caused by *Mycosphaerella musicola* Leach. The objective was to study the genetic diversity and population structure of the fungus *M. musicola*, the main banana-producing regions. Additionally, we investigated the population structure is correlated with geographic origin. For this, we evaluated 83 isolates collected in the states of Bahia (BA), Rio Grande do Norte (RN) and Minas Gerais (MG) through SSR, ISSR and the combination of the two (SSR / ISSR). According to AMOVA analysis for the three most genetic variation occurred among haplotypes within municipalities, in which only the use of ISSR was not significant. High variability was detected among isolates, with primers combined observed distinct haplotypes 100%, with 98.79% of SSR haplotypes with unique and ISSR were 83.13% different haplotypes. Regarding the genetic composition based on Bayesian clustering was noted the presence of 21 probable ancestral groups for study sites with primers combinations, different from what occurred with the use of SSR and ISSR were found in which the presence of 14 probable ancestral groups. The highest  $G_{st}$  was 0.11 between RN and MG for SSR, already  $N_m$  indicating gene flow was high among all states. Compared to IA and rd, the hypothesis was accepted for sexual recombination in some micro study. However, it was not detected any structuring of the population according to the sampling sites, and the knowledge about the distribution of genetic variability of *M. musicola* will assist in strategies to control the disease.

**Keywords:** *Mycosphaerella musicola* Leach, population structure, molecular markers

## 1. Revisão de literatura

### 1.1. A cultura

O Centro de origem da bananeira (*Musa spp.*) é o Sudeste da Ásia, sendo a mesma cultivada em uma extensa área desde os trópicos até os subtropicais. A partir dos centros de origem, a bananeira foi introduzida na África, nas Américas e no Sul do Pacífico, onde houve um ganho em importância econômica e popularidade (DE LANGHE et al., 2009).

Devido às suas particularidades, especialmente seu baixo custo, a banana é consumida por todas as classes sociais. É cultivada também por pequenos agricultores, permitindo a fixação de mão-de-obra no campo, uma vez que constitui uma fonte de renda contínua para estes agricultores, por ser produzida durante o ano todo (RODRIGUES et al., 2001).

A bananeira apresenta também importância mundial, com uma produção em 2011 de aproximadamente 106 milhões de toneladas. O Brasil é o quinto produtor mundial, tendo produzido 7,3 milhões de toneladas em 2011, em uma área aproximada de 503 mil hectares, ficando atrás do Equador (7,4 milhões toneladas), das Filipinas (9,1 milhões toneladas), da China (10 milhões toneladas) e da Índia, que é principal produtor mundial, com 29 milhões de toneladas produzidas (FAO, 2013).

A produção nacional está baseada em variedades que não apresentam, simultaneamente, tolerância ao frio e/ou à seca, porte baixo, boas características pós-colheita, entre elas a resistência ao despençamento do fruto e resistência às principais pragas e doenças (CORDEIRO et al., 2005a). No Brasil, a Bahia é o segundo produtor nacional (IBGE, 2013), com uma produção de aproximadamente 1,08 milhão de toneladas na safra 2012, ficando atrás de São Paulo com 1,20 milhão de toneladas.

Como toda cultura agrícola, a bananeira enfrenta vários problemas que abrangem desde a necessidade do aumento da produtividade e da qualidade dos frutos, até questões mais específicas, como a busca por cultivares resistentes a pragas e doenças (CORDEIRO et al., 2005a). Dentre as principais doenças que afetam a bananeira estão a Sigatoka-amarela, a Sigatoka-negra, o mal-do-Panamá, o Moko (*Ralstonia Solanacearum*, raça 2) e algumas viroses, sendo que há maior incidência na bananicultura brasileira da Sigatoka-amarela.

A maioria das cultivares de bananeira disponível é suscetível à Sigatoka-amarela, onde a aplicação sistemática de fungicidas ainda é a principal forma de controle em algumas regiões produtoras; prática esta que aumenta consideravelmente o custo de produção e é extremamente agressiva ao ambiente e ao homem.

As cultivares mais difundidas no Brasil são: tipo Prata (Prata, Pacovan, Prata-Anã), Maçã, Mysore, tipo Terra (Terra e D'Angola), pertencentes ao grupo AAB e utilizadas unicamente para o mercado interno; já as do grupo genômico AAA, subgrupo Cavendish (Nanica, Nanicão e Grande Naine) são usadas, principalmente, na industrialização, e exportadas em pequena quantidade. Dentre estas, as variedades Prata Anã e Pacovan são responsáveis por aproximadamente 60% da área cultivada com bananeira no Brasil (BORGES, et al., 2009). Todas as cultivares descritas são suscetíveis à Sigatoka-amarela, à exceção da 'Maçã', da 'Mysore' e dos plátanos (SILVA e ALVES, 1999).

## 1.2. A doença

A Sigatoka-amarela, também conhecida como Cercosporiose, mal-de-Sigatoka, é causada pelo fungo *Mycosphaerella musicola* Leach. Essa doença foi inicialmente detectada na ilha de Java (Indonésia) por Zimmermann, em 1902, ganhando maior importância após enormes prejuízos causados no distrito de Sigatoka, nas Ilhas de Viti Levu em Fiji, por volta de 1912.

Posteriormente, a doença foi identificada na Ásia, África, Américas Central e do Sul e Caribe, tendo rapidamente se tornado uma das mais importantes doenças para a cultura da bananeira (MEREDITH, 1970). No Brasil, a Sigatoka-amarela foi constatada, pela primeira vez, no Estado do Amazonas, em 1944, estendendo-se posteriormente por todos os estados brasileiros (CORDEIRO et al., 2011).

Atualmente, a doença é endêmica em todas as regiões produtoras de banana no País, apresentando maior relevância nos locais ou microrregiões de clima úmido, com alta pluviosidade e temperaturas em torno de 25 °C.

A Sigatoka-amarela está presente nas regiões de bananicultura mais competitiva, como nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul, à exceção de São Paulo, onde a Sigatoka-negra nos bananais do vale do Ribeira já ultrapassa a amarela, o que ocasiona o crescimento na aplicação de defensivos agrícolas (CORDEIRO et al., 2011).

O principal sintoma dessa doença são lesões na folha com estrias amareladas, o que acarreta a redução da área foliar verde da bananeira, e, conseqüentemente, da área fotossintética, ocasionando uma redução no número e tamanho dos frutos, que pode induzir a sua maturação precoce no campo ou em pós-colheita (CORDEIRO e MATOS, 2005).

O ciclo da Sigatoka amarela tem duas fases. A fase teleomórfica ou sexuada, em que o ascósporo constitui o inoculo primário, que irá germinar e penetrar na folha através dos estômatos, ocorrendo a formação dos esporodóquio que irão se diferenciar em espermogônia e espermásias e posteriormente os pseudotécios irão liberar os ascósporo iniciando novamente este ciclo. Por outro lado, a fase anamórfica, ou assexual, em que o conídio constitui o inoculo secundário, o mesmo irá germinar e penetrar na folha através dos estômatos, ocorrendo a formação dos esporodóquio e posteriormente dos pseudotécios que irão liberar os conídios, iniciando o ciclo novamente (AGRIOS, 2005). A fase anamórfica resulta em uma maior velocidade de desenvolvimento da doença que, de um modo geral, ocorre nos períodos mais quentes e com umidade relativa mais elevada (PEREIRA et al., 1999).

O tempo entre a infecção e o surgimento dos sintomas varia de acordo com as condições ambientais e a suscetibilidade da planta à doença, sendo que o período de incubação, que representa o intervalo de tempo entre a inoculação e o aparecimento de estrias cloróticas, tem se mostrado extremamente variável em função do ambiente, havendo registros de 15 até 106 dias (CORDEIRO, 1997).

As lesões apresentam-se em formatos distintos, de acordo com a idade da planta hospedeira infectada. Em relação aos sintomas da Sigatoka-amarela, Meredith (1970), classificou o desenvolvimento das lesões em seis estádios:

- I- Estádio inicial de listra - A pontuação é perceptível a olho nu, apenas como uma leve mancha de descoloração verde-amarelada;
- II- Segundo estágio de listra - A mancha aumenta de tamanho, principalmente em comprimento, ainda com aparência de descoloração verde-amarelada;
- III- Terceiro estágio de listra - A mancha começa a dilatar-se levemente na largura e principalmente no comprimento, tornando o centro da lesão com coloração levemente avermelhada enferrujada;
- IV- Primeiro estágio de mancha - A listra ganha uma coloração marrom escuro, e, simultaneamente, ou dentro de 24 horas, forma-se um halo com aspecto de encharcamento de cor marrom, quando a folha encontra-se túrgida. Este halo é visível quando se observa a lesão contra a luz solar no período da manhã. A mancha aumenta consideravelmente de tamanho neste estágio. A listra chega a um estágio em que é facilmente reconhecida como uma lesão circular.
- V- Segundo estágio de mancha - A porção marrom escura da mancha torna-se enrugada e encolhida e o halo torna-se de coloração mais escurecida.
- VI- Terceiro estágio de mancha - A mancha encontra-se plenamente desenvolvida, com a porção central abaulada e de coloração cinza, com o halo de coloração marrom escuro ou preto, formando um anel bem distinto ao redor da lesão.

Este tipo de lesão permanece bem definida mesmo quando a folha está morta, com o anel escuro bem distinto circundando a lesão (CORDEIRO et al., 2011).

### 1.3. O patógeno

O gênero *Mycosphaerella* é filogeneticamente heterogêneo, com mais de 3.000 nomes, e tem sido associado a mais de 30 gêneros anamórficos (APTROOT, 2006; ARZANLOU et al., 2007; CROUS et al., 2007). Espécies de *Mycosphaerella* habitam diferentes nichos ecológicos como sapróbios, patógenos de plantas ou microrganismos endofíticos; com distribuição mundial nas regiões tropicais e subtropicais (CROUS et al., 2006).

As publicações mais antigas fazem referência ao agente causal da Sigatoka-amarela, na forma assexuada, como gênero *Cercospora*, em lugar da denominação atual de *Pseudocercospora*; acérvulos em lugar dos atuais esporodóquios e, na forma sexuada, aparece a denominação de peritécio, hoje referida como pseudotécio (CORDEIRO et al., 2011). Uma característica da ordem *Dothideales*, à qual pertence à *Mycosphaerella musicola*, é a presença de ascos bitunicados, produzidos em ascomas do tipo ascostroma, que no caso dessa espécie, é uniloculado, recebendo a denominação de pseudotécio (ALEXOPOULOS, 1979).

O agente causal da Sigatoka-amarela é o ascomyceto *Mycosphaerella musicola* Leach, que é a forma sexuada ou teleomórfica do fungo, enquanto *Peudocercospora musae* (Zimm.) Deighton é a forma assexuada ou anamórfica. Onde estão envolvidos dois tipos de esporos: o sexuado que é o ascósporo, que são dispersos pelo vento e o assexuado, que é o conídio que tem sua dispersão condicionada pela presença de água (ROCHA, 2008). Os esporos são produzidos de forma contínua em climas úmidos, sendo dispersos pela água acumulada na superfície foliar durante as chuvas ou orvalho, explicando assim a relevância da doença em climas mais úmidos e as infecções severas algumas vezes observadas nos perfilhos situados sob as plantas mais adultas e infectadas (CORDEIRO et al., 2011).

#### **1.4. Biologia de populações**

Vários conceitos sobre população foram definidos ao longo dos anos. Entende-se por população um grupo de indivíduos de mesma espécie que se reproduzem entre si, e por isso apresentam propriedades comuns numa dimensão de espaço e tempo, referindo-se à sua composição genética (SALMA, 2007). Considera-se que os fatores que determinam a evolução de uma população sejam a mutação, a recombinação, a seleção natural, o fluxo gênico e a deriva genética (McDONALD e LINDE, 2002).

A estrutura genética de uma população é determinada pela sua história evolutiva. Assim, o conhecimento dessa estrutura genética oferece uma visão sobre os processos evolutivos que a moldaram no passado, sobre o fluxo gênico desta



com outras populações, sobre o efeito da seleção natural e de outros fatores evolutivos (MILGROOM e PEEVER, 2003).

Estrutura genética refere-se à quantidade e à distribuição da diversidade genética dentro e entre populações. A diversidade gênica e a diversidade genotípica são medidas úteis para se diferenciar entre os dois tipos de diversidade genética que contribuem para a estrutura genética de populações (McDONALD e LINDE, 2002).

Os processos microevolutivos que promovem alterações nas frequências gênicas e genotípicas podem ser divididos em duas classes: os “sistemáticos” (mutação, seleção e migração), que tendem a mudar a frequência gênica de uma maneira que pode ser predita, tanto em quantidade quanto em direção; e o “dispersivo” (deriva genética), que surge em pequenas populações pelos efeitos de amostragem, e pode ser predito em quantidade, mas não em direção (MAYR, 1977).

Patógenos com maior potencial evolutivo constituem um maior "risco" de suplantarem a resistência ou evoluírem para neutralizar outros métodos de controle, tais como aplicações de fungicidas ou antibióticos (McDONALD e LINDE, 2002; ANDERSON et al., 2004). Patógenos que apresentam sistema reprodutivo misto (tanto a reprodução sexuada quanto a assexuada), como é o caso de *M. musicola*, um elevado potencial para o fluxo gênico, grande tamanho efetivo populacional e alta taxa de mutação são considerados com um maior potencial evolutivo (McDONALD e LINDE, 2002).

O conhecimento de estrutura genética fornece uma visão sobre a história de vida de patógenos, incluindo os processos evolutivos que formam populações de patógenos em agroecossistemas (LINDE et al., 2002). Marcadores genéticos têm sido utilizados para avaliar níveis de diversidade genética e relações filogenéticas intraespecíficas e interespecíficas, podendo indicar o potencial do gene e o fluxo gênico entre as populações, mensurando o grau de subdivisão populacional entre as populações em diferentes escalas espaciais. Fornecendo assim, embasamento para tomada de decisões sobre estratégias para o controle da doença, auxiliando os programas de melhoramento.

Trabalhos com marcadores moleculares sobre estrutura populacional estão disponíveis para diversos fitopatógenos como *Cochliobolus* (CONDON et al., 2013), *Magnaporthe oryzae* (XUE et al., 2012), *Crinipellis perniciosus* e *Moniliophthora roreri*

(MOREIRA, 2006), *Melampsora larici-populina* (XHAARD et al., 2011), *Phytophthora capsici* (QUESADA-OCAMPO et al., 2011), *Puccinia triticina* (KOLMER et al., 2011), *Mycosphaerella fijiensis* (CARLIER et al., 1996; HAYDEN et al., 2003b), *Mycosphaerella graminicola* (LINDE et al., 2002; ZHAN et al., 2003; BANKE e McDONALD, 2005; JURGENS et al., 2006; SIMÓN et al., 2012;) e *Mycosphaerella musicola* (MOREIRA et al., 2003; HAYDEN et al., 2003a; RIVAIS et al., 2004; HAYDEN et al., 2005; ARZANLOU, 2008, GOMES, 2012).

Com o avanço da biologia molecular estudos envolvendo a variabilidade genética desses fungos foram facilitados, pelo uso de marcadores moleculares diversos, do tipo RFLP, RAPD, e microssatélites (SSR), capazes de indicar pequenas diferenças genômicas entre isolados *M. musicola* de diferentes origens (CARLIER et al., 1994; CARLIER et al., 1996; MULLER et al., 1997; MOLINA et al., 2001; MOLINA e KAHL, 2002; MOREIRA et al., 2003; MONTARROYOS, 2005; ROCHA, 2008; ZAPATER et al., 2008, OLIVEIRA et al., 2013).

Marcadores ISSR são fragmentos de DNA de 100 a 3000 pb, amplificados via PCR (*Polymerase Chain Reaction*), usando um único *primer* com 16 a 20 pares de base, construído a partir de sequências microssatélites (FALEIRO, 2007). São marcadores dominantes, altamente informativos multiloco, uma vez que o iniciador (*primer*) se baseia em um motivo de região microssatélite (di-, tri-, tetra-, ou penta-nucleotídeos) do genoma (REDDY et al., 2002).

Já os marcadores microssatélites (SSRs) flanqueiam as sequências microssatélites que são curtas com 1 a 6 pares de bases que se repetem em tandem no genoma, revelando o polimorfismo em um loco devido à diferença no número de vezes que a sequência se repete naquele loco. São marcadores multialélicos, amplamente distribuídos por todo o genoma e dependentes de pequena quantidade de DNA dos indivíduos analisados (BUSO et al., 2003). O conteúdo genético informativo de um loco SSR é bastante alto, por se tratarem de sequências de alta taxa evolutiva.

As sequências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, ou até mesmo entre espécies geneticamente relacionadas, permitindo a seleção de iniciadores específicos que amplificam, via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos (FALEIRO, 2007).

No estudo de variação genética populacional de um espécie, a quantificação da variabilidade genética dentro da população e a caracterização de sua estruturação são essenciais (HAMRICK, 1982). Há três possibilidades para caracterizar a estrutura genética entre populações: estatísticas F de Wright (WRIGHT, 1965); análise da diversidade gênica em populações subdivididas (NEI, 1973) e análise da variância de frequências gênicas (COCKERHAM, 1969), sendo que estas abordagens são complementares quanto ao sentido biológico dos resultados obtidos. Logo as estatísticas F possibilitam a caracterização da distribuição da variabilidade genética entre populações ( $F_{ST}$ ), além dos níveis médios de endogamia populacional ( $F_{IS}$ ) e total ( $F_{IT}$ ).

Quanto a análise da diversidade genética em populações subdivididas, utiliza-se a diversidade de NEI (1973), objetivando uma medida de estrutura de população que agregue os locos multialélicos. Assim, essa medida pode ser empregada em qualquer população, seja ela de reprodução sexuada ou assexuada, e independe da atuação de forças evolutivas (seleção, migração, deriva e mutação).

Para estimar a diferenciação gênica em populações com indivíduos haploides, emprega-se o  $G_{ST}$ , denominado de nível de diferenciação gênica, que é utilizado para inferir o número de migrantes em uma população por meio do cálculo:  $N_m = 0,5 (1 - G_{ST})/G_{ST}$ . Segundo Hartl e Clark (2010) o  $N_m$  pode ser interpretado como o número absoluto de organismos migrantes que entram em cada subpopulação a cada geração.

O número de migrantes indica o fluxo gênico entre as populações, portanto quanto maior o número de migrantes, maior o fluxo gênico. E esse mecanismo é responsável pela introdução de novas variantes de um patógeno em um determinado local, podendo alterar as relações do mesmo no patossistema (McDONALD e LINDE, 2002). Portanto, o fluxo gênico, indicado por  $N_m$ , dá um significado biológico para o valor matemático de diferenciação da população, indicado pela  $G_{ST}$  (LINDE et al, 2002).

Para a realização dessas análises há inúmeros softwares, contudo, a escolha dos programas a serem utilizados devem levar em consideração a robustez, simplicidade e abrangência dos mesmos.

### 1.5. Variabilidade genética de *M. musicola* Leach

A diversidade e a estrutura genética de populações de *Mycosphaerella musicola* foi estudada em diversos trabalhos, como na avaliação da diversidade genética global entre populações de *M. musicola*, originárias da Indonésia, África, América Latina, Caribe e Austrália, com o uso de marcadores RFLP, Hayden et al. (2003b).

Oliveira et al. (2013), estudando isolados de *M. musicola* obtidos de bananais do norte de Minas Gerais, observou a presença de polimorfismo em todos os *primers* testados indicando a presença de alta variabilidade genética entre os isolados. Estes resultados corroboram com os estudos realizados por Moreira et al. (2003), Montarroyos (2005) com a caracterização genética de *M. musicola* observando variabilidade genética entre os isolados.

Assim como Rocha (2008) e Molina et al. (2001) que também detectaram alta variabilidade genética em isolados de *M. musicola*, provenientes de diferentes regiões produtoras de banana, obtendo uma separação dos isolados de acordo com sua região geográfica.

O principal objetivo do trabalho foi estudar a diversidade genética e estrutura populacional do fungo *Mycosphaerella musicola* Leach, das principais regiões produtoras de banana no Estado da Bahia. Assim como, verificar se a estrutura populacional está correlacionada com a origem geográfica. Com isso, espera-se oferecer informações relevantes quanto às novas estratégias de manejo para um melhor controle da doença.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N, Plant Pathology. Amsterdam: **Elsevier Academic**, 2005.

ALEXOPOULOS, C. J.; MINS C. W. Introductory mycology. New York, **John Wiley & Sons**, 632p., 1979.

ANDERSON, P.K.; CUNNINGHAM, A.A.; PATEL, N.G.; MORALES, F.J.; EPSTEIN, P.R.; DASZAK, P., Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution,

climate change and agrotechnology drivers. **Trends in Ecology & Evolution** v.19, p.535-544, 2004.

APTROOT, A. *Mycosphaerella* and its anamorphs: 2. Conspectus of *Mycosphaerella*. **CBS Biodiversity Series** v.5, p.1–231. 2006.

ARZANLOU, M.; ABELN, E.C.A.; KEMA, G.H.J.; WAALWIJK, C.; CARLIER, J.; VRIES, I.; GUZMÁN, M.; CROUS, P.W., Molecular diagnostics for the Sigatoka disease complex of banana. **Phytopathology** v. 97, p.1112–1118, 2007.

ARZANLOU, M., GROENEWALD, J.Z.; FULLERTON, R.A.; ABELN, E.C.A.; CARLIER, J.; ZAPATER, M.-F.; BUDDENHAGEN, I.W. VILJOEN, A.; CROUS, P.W., Multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several novel species of *Mycosphaerella* and related anamorphs on banana. **Persoonia**, v. 20, p.19–37, 2008.

BANKE, S.; McDONALD, B.A., Migration patterns among global populations of the pathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola*. **Molecular Ecology**, v.14, p.1881–1896, 2005.

BORGES, A.L.; SILVA, A.L.; BATISTA, D.C.; et al; 2009. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananeiraIrigada/cultivares.htm>, Acesso: 20/02/2013. Embrapa Semiárido, Sistemas de Produção, 4 . Versão Eletrônica.

BUSO, G.S.C.; CIAMPI, A.Y.; MORETZSOHN, M.C.; AMARAL, Z.P.S.; BRONDANI, R.V., Marcadores microssatélites em espécies vegetais: Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites e espécies vegetais tropicais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.30, 2003.

CARLIER, J.; LEBRUN, M.H.; ZAPATER, M.F.; DUBOIS, C.; MOURICHON, X., Genetic structure of the global population of banana black leaf streak fungus, *Mycosphaerella fijiensis*. **Molecular Ecology**, v.5, p. 499-510, 1996.

CARLIER, J.; MOURICHON, X.; GONZALEZ-DE-LEON, D.; ZAPATER, M.F.,  
LEBRUN, M.H., DNA restriction fragment length polymorphisms in *Mycosphaerella*  
species that cause banana leaf spot diseases. **Phytopathology**, v.84, p.751-756,  
1994.

COCKERHAM, C. C. Variance of gene frequencies. **Evolution**, v.23, p.72-84, 1969.

CONDON, B.J; LENG, Y.; WU, D.; BUSHLEY, K.E.; OHM, R.A.; OTILLAR, R.;  
MARTIN, J.; CHACKWITZ, W.; et al., Comparative Genome Structure, Secondary  
Metabolite, and Effector Coding Capacity across Cochliobolus Pathogens. *PLoS*  
*Genet*, v.9, p. 1-29, 2013.

CORDEIRO, Z.J.M. **Variabilidade patogênica de isolados de *Mycosphaerella musicola* e resistência induzida e genética em genótipos de bananeira.**

Piracicaba, 1997, 118p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de  
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 1997.

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P. Expressão da Resistência de Variedades de  
Banana à Sigatoka-Amarela. **Fitopatologia Brasileira** v. 30, p. 532-534. 2005.

CORDEIRO, Z.J.M.; MATOS, A.P.; FERREIRA, D.M.V.; ABREU, K.C.L. de M.  
**Manual para identificação e controle da Sigatoka-negra da bananeira.** Cruz das  
Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 36p. (Documento 153), 2005 a.

CORDEIRO, Z.J.M.; MATOS, A.P.; KIMATI, H., Doenças da bananeira (*Musa* spp.).  
capítulo 15. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.;  
CAMARGO, L.E.A., **Manual de fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas**, São  
Paulo: Editora Agronômica Ceres, 4 edição, v.2, 663p., 2005b.

CORDEIRO, Z.J.M.; ROCHA, H.S.; ARAÚJO, A.G., **Metodologias para Manuseio  
de *Mycosphaerella musicola* em Laboratório.** Documentos / Embrapa Mandioca e  
Fruticultura: 198, Cruz das Almas, 32p, 2011.

CROUS, P.W.; BRAUN, U.; GROENEWALD, J.Z., *Mycosphaerella* is polyphyletic. **Studies in Mycology** v. 58, p.1–32. 2007.

CROUS, P.W.; WINGFIELD, M.J.; MANSILLA, J.P.; ALFENAS, A.C.; GROENEWALD, J.Z., Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on Eucalyptus. II. **Studies in Mycology** v. 55, p. 99–131. 2006.

DE LANGHE, E.; VRYDAGHS, L.; MARET, P.; PERRIER, X.; DENHAM, T.; Why Bananas Matter: An introduction to the history of banana domestication. **Ethnobotany Research and Applications**, v.7, p.165-177, 2009.

FALEIRO, F.G., **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**, Platina, DF: Embrapa Cerrados, 102p., 2007.

**FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS).** *Produção de banana*. Disponível em:<<http://apps.fao.org>>. Acesso em: 15 fev. 2013.

GOMES, L.I.S., **Etiology of Sigatoka diseases in Minas Gerais, genetic structure of the population of *Mycosphaerella musicola* and sensitivity of Brazilian isolates of *Mycosphaerella fijienses* to fungicides**. Viçosa, 2012, 70p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) , Universidade Federal de Viçosa, 2012.

HAMRICK, J. L. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**, v.69, p.1685-1693, 1982.

HARLT, D. L.;CLARK, A. G. **Princípios de Genética de populações**. 4° ed. Porto Alegre: Artmed, 660p., 2010

HAYDEN, H.L.; CARLIER, J.; AITKEN, E.A.B., Genetic structure of *Mycosphaerella fijiensis* populations from Australia, Papua New Guinea and the Pacific Islands. **Plant Pathology** v.52, p.703–12, 2003a.

HAYDEN, H.L., CARLIER, J. AITKEN, E.A.B., Population differentiation in the banana leaf spot pathogen *Mycosphaerella musicola*, examined at a global scale. **Plant Pathology**, v. 52, p. 713-719, 2003b.

HAYDEN, H.L; CARLIER, J.; AITKEN, E.A.B. The genetic structure of Australian populations of *Mycosphaerella musicola* suggests restricted gene flow at the continental scale. **Phytopathology**. v. 95, n. 5, 2005.

**IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA.** Disponível em:

<[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa\\_201303.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201303.pdf)>. Acesso em: 20 fev. 2013

JURGENS, T.; LINDE, C.C; McDONALD, B.A, Genetic structure of *Mycosphaerella graminicola* populations from Iran, Argentina. **European Journal of Plant Pathology**, v. 115, p.223–233, 2006.

KOLMER, J.A.; ORDONEZ, M.E.; MANISTERSKI, J.; ANIKSTER, Y., Genetic Differentiation of *Puccinia triticina* Populations in the Middle East and Genetic Similarity with Populations in Central Asia. **Phytopathology**. v.101, n. 7, 2011.

LINDE, C. C.; ZHAN, J.; McDONALD, B. A. Population structure of *Mycosphaerella graminicola*: from lesions to Continents. **Phytopathology**, St. Paul, v.92, p.946-955, 2002.

MAYR, E. **Populações, espécie e evolução**. São Paulo: EDUSP, 485p., 1977.

McDONALD, B.A.; LINDE, C.C., Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annu. Rev. Phytopathol.** v 40, p 349-379, 2002.



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

MEREDITH, D.S., Banana Leaf Spot Disease (Sigatoka) caused by *Mycosphaerella musicola* Leach. Kew, UK: Commonwealth Agricultural Bureaux. 1970.

MILGROOM, M.G.; PEEVER, T.L., Population biology of plant pathogens the synthesis of plant disease epidemiology and population genetics, **Plant Disease**, 2003.

MOLINA, C.; KAEMMER, D.; APONTE, S.; WEISING, K.; KAHL, G., Microsatellite markers for the fungal banana pathogen *Mycosphaerella musicola*. **Molecular Ecology Notes**, v.1, p.137-139, 2001.

MOLINA, C.; KAHL, G. Genomics of two banana pathogens, genetic diversity, diagnostics, and phylogeny of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*. In: JAIN, S.M. (Ed.). Banana improvement, cellular and molecular biology, and induced mutations. **Vienna: FAO/IAEA**, 2002.

MONTARROYOS, A.V.V. **Análise da diversidade genética e patogênica de *Mycosphaerella fijiensis* e *Mycosphaerella musicola* no Brasil**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, PE. 182p., 2005.

MOREIRA, R.F.C., **Estrutura genética de populações de *Crinipellis perniciosa* e *Moniliophthora roreri* utilizando marcadores RAPD e SSR**. Tese (Doutorado em Agronomia área de concentração Genética e Melhoramento de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Jaboticabal – SP, 2006.

MOREIRA, R.F.C., CORDEIRO, Z.J.M., VILARINHOS, A.D., 2003. Caracterização genética de isolados de *Mycosphaerella musicola* por marcadores RAPD. **Summa Phytopathologica**, v.29, p.275-277, 2003.

MULLER, R.; PASBERG-GAUHL, C; GAUHL, F.; RAMSER, J.; KAHL, G.  
Oligonucleotide fingerprinting detects genetic variability at different levels in Nigerian *Mycosphaerella fijiensis*. **Journal of Phytopathology**, v. 145, p.25-30, 1997.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.70, n.12, p.3321-3323, 1973.

OLIVEIRA, J.R.O.; NIETSCHE, S.; COSTA, M.R.; MIZOBUTSI, E.H.; OLIVEIRA, D.A.; Diversidade genética de isolados de *Mycosphaerella musicola* obtidos de bananeiras do norte de Minas Gerais, Brasil por meio de marcadores RAPD. **Ciência Rural**, v.43, n.1, 2013.

PEREIRA, L.V.; CORDEIRO, Z.J.M.; FIGUEIRA, A. dos R. et al. Doenças da bananeira. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.20, n.196, p.37-47, 1999.

QUESADA-OCAMPO, L.M.; GRANKE, L.L.; MERCIER, M.R.; OLSEN, J.; HAUSBECK, M.K., Investigating the Genetic Structure of *Phytophthora capsici* Populations. **Phytopathology**, v. 101, n. 9, 2011.

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

RIVAIS, G.G.; ZAPATER, M.F.; ABADIE, C.; CARLIER, J., Founder effects and stochastic dispersal at the continental scale of the fungal pathogen of bananas *Mycosphaerella fijiensis*. **Molecular Ecology**, n.13, p. 471-482, 2004.

ROCHA, H.S.; **Epidemiologia da Sigatoka amarela, quantificação de fenóis em variedades de bananeiras e análise filogenética de isolados de *Mycosphaerella musicola* utilizando microssatélites.** (Doutorado em Agronomia área de concentração Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras -MG. 2008.

RODRIGUES, M.G.V.; DONATO, S. L. R.; DIAS, M. S. C.; SILVA, J. T. A.; REIS, J. B. R. S.. Banana. Informe Agropecuário, v.32, p.35-48, 2001.

SALMAN, A. K. D., Conceitos básicos de genética de populações. Documentos 118, Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 27p., 2007.

SILVA, S.de O. e; ALVES, E.J. Melhoramento genético e novas cultivares de banana. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.20, n.196, p.91-96,1999.

SIMÓN, M.R.; CORDO, C.A.; CASTILLO, N.S.; STRUIK, P.C.; BORNER, A., Population Structure of *Mycosphaerella graminicola* and Location of Genes for Resistance to the Pathogen: Recent Advances in Argentina. **International Journal of Agronomy**, v. 2012, 7 p., 2012.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution, Lawrence**, v.19, p.395-420, 1965.

XHAARD, C.; FABRE, B.; ANDRIEUX, A.; GLADIEUX, P.; BARRÈS, B.; FREY, P.; HALKETT, F.; The genetic structure of the plant pathogenic fungus *Melampsora larici-populina* on its wild host is extensively impacted by host domestication. **Molecular Ecology** v.20, p.2739–2755, 2011.

XUE, M.; YANG, J.; LI, Z.; HU, S.; YAO, N.; DEAN, R.A.; ZHAO, W.; SHEN, M.; ZHANG, H.; LI, C.; LIU, L.; CAO, L.; XU, X.; XING, Y.; HSIANG, T.; ZHANG, Z.; XU, J-R.; PENG, Y-L., Comparative Analysis of the Genomes of Two Field Isolates of the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. **PLoS Genet**, v.8, n.8, p. 1-12, 2012.

ZAPATER, M.F.; DICHEMIN, M.; DUSSART, J.F.M.; COSTE, D.; BROTTIER, P.; CARLIER, J. Microsatellite markers for the fungal banana pathogens *Mycosphaerella fijiensis*, *Mycosphaerella musicola* and *Mycosphaerella eumusae*. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 1121-1125. 2008.

ZHAN, J.; PETTWAY, R.E.; McDONALD, B.A., The global genetic structure of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* is characterized by high nuclear diversity, low mitochondrial diversity, regular recombination, and gene flow. **Fungal Genetics and Biology** v.38, p. 286-297, 2003.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

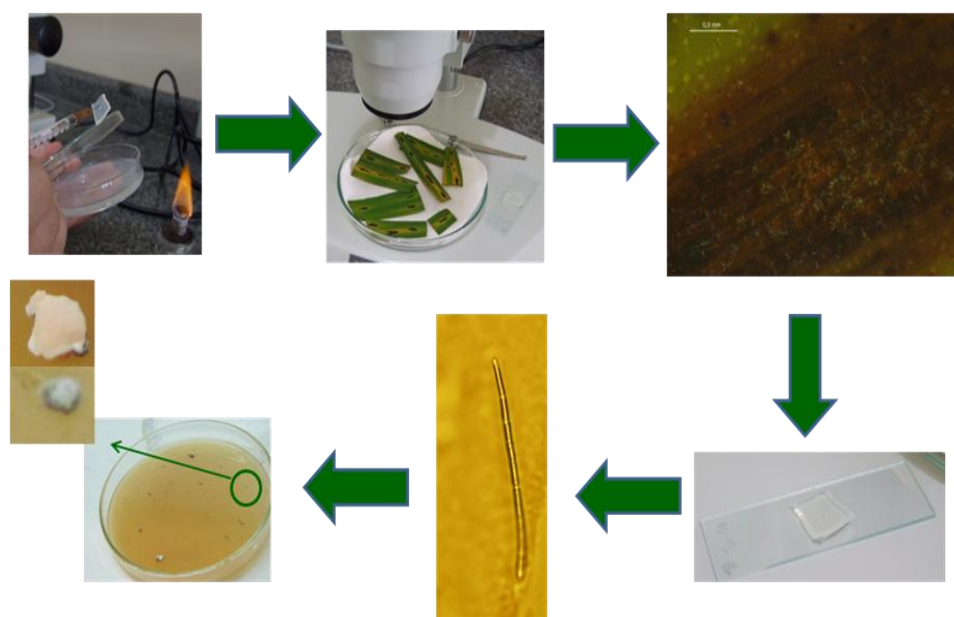
### **2.1. Coleta das amostras**

As amostras foram coletadas em locais/regiões produtoras de banana do Estado da Bahia, Rio Grande do Norte e Minas Gerais. Os locais foram plotados em mapas por meio de sistema de informação geográfica – SIG e todas as informações de coletas seguidas adequadamente, sendo que cada isolado coletado teve a sua informação georeferenciada (GPS – *Global Positioning System*) em cadernetas apropriadas. As folhas coletadas foram transportadas em sacos plásticos, identificadas e acondicionadas em caixas de isopor até a Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia para posterior isolamento.

### **2.2. Obtenção dos isolados**

O isolamento foi realizado no laboratório de Fitopatologia na Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia. As folhas de bananeira com sintomas característicos de Sigatoka-amarela coletadas foram lavadas em água corrente e com auxílio de algodão hidrofílico, para a retirada de impurezas e contaminantes. Em seguida, as amostras foram mantidas em câmaras úmidas em gerbox contendo papel filtro umedecido, e incubadas em condição ambiente por 48 horas, seguido de verificação de esporulação do patógeno com auxílio de microscópio estereoscópio.

Os esporos do patógeno foram retirados cuidadosamente das lesões e transferidos para lâminas de vidro contendo blocos de ágar-água, para posterior transferência de conídios isolados do meio ágar-água para meio V8 contendo os seguintes componentes: 100 mL de suco V8, 2g de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), 18 g de Agar, 200 mg de clorofenicol e o volume completado com água destilada para 1L. Foram colocados mais de um conídio por placa e depois os mesmos foram transferidos individualmente para placas com meio V8 e espalhados por toda placa formando os monospóricos individualmente (Figura 1).



**Figura 1.** Isolamento do conídio e formação das colônias monospóricas.

Foram coletadas 199 amostras de 16 municípios de 11 microrregiões produtoras de banana nos Estados da Bahia, Rio Grande do Norte e Minas Gerais. Destes 86 foram preservados dando início a primeira micoteca do Nordeste (Tabela 1).

**Tabela 1.** Isolados de *Mycosphaerella musicola* Leach presentes na micoteca da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas/BA. Cruz das Almas, 2013.

| Amostra | Latitude | Longitude | Cultivar  | Microrregião            | Município   |
|---------|----------|-----------|-----------|-------------------------|-------------|
| 044 RN  | -5.6242  | -37.8242  | Caipira   | Chapada do Apodi/RN     | Apodi       |
| 048 RN  | -5.7508  | -37.8386  | Nanicão   | Chapada do Apodi/RN     | Apodi       |
| 076 RN  | -5.7583  | -37.8472  | Prata     | Chapada do Apodi/RN     | Apodi       |
| 043 RN  | -5.1611  | -37.6614  | Pacovan   | Mossoró/RN              | Baraúna     |
| 072 RN  | -5.0939  | -37.7464  | Pacovan   | Mossoró/RN              | Baraúna     |
| 073 RN  | -5.1006  | -37.6608  | Pacovan   | Mossoró/RN              | Baraúna     |
| 074 RN  | -5.0781  | -37.7639  | Pacovan   | Mossoró/RN              | Baraúna     |
| 075 RN  | -5.1758  | -37.6383  | Pacovan   | Mossoró/RN              | Baraúna     |
| 022 BA  | -15.0581 | -40.5839  | PV7934    | Vitória da Conquista/BA | B. do Choça |
| 023 BA  | -15.1428 | -40.4556  | Nanicão   | Vitória da Conquista/BA | B. do Choça |
| 025 BA  | -14.8608 | -40.5694  | Prata anã | Vitória da Conquista/BA | B. do Choça |
| 029 BA  | -14.9211 | -40.6344  | Nanica    | Vitória da Conquista/BA | B. do Choça |
| 035 BA  | -15.0550 | -40.5872  | Pacovan   | Vitória da Conquista/BA | B. do Choça |
| 036 BA  | -15.3386 | -40.5936  | Pacovan   | Vitória da Conquista/BA | B. do Choça |

|        |          |          |              |                         |                 |
|--------|----------|----------|--------------|-------------------------|-----------------|
| 051 BA | -15.1356 | -40.4358 | Nanica       | Vitória da Conquista/BA | B. do Choça     |
| 053 BA | -14.8703 | -40.6325 | Nanica       | Vitória da Conquista/BA | B. do Choça     |
| 001 BA | -13.2553 | -43.4182 | Prata anã    | Velho Chico/BA          | Bom J. da Lapa  |
| 002 BA | -13.2553 | -43.4182 | Prata anã    | Velho Chico/BA          | Bom J. da Lapa  |
| 003 BA | -13.2553 | -43.4182 | Prata anã    | Velho Chico/BA          | Bom J. da Lapa  |
| 004 BA | -13.2553 | -43.4182 | Prata anã    | Velho Chico/BA          | Bom J. da Lapa  |
| 005 BA | -13.2553 | -43.4182 | -            | Velho Chico/BA          | Bom J. da Lapa  |
| 006 BA | -13.2553 | -43.4182 | -            | Velho Chico/BA          | Bom J. da Lapa  |
| 007 BA | -13.2553 | -43.4182 | -            | Velho Chico/BA          | Bom J. da Lapa  |
| 008 BA | -13.2553 | -43.4182 | Prata anã    | Velho Chico/BA          | Bom J. da Lapa  |
| 009 BA | -13.3558 | -43.6592 | Grande Naine | Velho Chico/BA          | Bom J. da Lapa  |
| 011 BA | -13.2519 | -43.8006 | Grande Naine | Velho Chico/BA          | Bom J. da Lapa  |
| 012 BA | -13.3981 | -43.7606 | Grande Naine | Velho Chico/BA          | Bom J. da Lapa  |
| 019 BA | -13.3558 | -43.6622 | Grande Naine | Velho Chico/BA          | Bom J. da Lapa  |
| 034 BA | -13.3367 | -43.8278 | -            | Velho Chico/BA          | Bom J. da Lapa  |
| 038 BA | -13.3594 | -43.6583 | -            | Velho Chico/BA          | Bom J. da Lapa  |
| 039 BA | -13.3975 | -43.7606 | -            | Velho Chico/BA          | Bom J. da Lapa  |
| 042 BA | -13.3581 | -43.6622 | -            | Velho Chico/BA          | Bom J. da Lapa  |
| 063 BA | -13.8975 | -39.5267 | Prata        | Baixo Sul/BA            | Gandu           |
| 066 BA | -13.9036 | -29.6769 | -            | Baixo Sul/BA            | Gandu           |
| 081 BA | -12.6711 | -39.2469 | Prata Graúda | Recôncavo/BA            | Gov.Mangabeira  |
| 082 BA | -12.7381 | -39.1525 | Prata anã    | Recôncavo/BA            | Gov.Mangabeira  |
| 084 BA | -12.6839 | -39.2514 | Nanica       | Recôncavo/BA            | Gov. Mangabeira |
| 086 BA | -12.6822 | -39.2481 | Prata comum  | Recôncavo/BA            | Gov.Mangabeira  |
| 049 RN | -5.5311  | -36.8792 | Maçã/ Leite  | Vale do Açu/RN          | Ipanguaçu       |
| 050 RN | -5.5292  | -36.8783 | Maçã/ Leite  | Vale do Açu/RN          | Ipanguaçu       |
| 077 RN | -5.5278  | -36.8814 | Maçã/Leite   | Vale do Açu/RN          | Ipanguaçu       |
| 056 BA | -14.8267 | -39.5781 | -            | Litoral Sul/BA          | Itajuípe        |
| 057 BA | -14.8275 | -39.5742 | -            | Litoral Sul/BA          | Itajuípe        |
| 058 BA | -14.7219 | -39.6333 | -            | Litoral Sul/BA          | Itajuípe        |
| 059 BA | -14.8500 | -39.5867 | Prata comum  | Litoral Sul/BA          | Itajuípe        |
| 060 BA | -14.7447 | -39.3919 | Maçã         | Litoral Sul/BA          | Itajuípe        |
| 062 BA | -14.8481 | -39.5897 | -            | Litoral Sul/BA          | Itajuípe        |
| 065 BA | -14.8342 | -39.5817 | -            | Litoral Sul/BA          | Itajuípe        |
| 068 BA | -14.7567 | -39.4242 | Prata        | Litoral Sul/BA          | Itajuípe        |
| 069 BA | -14.8047 | -39.6431 | -            | Litoral Sul/BA          | Itajuípe        |
| 010 MG | -21.2412 | -45.0665 | Maçã         | Lavras/MG               | Lavras          |
| 024 MG | -21.2412 | -45.0665 | Maravilha    | Lavras/MG               | Lavras          |
| 027 MG | -21.2412 | -45.0665 | Prata anã    | Lavras/MG               | Lavras          |
| 031 MG | -21.2412 | -45.0665 | Prata anã    | Lavras/MG               | Lavras          |
| 040 MG | -21.2318 | -44.9940 | -            | Lavras/MG               | Lavras          |
| 041 MG | -21.2412 | -45.0665 | -            | Lavras/MG               | Lavras          |
| 045 MG | -21.2412 | -45.0665 | Prata anã    | Lavras/MG               | Lavras          |
| 046 MG | -21.2412 | -45.0665 | Maçã         | Lavras/MG               | Lavras          |
| 078 MG | -21.2318 | -44.9940 | -            | Lavras/MG               | Lavras          |
| 071 BA | -13.3756 | -38.9212 | -            | Baixo Sul/BA            | M. de S. Paulo  |
| 083 BA | -12.7131 | -39.1328 | Prata comum  | Recôncavo/BA            | Muritiba        |
| 085 BA | -12.7686 | -39.1417 | -            | Recôncavo/BA            | Muritiba        |
| 079 BA | -13.2035 | -39.5031 | -            | Vale do Jiquiriçá/BA    | Mutuípe         |

|        |          |          |             |                      |                |
|--------|----------|----------|-------------|----------------------|----------------|
| 080 BA | -13.2035 | -39.5031 | -           | Vale do Jiquiriçá/BA | Mutuípe        |
| 013 BA | -13.5978 | -39.5275 | Maçã        | Baixo Sul/BA         | Pres.T. Neves  |
| 014 BA | -13.4992 | -39.5469 | Prata comum | Baixo Sul/BA         | Pres.T. Neves  |
| 015 BA | -13.5522 | -39.5253 | Terra       | Baixo Sul/BA         | Pres.T. Neves  |
| 016 BA | -13.5753 | -39.5075 | Pacovan     | Baixo Sul/BA         | Pres.T. Neves  |
| 017 BA | -13.5944 | -39.5217 | Terra       | Baixo Sul/BA         | Pres.T. Neves  |
| 018 BA | -13.5669 | -39.5414 | Prata comum | Baixo Sul/BA         | Pres.T. Neves  |
| 020 BA | -13.5692 | -39.5253 | Pacovan     | Baixo Sul/BA         | Pres.T. Neves  |
| 064 BA | -13.4781 | -39.4875 | -           | Baixo Sul/BA         | Pres.T. Neves  |
| 021 BA | -14.8969 | -42.8392 | -           | Sertão Produtivo/BA  | S. Laranjeiras |
| 026 BA | -14.8603 | -42.8814 | Prata anã   | Sertão Produtivo/BA  | S. Laranjeiras |
| 028 BA | -14.7775 | -43.1111 | -           | Sertão Produtivo/BA  | S. Laranjeiras |
| 030 BA | -14.8003 | -42.9806 | -           | Sertão Produtivo/BA  | S. Laranjeiras |
| 032 BA | -14.8600 | -42.8814 | Prata anã   | Sertão Produtivo/BA  | S. Laranjeiras |
| 033 BA | -14.8956 | -42.9317 | -           | Sertão Produtivo/BA  | S. Laranjeiras |
| 037 BA | -14.8833 | -42.8392 | -           | Sertão Produtivo/BA  | S. Laranjeiras |
| 047 BA | -14.9047 | -42.9433 | -           | Sertão Produtivo/BA  | S. Laranjeiras |
| 052 BA | -14.7786 | -43.1236 | -           | Sertão Produtivo/BA  | S. Laranjeiras |
| 054 BA | -14.7975 | -43.1239 | -           | Sertão Produtivo/BA  | S. Laranjeiras |
| 055 BA | -14.9047 | -42.9433 | -           | Sertão Produtivo/BA  | S. Laranjeiras |
| 067 BA | -13.8228 | -39.6678 | Terra       | Baixo Sul/BA         | Teolândia      |
| 061 BA | -13.6894 | -39.2261 | -           | Baixo Sul/BA         | W. Guimarães   |
| 070 BA | -13.7853 | -39.5714 | -           | Baixo Sul/BA         | W. Guimarães   |

Abreviatura dos municípios: B. do Choça = Barra do Choça, Bom J. Lapa = Bom Jesus da Lapa, Gov. Mangabeira = Governador Mangabeira, M. S. Paulo = Morro de São Paulo, Pres. T. Neves = Presidente Tancredo Neves, S. Laranjeiras = Sebastião Laranjeiras, W. Guimarães = Wenceslau Guimarães.

### 2.3. Preservação dos isolados de *M. musicola*

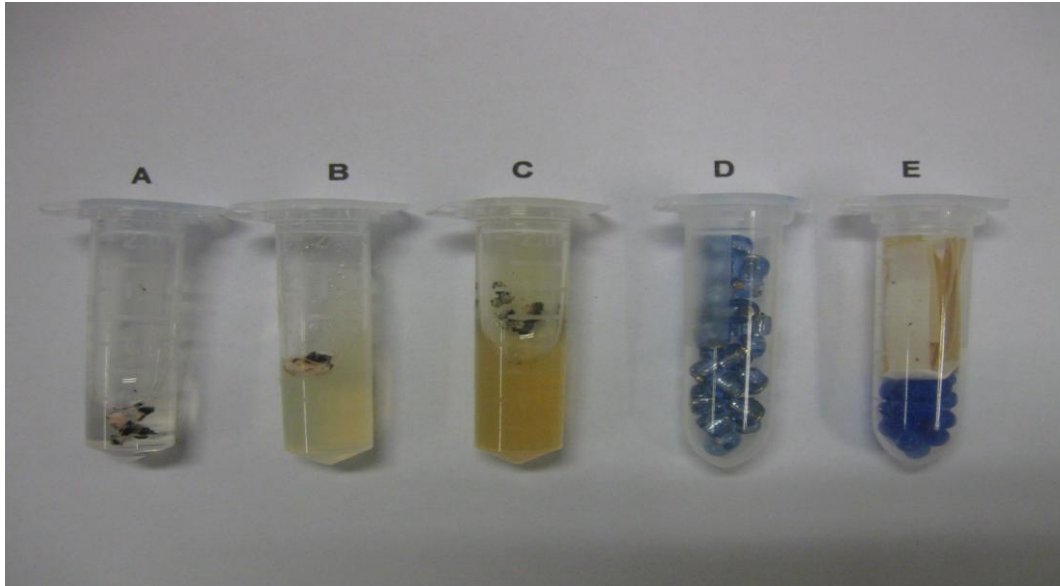
Foram utilizados cinco métodos de preservação para criação da micoteca (Figura 2), em duplicata e todos os procedimentos foram devidamente identificados, a citar: preservação tipo Castellani, BDA, BDA+Glicerol, Esferas de vidro (EV) e em Tiras de papel com Sílica gel.

Para a preservação tipo Castellani (Figura 2A), foi feito o armazenamento de porções de micélio do fungo em microtubos (2 mL), com 1 mL de água destilada e autoclavada. Os microtubos Castellani foram devidamente identificados e armazenados em temperatura ambiente longe da luz solar direta.

Para a preservação em meio BDA (Batata-dextrose-ágar) (Figura 2B), utilizou-se um estilete de ponta fina para a retirada do micélio do fungo, sendo acondicionado no meio BDA, levemente inclinado com o intuito de aumentar a superfície de contato do micélio com o meio. Foram feitos quatro microtubos para



cada isolado. Em dois destes, metade do volume foi completado com glicerol 20%, constituindo-se o terceiro método de preservação BDA+glicerol (Figura 2C).



**Figura 2.** Métodos de preservação do fungo *M. musicola*, causador da Sigatoka amarela em bananeira, à citar: Castellani (A) BDA (B), BDA+Glicerol (C), Esferas de vidro (D), Tiras de papel com sílica gel (E).

Para o método de preservação em Esferas de vidro (Figura 2D), leite desnatado (10%) estéril foi vertido em placas contendo colônias formadas, preparando assim uma suspensão do inóculo com a raspagem da placa. Posteriormente, foram adicionadas as esferas de vidro e misturadas à suspensão sendo posteriormente acondicionadas na tampa das placas para secarem por 30 minutos. Em seguida, as esferas de vidro foram colocadas nos microtubos e armazenados a 4 °C.

O último método realizado foi à preservação em Tiras de papel (Figura 2E) com sílica gel com indicador de umidade. Para isso, após a incubação do fungo, verteu-se leite desnatado (10%) estéril nas placas visando preparar uma suspensão fúngica com a raspagem da placa. Em seguida, foram adicionadas tiras de papel filtro (0,4 cm x 2,0 cm) dentro das placas de Petri para que ficassem embebidas na suspensão de leite com o fungo, as quais foram colocadas para secar na tampa da placa por aproximadamente 30 minutos. Anteriormente os tubos foram preenchidos até  $\frac{3}{4}$  da sua capacidade com sílica gel com indicador de umidade de granulometria

de 4 a 8 mm de diâmetro. Na superfície da sílica gel foi colocado um disco de papel filtro de diâmetro igual ao do frasco, evitando assim o contato das tiras de papel + suspensão fúngica com a sílica gel. E por fim, após secas, as tiras de papel com o inoculo foram acondicionadas nos microtubulos e armazenados a 4 °C.

## **2.4. Estimativa da variabilidade genética e estrutura populacional entre isolados de *M.musicola***

### **2.4.1. Extração de DNA e condições do PCR**

O DNA dos isolados da micoteca foi extraído pelo método CTAB (DOYLE e DOYLE, 1990) modificado. Após a primeira adição do TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM), foi acrescentado 200 µL de acetato de amônio a 7,5 M e homogeneizado por inversão e depois incubados a -20 °C por 15 minutos. Em seguida foi seguido o protocolo original.

### **2.4.2. Amplificação dos SSR**

Foram utilizados 20 *primers* SSR, conforme protocolo Zapater et al., (2008) e Molina et al, (2001), citados na Tabela 2. As reações foram completadas para um volume final de 15 µL, utilizando o Kit PROMEGA contendo os seguintes reagentes: Tampão Tris-HCl 15 mM (pH 8.3), MgCl<sub>2</sub> 45 mM, 100 µM de cada dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 0.9 µM do *primer*, 15 ng do DNA, 4,47 de água MiliQ e 0,15 µL *Taq polymerase* (PROMEGA).

As amplificações foram conduzidas em termociclador PTC-100 (MJ Research) com o seguinte programa: uma etapa inicial de desnaturação do DNA a 94° C por 3 min., seguido de 30 ciclos, cada um consistindo de: desnaturação a 94° C por 40 segundos; pareamento do *primer* a x °C (a depender da Ta: Temperatura de anelamento específica do *primer*) por 40 segundos e extensão do fragmento de DNA pela *Taq* polimerase a 72° C por 1 minuto seguido de extensão final a 72° C por 4 minutos e 10° C ∞.

**Tabela 2.** Iniciadores SSR (*simple sequence repeats*) utilizados na análise de variabilidade dos isolados de *M.musicola*. Cruz das Almas, 2013.

| Iniciadores | Seqüência dos nucleotídeos (5' - 3')                | Temperatura de anelamento (°C) | Tamanho esperado (pb) | Tamanho encontrado (pb) |
|-------------|---|--------------------------------|-----------------------|-------------------------|
| MmSSR 01    | F: TAGTTGCAACCGAACAGG<br>R: CTCCGTAGGTATGATGGTGT    | 55                             | 150                   | 128 - 207               |
| MmSSR 06    | F: CGAACAGGACGAAAGAATAG<br>R: GTTTGTTCAGTTCGTCAAG   | 55                             | 193                   | 186 - 216               |
| MmSSR 09    | F: AGGGACGAACAAAACAGAG<br>R: CCATGGTTTTCAAGCATATT   | 55                             | 268                   | 154 - 355               |
| MmSSR 10    | F: GAGAGCATGAAAAGTGGAAA<br>R: CGTGACACTCGTCAGTTACA  | 55                             | 171                   | 151 - 204               |
| MmSSR 15    | F: CTA CTGAGGCAGTCGCTAAC<br>R: GGAGAGGTGAAAAAGAAGT  | 55                             | 210                   | 182 - 218               |
| MmSSR 16    | F: CCATCTGCCTTGAGATAGTC<br>R: GAATTTATTCCAGCGAAGC   | 55                             | 220                   | -                       |
| MmSSR 30    | F: TGATGTTAAGTTGACGGACA<br>R: CTAAGCCAAACCTCAATCAG  | 58                             | 170                   | 131 - 524               |
| MmSSR 31    | F: AACCACATCTTCGATCAGG<br>R: CACATGGAATATCCTTGGC    | 58                             | 208                   | 207 - 253               |
| MmSSR 34    | F: CTCGCTGCCTGATTATTCT<br>R: AGATGGCATCGCTTCAC      | 47                             | 260                   | 250 - 290               |
| MmSSR 35    | F: TAACAATGTCCCTGAGAAGC<br>R: GCCTTATCTGGAAAGTATCGT | 50                             | 260                   | 160 - 422               |
| MmSSR 46    | F: CGTGGACCTATTGTCAACTC<br>R: TGGGTTACATTTACGAGAGAA | 53                             | 261                   | 212 - 313               |
| MmSSR 101   | F: TGTCCGGCCATTTTGATAG<br>R: ACTGCAGGTAGGTCTTTAG    | 53                             | 86                    | -                       |
| MmSSR 103   | F: CAAGCAAGCAAGCAAGCAC<br>R: TGGAAATGGGTCGGAAACG    | 62                             | 92                    | 102 - 137               |
| MmSSR 104   | F: TGAGAAGATGAATGTGAAGT<br>R: CTTGCGTAGGCGTGATA     | 55                             | 119                   | -                       |
| MmSSR 105   | F: GAAAGTGTTGGCGTGGTAGG<br>R: AGCGAAGATCAGAGGTTATG  | 57                             | 122                   | -                       |
| MmSSR 106   | F: AGCCTTG TAGATGTTTGTGT<br>R: ATGGAAGTTGCGAGAATGTT | 57                             | 141                   | -                       |
| MmSSR 108   | F: CCCGCTAAATGCCTATCTCG<br>R: AGTTTGC GTAATCTAAGTCG | 55                             | 159                   | -                       |
| MmSSR 109   | F: TCGAACAGCGACTTTATTC<br>R: CAAAAGCGGAAAATGGTCA    | 55                             | 186                   | -                       |
| MmSSR 110   | F: TCCGCATTTTCCCCAGTCCT<br>R: GCTATTCTTTCCACGCACAC  | 60                             | 199                   | -                       |
| MmSSR 111   | F: TTTCTTGTCACCTGTTTGC<br>R: TTCCTGGGAATGCTCTACGG   | 60                             | 220                   | -                       |

Ta: Temperatura de anelamento; F: Forward e R: Reverse.

Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose 1000 (INVITROGEN) a 4 %, 1X TBE (EDTA 2 mM e Tris-borato 90 mM), contendo brometo de etídio, 0.5  $\mu\text{l mL}^{-1}$  e os géis fotografados com o sistema Kodak de fotodocumentação (Gel Logic 212 PRO – Nova Analítica).

### 2.4.3. Amplificação dos ISSR

Para as amplificações foram utilizados 13 *primers* ISSRs (Tabela 3). As reações foram completadas para um volume final de 15  $\mu\text{L}$ , contendo os seguintes reagentes: KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8.3),  $\text{MgCl}_2$  2,4 mM, 100  $\mu\text{M}$  de cada dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 0.2  $\mu\text{M}$  do *primer* (*Operon Technologies, Alameda, CA, EUA*), 15 ng do DNA e uma unidade de Taq *polymerase* (FERMENTAS).

**Tabela 3.** Características dos marcadores ISSRs utilizados para amplificar os isolados de *Mycosphaerella musicola* da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, 2013.

| Primer   | Motivo       | Sequencia 5' - 3'       | Ta |
|----------|--------------|-------------------------|----|
| ISSR 12  | DiGA3'RC     | GAG AGA GAG AGA GAG ARC | 48 |
| ISSR 31  | TriCAC5'CR   | CRC ACC ACC ACC ACC AC  | 48 |
| ISSR 33  | TriCAG       | CAG CAG CAG CAG CAG     | 50 |
| ISSR 35  | Tri CAG 3'YC | CAG CAG CAG CAG CAG YC  | 48 |
| ISSR 36  | Tri CAG 5'CR | CRC AGC AGC AGC AGC AG  | 50 |
| ISSR 39  | Tri GTG 3'RC | GTG GTG GTG GTG GTG RC  | 50 |
| ISSR 58  | Tri ACG 3'RC | ACG ACG ACG ACG ACG RC  | 50 |
| ISSR 66  | TriTAG 3'RC  | TAG TAG TAG TAG TAG RC  | 48 |
| ISSR 86  | Tri CGA 3'RC | CGA CGA CGA CGA CGA RC  | 50 |
| ISSR 90  | Tri GAA 3'RC | GAA GAA GAA GAA GAA RC  | 50 |
| ISSR 94  | Tri GTA 3'RC | GTA GTA GTA GTA GTA RC  | 48 |
| ISSR 101 | Tri GGA 3'RC | GGA GGA GGA GGA GGA RC  | 48 |

Ta: Temperatura de anelamento:

Para os ISSR as amplificações foram conduzidas em termociclador PTC-100 (MJ Research) com o seguinte programa: uma etapa inicial de desnaturação do DNA a 95° C por 1 minuto, seguido de 39 ciclos, cada um consistindo de: desnaturação a 94° C por 1 minuto; pareamento do *primer* a x °C (a depender da Ta: Temperatura

de anelamento específica do *primer*) por 1 minuto e extensão do fragmento de DNA pela *Taq* polimerase a 72° C por 1 minuto, seguido de uma extensão final por 10 minutos e 10° C ∞. Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose 2,5%, 1X TBE (EDTA 2 mM e Tris-borato 90 mM), contendo brometo de etídio, 0.5 µL mL<sup>-1</sup> e os géis fotografados com o sistema Kodak de fotodocumentação (Gel Logic 212 PRO – Nova Analítica).

#### 2.4.4. Estrutura populacional

Os haplótipos foram identificados pelo programa SNAP Workbench (PRICE e CARBONE, 2005). Todas as análises foram realizadas separadamente com os *primers* SSR, ISSR e os combinados (SSR/ISSR). A AMOVA foi realizada com auxílio do programa Arlequin 3.5.1.2 (EXCOFFIER e LISCHER, 2010). Já a matriz de distância em função da distância genética de Nei (1973) foram utilizadas para construção de um dendrograma com os municípios por meio do método UPGMA, com o uso do programa Popgene 1.32 (YEH e BOYLE, 1997).

Para testar a relação entre distância genética e geográfica dos isolados de *M. musicola* foi usado o teste de Mantel, com 1000 permutações, por meio do pacote “vegan” implementado no programa de análise estatística R (MANTEL, 1967; R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012).

Para calcular a diferenciação genética entre os Estados foi utilizado à estatística F de Wright, e seu estimador o  $G_{ST}$ , o qual é comumente usado para análises de biologia populacional em fungos haploides, por meio do programa Popgene 1.32 (YEH e BOYLE, 1997). Os valores de  $G_{ST}$  foram utilizados para calcular o número de migrantes por geração ( $N_m$ ), a partir da fórmula:  $N_m = 0,5 (1 - G_{ST})/G_{ST}$  (McDERMOTT e McDONALD, 1993).

Os valores de riqueza foram estimados com base no número de haplótipos para a população total e suas subpopulações (localidades). Para mensurar a diversidade genotípica (riqueza e equitabilidade), foram calculados os índices de Shannon-Wiener (1949), Hill (1973), Índice de Simpson ( $\lambda$ ) (1949) e Stoddart e Taylor ( $G'$ ) (1988), além do índice  $E5 = [(G-1)/(N1-1)]$  (1988) que mede quão equânime é a distribuição da variabilidade pelo Software R, pacote ‘vegan’.

A estimativa do desequilíbrio de ligação ( $I_A$  e  $rd$ ) foi estimada em comparação com a distribuição esperada para os loci quando em associação para a população total, os Estados, microrregiões e municípios. O índice multilocus para desequilíbrio de ligação  $rd$  foi estimado e a hipótese nula  $rd = 0$  (equilíbrio gamético) foi testada por 1.000 permutações, usando o Programa Multilocus (AGAPOW e BURT, 2001). O índice  $rd$  é uma modificação do índice de associação  $I_A$  definida por Maynard Smith et al. (1993), para remover a dependência do número de loci (AGAPOW e BURT, 2001).

Para inferir a estrutura da população, foi realizada uma análise de agrupamento genética utilizando o programa Structure 2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000). O conjunto de dados foi analisado utilizando o modelo de mistura. O número de Cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC) foi de 500.000 repetições, com o burnin de 250.000. Os demais parâmetros foram definidos com os valores padrão. O número de grupos de base ( $k$ ) variou de 1 a 40 e a análise foi realizada quatro vezes independentes.

## **2.5. Período de incubação de *M. musicola***

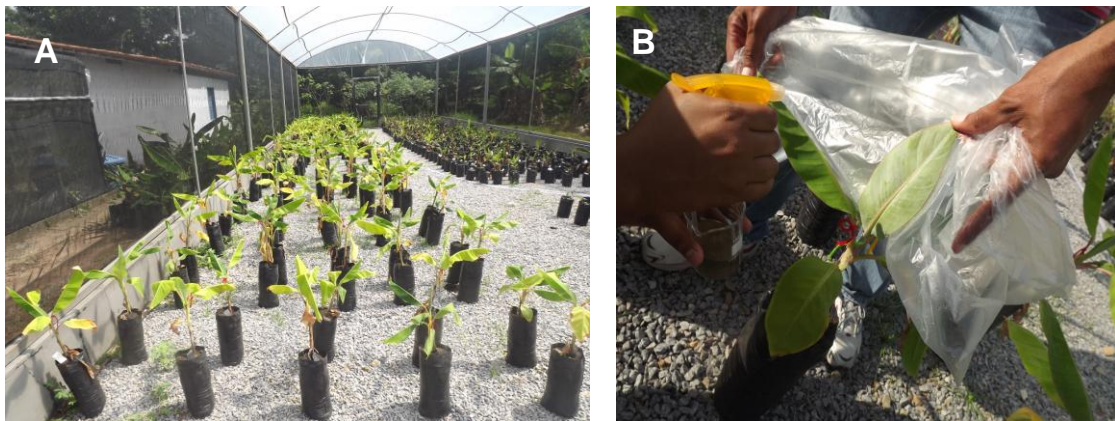
O experimento foi montado em fevereiro de 2013, utilizando a cultivar Prata Gorutuba (suscetível à Sigatoka-amarela) (Figura 3A), com 17 isolados escolhidos aleatoriamente da micoteca de *M. musicola* da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia. Os isolados pertenciam às microrregiões de Baixo Sul (13 BA, 18 BA, 61 BA, 64 BA, 66 BA, 70 BA, 71 BA), Vitória da Conquista (18 BA, 25 BA, 29 BA, 53 BA), Velho Chico (02 BA, 11 BA), Sertão Produtivo (26 BA), Litoral Sul (65 BA), Chapada do Apodi (48 RN) e Lavras (41 MG).

Em câmara de fluxo laminar, após 15 dias de incubação em BOD, procedeu-se à maceração de colônias de isolados de *M. musicola* adicionando-se 4 mL de água destilada estéril formando assim, uma suspensão do fungo. Em seguida, foram distribuídas por toda a superfície das placas de Petri contendo meio V8, sendo feitas 10 placas para cada isolado, cada uma com 360  $\mu$ L da suspensão. As placas foram seladas com filme plástico e deixadas dentro de sacos plásticos em temperatura ambiente.

Após 10 dias de incubação, adicionaram-se 5 mL de água destilada estéril sobre as colônias e procedeu-se à liberação dos conídios utilizando escova de dente com movimentos suaves. O volume da suspensão foi ajustado para 30 mL, à suspensão foi filtrada e sua concentração quantificada em câmara de Neubauer. Com as devidas diluições, ajustou-se a concentração de esporos para  $4 \times 10^4$  conídios/mL.

As inoculações foram realizadas com atomizador plástico nas folhas 1 e 2 das mudas da cultivar Prata Gorotuba até o ponto de escoamento (Figura 3B). Depois de inoculadas, as folhas foram marcadas com fitas coloridas, para que as avaliações fossem sempre nas mesmas folhas.

Foi avaliado o Período de incubação (PI), que é o tempo decorrido, em dias, entre a inoculação e o aparecimento dos primeiros sintomas de Sigatoka-amarela em qualquer uma das folhas inoculadas. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) e teste de médias Scott-knott a 5% de probabilidade para o período de incubação.



**Figura 3.** Experimento de patogenicidade montado em casa de vegetação na Embrapa Mandioca e Fruticultura com a variedade Prata Gorotuba e 17 isolados de *M. musicola* (A); Inoculação na parte abaxial da folha de bananeira com um atomizador de plástico até o ponto de escoamento (B).

### 3. RESULTADOS

Um total de 199 amostras foi coletado em 16 municípios de 11 microrregiões produtoras de banana nos Estados da Bahia, Rio Grande do Norte e Minas Gerais (Figura 4). Destas foi possível isolar e preservar 86 isolados (43,22%) de *Mycosphaerella musicola* em Castellani (1967), BDA, BDA+Glicerol, Tiras de papel com sílica gel e Esferas de Vidro.

Dos 86 isolados obtidos, 83 foram utilizados no presente estudo (Tabela 1). Em que os isolados foram analisados por meio dos marcadores microssatélites (SSR), pelos ISSR e pela combinação dos dois (SSR/ISSR).



**Figura 4.** Localização dos locais de coleta dos isolados de *M. musicola*, nos três Estados, Bahia, Minas Gerais e Rio Grande do Norte. Cruz das Almas, 2013.



### 3.1. Primers SSR

Foi encontrada alta variabilidade entre os isolados de *M. musicola*, pois 98,79% foram haplótipos únicos, apenas o H1 foi o mesmo para dois isolados coletados em Bom Jesus da Lapa, o isolado 2 e o 38.

Os isolados de cada localidade também foram avaliados quanto à composição genética com base no agrupamento Bayesiano, para isso foi utilizado o programa Structure versão 2.3.4. A análise inferiu a presença de 14 prováveis grupos ancestrais para localidades em estudo. Contudo, um grupo (cor) foi mais evidente, representado pela cor verde conforme o gráfico (Figura 5).

Os isolados dos demais grupos (cores) foram formados por uma mistura dos 14 grupos (cores), tendo uma composição variada. Por exemplo, o isolado 16, possui aproximadamente 5% do grupo representado pelo verde, e o restante de sua composição foi formada pelos demais grupos (cores). Isso ocorre com os outros isolados que se apresentam posteriormente a ele, evidenciado a formação de uma população clonal (Figura 5).

O teste de Mantel é um teste para estimar a correlação entre as distâncias genéticas e as distâncias geográficas, para os *primers* SSR foi de 0,16 ( $P \leq 0,01$ ).

A AMOVA foi utilizada para estimar a origem da variabilidade genética dos isolados em estudo (Tabela 4). De acordo com a análise, percebe-se que ocorreu maior variação dentro de municípios 90,0% ( $P \leq 0,01$ ) do que entre municípios dentro de Estado.

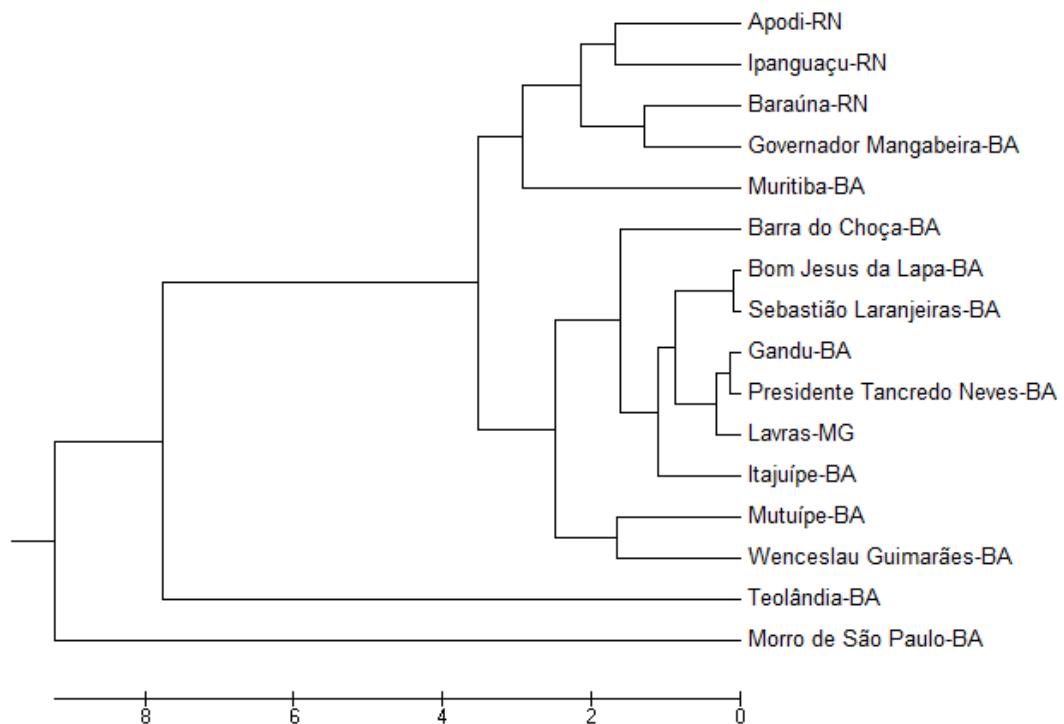
**Tabela 4.** Variabilidade genética dos isolados de *Mycosphaerella musicola* com base na análise molecular da variância (AMOVA) dos *primers* SSR. Cruz das Almas, 2013.

| Fonte de variação                    | GL | Componentes da variância | Porcentagem da variação | F         | P       |
|--------------------------------------|----|--------------------------|-------------------------|-----------|---------|
| Entre Estados                        | 2  | 0,29159                  | 5,73                    | 0,05730   | 0,04594 |
| Entre municípios dentro de Estado    | 13 | 0,21710                  | 4,27                    | 0,04526   | 0,01271 |
| Entre haplótipos dentro de município | 67 | 4,58023                  | 90,00                   | 0,09996** | 0,00293 |
| TOTAL                                | 82 | 5,08893                  |                         |           |         |

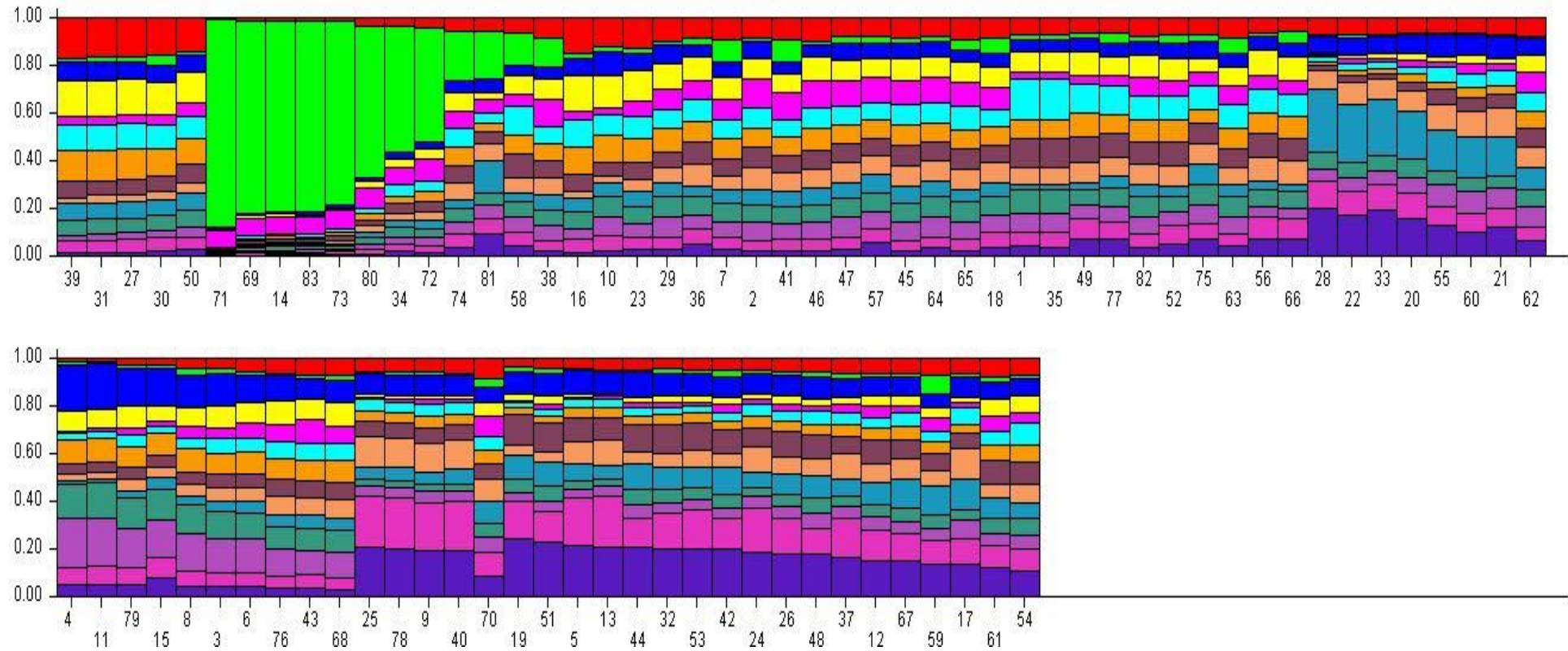
F= Índice de Fixação; P= Significância, GL= Grau de liberdade. \*\*  $P < 0,001$ , <sup>ns</sup> = não significativo.

Em relação à estrutura populacional o dendrograma formado pelos municípios (Figura 6) percebe-se que os municípios do Rio Grande do Norte ficaram agrupados. Exceto por Baraúna (Rio Grande do Norte) que ficou mais próximo de Governador Mangabeira (Bahia) mesmo estando distantes aproximadamente 1000 Km.

O município de Lavras (Minas Gerais) no dendrograma ficou próximo ao município de Presidente Tancredo Neves pertencente ao Estado da Bahia mesmo estando distantes aproximadamente, 1.380 Km. Regiões próximas como Bom Jesus da Lapa e Sebastião Laranjeiras ficaram próximas no dendrograma, as mesmas estão distantes aproximadamente, 240 Km. Os municípios de Teolândia e Morro de São Paulo, ambos localizados na Bahia, ficaram agrupados isoladamente. Os demais municípios da Bahia ficaram distribuídos por todo o dendrograma.



**Figura 6.** Dendrograma baseado na distância genética de Nei (1972) dos 16 municípios de *M. musicola* com o uso dos *primers* SSR. Cruz das Almas, 2013.



**Figura 5.** Análise de agrupamento de *Mycosphaerella musicola* das diferentes localidades com o uso dos primers SSR. Cada barra na figura dividida em cores de K representa um indivíduo, onde K é o número de agrupamentos (assumido  $k = 14$ ). Os isolados são ordenados por sua probabilidade de adesão ao grupo.

A diferenciação genética estimada com o uso dos SSR foi de aproximadamente 0,03 entre Bahia e Minas Gerais, 0,09 entre Bahia e Rio Grande do Norte e 0,11, entre Minas Gerais e o Rio Grande do Norte. O fluxo gênico ( $N_m$ ) foi de aproximadamente 15,7 entre Bahia e Minas Gerais, 4,8 entre Bahia e Rio Grande do Norte e 3,8, entre Minas Gerais e o Rio Grande do Norte (Tabela 5).

**Tabela 5.** Diferenciação genética estimada pelo índice de  $G_{st}$  (diagonal acima) e fluxo gênico (diagonal abaixo,  $N_m$ ) para as três localidades: Bahia, Minas Gerais e Rio Grande do Norte com o uso dos primers SSR. Cruz das Almas, 2013.

| Local               | Bahia   | Minas Gerais | Rio Grande do Norte |
|---------------------|---------|--------------|---------------------|
| Bahia               | ***     | 0,0308       | 0,0928              |
| Minas gerais        | 15,7477 | ***          | 0,1140              |
| Rio Grande do Norte | 4,8867  | 3,8845       | ***                 |

A hipótese de recombinação sexual não foi aceita para as populações em estudo pelo índice de associação ( $I_A$ ) e o desequilíbrio de ligação multilocus ( $rd$ ), exceto para a população total, para Bahia em nível de Estado, e para as microrregiões Velho Chico (município Bom Jesus da Lapa), Sertão produtivo (município Sebastião Laranjeiras), Litoral Sul (município Itajuípe) localizadas no Estado da Bahia e a microrregião Mossoró (município Baraúna) localizada no Estado do Rio Grande do Norte, em que os valores de associação multilocus foram significativos (Tabela 6), indicando a hipótese de recombinação sexual.

Diferenças foram encontradas para os índices de diversidade nas populações. Considerado o índice de Shannon, a diversidade encontrada na Bahia (4,1) foi mais alta que a diversidade de Minas Gerais (2,1) e do Rio Grande do Norte (2,3). Os dados encontrados para o índice de Hill e o Índice Stoddart e Taylor foram semelhantes (Tabela 7). Quanto ao índice de Simpson, os valores de diversidade do Estado da Bahia (0,028), Rio Grande do Norte (0,03) e Minas Gerais (0,04). Para os valores de equitabilidade, apenas Bom Jesus da Lapa variou pois foi o único local que apresentou dois isolados com o mesmo haplótipo (Tabela 7).

**Tabela 6 .** Valores de  $I_A$  e rd para os isolados de *Mycosphaerella musicola* utilizando 11 primers SSRs. Cruz das Almas, 2013.

| Localidades/SSR                  | *N | $I_A$ Mín. | $I_A$ Máx. | $I_A$ Obs.             | rd Mín.  | rd Máx.  | rd Obs.                |
|----------------------------------|----|------------|------------|------------------------|----------|----------|------------------------|
| <b>Bahia</b>                     | 63 | -0,22061   | 0,319761   | 0,288462**             | -0,00615 | 0,008909 | 0,008037**             |
| <b>Velho Chico</b>               | 14 | -0,52358   | 1,04326    | 0,595589*              | -0,01905 | 0,037967 | 0,021675*              |
| <i>Bom Jesus da Lapa</i>         | 14 | -0,52358   | 1,04326    | 0,595589*              | -0,01905 | 0,037967 | 0,021675*              |
| <b>Baixo Sul</b>                 | 13 | -0,53059   | 0,904554   | 0,155589 <sup>ns</sup> | -0,02    | 0,034089 | 0,005864 <sup>ns</sup> |
| <i>Gandu</i>                     | 2  | -          | -          | -                      | -        | -        | -                      |
| <i>Morro de São Paulo</i>        | 1  | -          | -          | -                      | -        | -        | -                      |
| <i>Presidente Tancredo Neves</i> | 7  | -0,76438   | 1,84384    | 0,424658 <sup>ns</sup> | -0,03649 | 0,088015 | 0,020271 <sup>ns</sup> |
| <i>Wenceslau Guimarães</i>       | 2  | -          | -          | -                      | -        | -        | -                      |
| <i>Teolândia</i>                 | 1  | -          | -          | -                      | -        | -        | -                      |
| <b>Sertão Produtivo</b>          | 11 | -0,52546   | 1,20277    | 0,440939*              | -0,02412 | 0,055203 | 0,020238*              |
| <i>Sebastião Laranjeiras</i>     | 11 | -0,52546   | 1,20277    | 0,440939*              | -0,02412 | 0,055203 | 0,020238*              |
| <b>Vitória da Conquista</b>      | 8  | -0,69677   | 1,83166    | 0,458194 <sup>ns</sup> | -0,035   | 0,092016 | 0,023018 <sup>ns</sup> |
| <i>Barra do Choça</i>            | 8  | -0,69677   | 1,83166    | 0,458194 <sup>ns</sup> | -0,035   | 0,092016 | 0,023018 <sup>ns</sup> |
| <b>Litoral Sul</b>               | 9  | -0,62162   | 1,31375    | 0,562867*              | -0,0261  | 0,055166 | 0,023636*              |
| <i>Itajuípe</i>                  | 9  | -0,62162   | 1,31375    | 0,562867*              | -0,0261  | 0,055166 | 0,023636*              |
| <b>Vale do Jiquiriçá</b>         | 2  | -          | -          | -                      | -        | -        | -                      |
| <i>Mutuípe</i>                   | 2  | -          | -          | -                      | -        | -        | -                      |
| <b>Recôncavo</b>                 | 6  | -0,79004   | 1,6121     | 0,117438 <sup>ns</sup> | -0,03953 | 0,080656 | 0,005876 <sup>ns</sup> |
| <i>Governador Mangabeira</i>     | 4  | -          | -          | -                      | -        | -        | -                      |
| <i>Muritiba</i>                  | 2  | -          | -          | -                      | -        | -        | -                      |
| <b>Rio Grande do Norte</b>       | 11 | -0,60082   | 1,42993    | 0,29824 <sup>ns</sup>  | -0,02102 | 0,050016 | 0,010432 <sup>ns</sup> |
| <b>Mossoró</b>                   | 5  | -0,85417   | 2,16667    | 1,59375*               | -0,05694 | 0,144444 | 0,10625*               |
| <i>Baraúna</i>                   | 5  | -0,85417   | 2,16667    | 1,59375*               | -0,05694 | 0,144444 | 0,10625*               |
| <b>Chapada do Apodi</b>          | 3  | -          | -          | -                      | -        | -        | -                      |
| <i>Apodi</i>                     | 3  | -          | -          | -                      | -        | -        | -                      |
| <b>Vale do Açu</b>               | 3  | -          | -          | -                      | -        | -        | -                      |
| <i>Ipanguaçu</i>                 | 3  | -          | -          | -                      | -        | -        | -                      |
| <b>Minas Gerais</b>              | 9  | -0,65049   | 1,60194    | 0,203883 <sup>ns</sup> | -0,0262  | 0,064517 | 0,008211 <sup>ns</sup> |
| <b>Lavras</b>                    | 9  | -0,65049   | 1,60194    | 0,203883 <sup>ns</sup> | -0,0262  | 0,064517 | 0,008211 <sup>ns</sup> |
| <i>Lavras</i>                    | 9  | -0,65049   | 1,60194    | 0,203883 <sup>ns</sup> | -0,0262  | 0,064517 | 0,008211 <sup>ns</sup> |
| <b>TOTAL/SSR</b>                 | 83 | -0,19625   | 7,97409    | 0,293158**             | -9,57626 | 9,49836  | 0,007559**             |

Locais sublinhados e negrito = Estado, negrito = microrregiões, itálico = municípios.

**Tabela 7.** Parâmetros de diversidade genética para os Estados e microrregiões de *M. Musicola*, com os primers SSR, Cruz das Almas, 2013.

| SRR                    | *N | H'                      | N1                    | G'                    | $\lambda$                | E (gn) | E (g) | E5   |
|------------------------|----|-------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|--------|-------|------|
| <b>Rio G. do Norte</b> | 11 | 2,3979<br>(2,06 - 2,73) | 11,0<br>(8,90 - 13,0) | 11,0<br>(9,0 - 13,0)  | 0,0909<br>(0,02 - 0,15)  | 11     | 9     | 1    |
| Apodí                  | 3  | -                       | -                     | -                     | -                        | -      | -     | -    |
| Baraúna                | 5  | 1,6094<br>(1,13 - 2,07) | 5,0<br>(3,53 - 6,46)  | 5,0<br>(4,0 - 6,0)    | 0,2000<br>(0,01 - 0,38)  | 5      | -     | 1    |
| Ipanguaçu              | 3  | -                       | -                     | -                     | -                        | -      | -     | -    |
| <b>BAHIA</b>           | 63 | 4,1431<br>(3,99 - 4,28) | 63,0<br>(57,8 - 68,1) | 63,0<br>(58,0 - 68,0) | 0,0159<br>(0,01 - 0,02)  | 62     | 8,97  | 1    |
| Barra do Choça         | 8  | 2,0794<br>(1,69 - 2,45) | 8,0<br>(6,14 - 9,85)  | 8,0<br>(6,0 - 10,0)   | 0,1250<br>(0,01 - 0,23)  | 8      | -     | 1    |
| B. Jesus da Lapa       | 14 | 2,6156<br>(2,31 - 2,91) | 13,7<br>(11,2 - 16,1) | 13,2<br>(11,0 - 16,0) | 0,0756<br>(0,02 - 0,13)  | 13     | -     | 0,96 |
| Gandu                  | 2  | -                       | -                     | -                     | -                        | -      | -     | -    |
| G. Mangabeira          | 4  | 1,3863<br>(0,85 - 1,91) | 4,0<br>(2,66 - 5,33)  | 4,0<br>(3,0 - 5,0)    | 0,2500<br>(-0,03 - 0,53) | 4      | -     | 1    |
| Itajuípe               | 9  | 2,1972<br>(1,83 - 2,55) | 9,0<br>(7,07 - 10,9)  | 9,0<br>(7,0 - 11,0)   | 0,1111<br>(0,02 - 0,20)  | 9      | -     | 1    |
| Morro de S. Paulo      | 1  | -                       | -                     | -                     | -                        | -      | -     | -    |
| Muritiba               | 2  | -                       | -                     | -                     | -                        | -      | -     | -    |
| Mutuípe                | 2  | -                       | -                     | -                     | -                        | -      | -     | -    |
| P. Tancredo Neves      | 7  | 1,9459<br>(1,52 - 2,36) | 7,0<br>(5,33 - 8,66)  | 7,0<br>(5,0 - 9,0)    | 0,1429<br>(0,01 - 0,27)  | 7      | -     | 1    |
| S. Laranjeiras         | 11 | 2,3979<br>(2,06 - 2,73) | 11,0<br>(8,83 - 13,1) | 11,0<br>(9,0 - 13,0)  | 0,0909<br>(0,02 - 0,15)  | 11     | -     | 1    |
| Teolândia              | 1  | -                       | -                     | -                     | -                        | -      | -     | -    |
| W. Guimarães           | 2  | -                       | -                     | -                     | -                        | -      | -     | -    |
| <b>MINAS GERAIS</b>    | 9  | 2,1972<br>(1,82 - 2,56) | 9,0<br>(7,04 - 10,9)  | 9,0<br>(7,0 - 11,0)   | 0,1111<br>(0,02 - 0,20)  | 9      | 9     | 1    |
| Lavras                 | 9  | 2,1972<br>(1,82 - 2,56) | 9,0<br>(7,04 - 10,9)  | 9,0<br>(7,0 - 11,0)   | 0,1111<br>(0,02 - 0,20)  | 9      | -     | 1    |
| <b>TOTAL</b>           | 83 | 4,4188<br>(4,29 - 4,54) | 83,0<br>(77,2 - 88,7) | 83,0<br>(77,0 - 89,0) | 0,0120<br>(0,008 - 0,01) | 82     | -     | 1    |

\*N= População total; H'= Índice de Shannon; N1= Índice de Hill; G'= índice de Stoddart e Taylor;  $\lambda$ = Índice de Simpson; E (gn) = Riqueza; E (g) = Riqueza após calculo da raferação para o menor valor (n=9); E<sub>5</sub> = Equitabilidade calculada por (G-1)/(N1-1).

### 3.2. Primers ISSR

Com o uso dos primers ISSR, foi encontrada alta variabilidade entre os isolados de *M. musicola*, pois 83,13% dos isolados são haplótipos únicos. Os locais que apresentaram os mesmos haplótipos foram H23 com os isolados 33 (Sebastião Laranjeiras-BA) e 42 (Bom Jesus da Lapa-BA), H29 com os isolados 20 (Pres. Tancredo Neves-BA), 24 (Lavras-MG), 36 (Barra do Choça-BA), 71 (Morro de São Paulo-BA), 79 (Mutuípe-BA), H30 com os isolados 47 e 55 ambos de Sebastião

Laranjeiras, H35 com os isolados 74 (Baraúna-RN) e 78 (Lavras-MG), H36 com os isolados 61 (Wenceslau Guimarães-BA) e 68 (Itajuípe-BA), H53 com os isolados 50 (Ipanguaçu-RN) e 53 (Barra do Choça-BA), H55 com os isolados 40 (Lavras-MG) e , 85 (Muritiba-BA), H59 com os isolados 25 (Barra do Choça-BA) e 81 (Governador Mangabeira-BA), H66 com os isolados 6 (Bom Jesus da Lapa-BA) e 69 (Itajuípe-BA) e H68 com os isolados 21 (Sebastião Laranjeiras), 23 (Barra do Choça), 70 (Wenceslau Guimarães-BA), os demais foram haplótipos únicos.

A composição genética dos isolados de cada localidade foram avaliadas com base no agrupamento Bayesiano, para isso foi utilizado o programa Structure versão 2.3.4. A análise inferiu a presença de 14 prováveis grupos ancestrais para localidades em estudo, assim como com o uso dos *primers* SSR. Contudo, quatro grupos foram mais evidentes, representados pelas cores vermelho, azul claro, azul turquesa e rosa conforme o gráfico (Figura 7).

Os isolados dos demais grupos foram formados por uma mistura dos 14 grupos (cores), tendo uma composição variada. Por exemplo, o isolado 70, possui aproximadamente 5% do grupo representado pelo vermelho, e o restante de sua composição é dado pelos demais grupos (cores). Isso ocorre com os outros isolados que se apresentam posteriormente a ele, evidenciado a formação de uma população clonal (Figura 7).

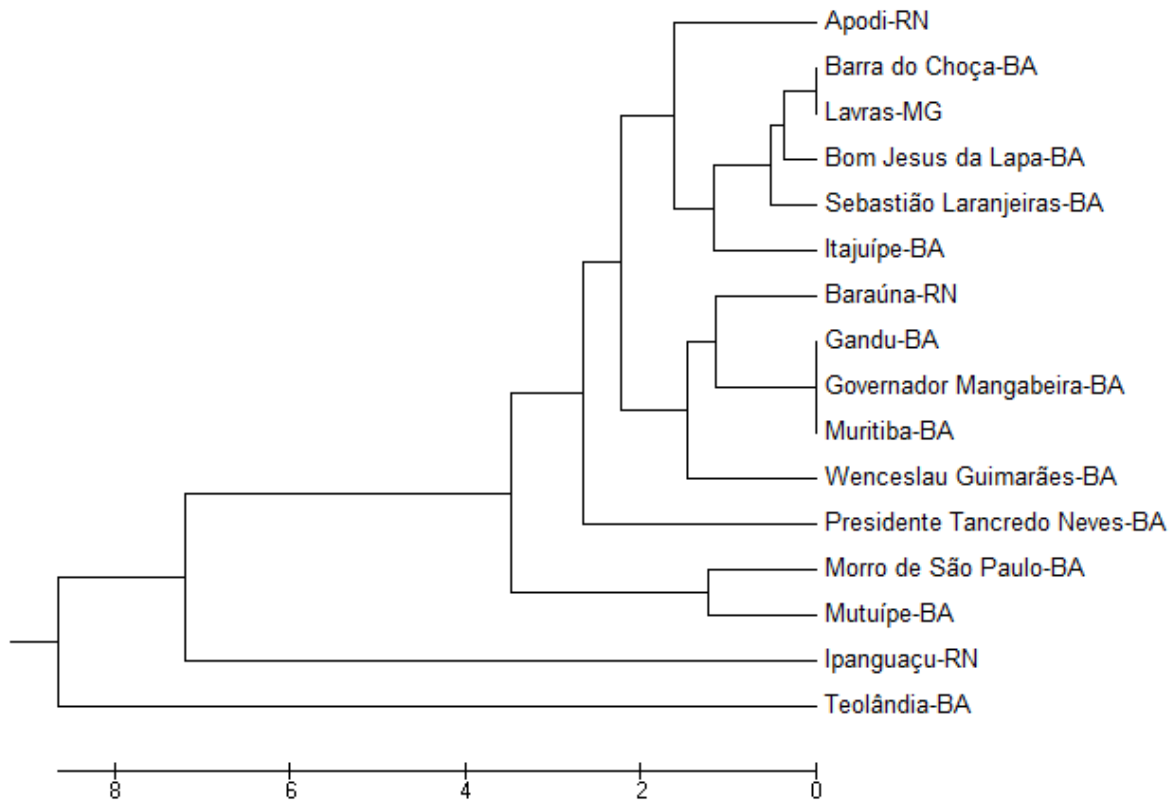
O teste de Mantel, que é utilizado para estabelecer uma correlação entre a matriz genética e a matriz com as coordenadas geográfica, foi de 0,03, sendo não significativo ( $P \geq 0,05$ ). Já a AMOVA realizada com os ISSR, ocorreu maior variação genética dentro de municípios (97,57%) e não entre municípios dentro de Estado, no entanto não houve significância (Tabela 8).

**Tabela 8.** Variabilidade genética dos isolados de *Mycosphaerella musicola* com base na análise molecular da variância (AMOVA) dos primers ISSR. Cruz das Almas, 2013.

| Fonte de variação                    | GL        | Componentes da variância | Porcentagem da variação | F                     | P       |
|--------------------------------------|-----------|--------------------------|-------------------------|-----------------------|---------|
| Entre Estados                        | 2         | 0,00321                  | 0,08                    | 0,00082               | 0,45650 |
| Entre municípios dentro de Estado    | 13        | 0,09139                  | 2,35                    | 0,02351               | 0,26002 |
| Entre haplótipos dentro de município | 67        | 3,79648                  | 97,57                   | 0,02431 <sup>ns</sup> | 0,17693 |
| <b>TOTAL</b>                         | <b>82</b> | <b>3,89108</b>           |                         |                       |         |

F= Índice de Fixação; P= Significância, GL= Grau de liberdade. \*\*P < 0,001, ns = não significativo.

Em relação ao dendrograma formado pelos municípios (Figura 8), percebe-se que os municípios do Rio Grande do Norte não ficaram agrupados, já Lavras (MG) e Barra do Choça (BA) apresentaram 100% de similaridade, embora estejam a aproximadamente 1.147 Km de distância. Assim como, Gandu, Governador Mangabeira e Muritiba apresentaram 100% de similaridade, sendo que estão localizados no Estado da Bahia. O município de Muritiba e Governador Mangabeira estão distantes aproximadamente 10,4 Km e Gandu está distante aproximadamente 153 Km e 163 Km respectivamente de Muritiba e de Governador Mangabeira. Os municípios de Teolândia (BA) e Ipanguaçu (RN) ficaram agrupados isoladamente. E os demais municípios ficaram dispersos pelo dendrograma.



**Figura 8.** Dendrograma baseado na distância genética de Nei (1972) dos 16 municípios de *M. musicola* com o uso dos *primers* ISSR. Cruz das Almas, 2013.

A diferenciação genética estimada pela média com o uso dos *primers* ISSR foi de aproximadamente 0,02 entre Bahia e Minas Gerais, 0,04 entre Bahia e Rio Grande do Norte e 0,06 entre Minas Gerais e o Rio Grande do Norte. E o fluxo



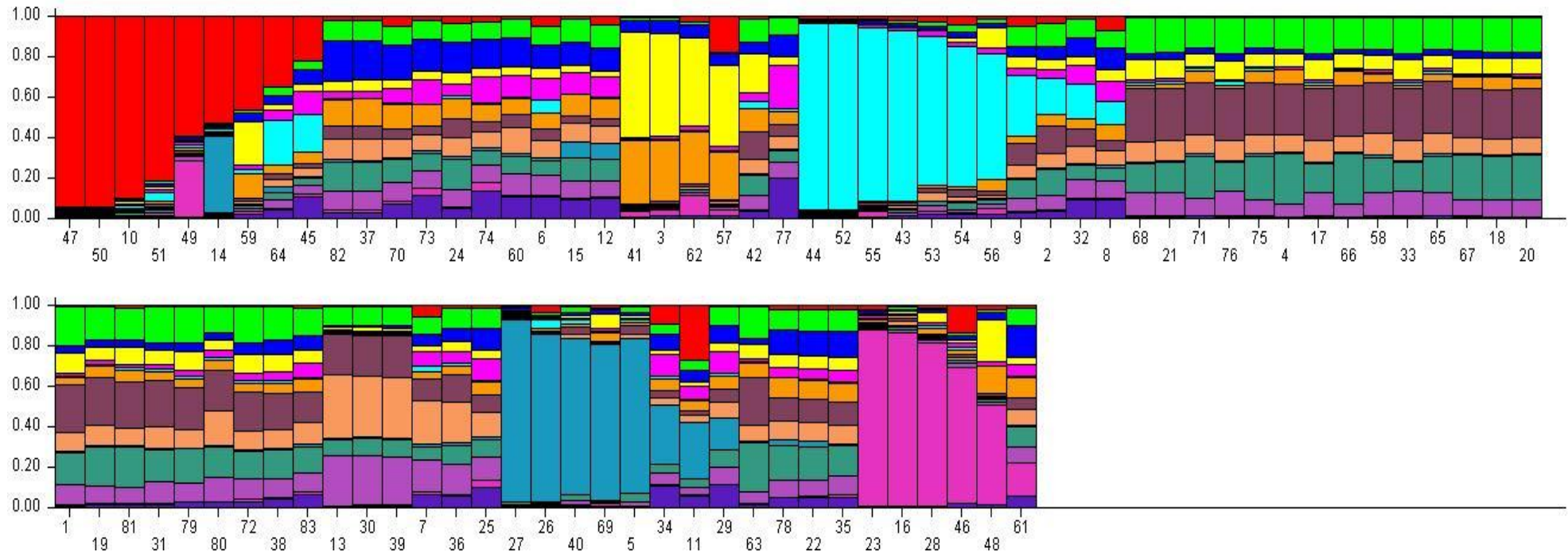
gênico ( $N_m$ ) para os *primers* ISSR foi de aproximadamente 20,2 entre Bahia e Minas Gerais, 11,9 entre Bahia e Rio Grande do Norte e 7,2 entre Minas Gerais e o Rio Grande do Norte (Tabela 9). O valor do fluxo gênico foi alto entre todos os Estados, principalmente entre Bahia e Minas, o que provavelmente deve ter ocorrido devido a proximidade entre os Estados, o que deve ter facilitado a dispersão dos esporos.

**Tabela 9.** Diferenciação genética estimada pelo índice de  $G_{st}$  (diagonal acima) e fluxo gênico (diagonal abaixo,  $N_m$ ) para as três localidades: Bahia, Minas Gerais e Rio Grande do Norte com o uso dos *primers* ISSR. Cruz das Almas, 2013.

| Local               | Bahia   | Minas Gerais | Rio Grande do Norte |
|---------------------|---------|--------------|---------------------|
| Bahia               | ***     | 0,0241       | 0,0401              |
| Minas gerais        | 20,2054 | ***          | 0,0644              |
| Rio Grande do Norte | 11,9653 | 7,2657       | ***                 |

Com o uso dos *primers* ISSR a hipótese de recombinação sexual foi rejeitada apenas para a microrregião do Recôncavo (Tabela 10). Todas as outras microrregiões e municípios foram significativos indicando a hipótese de recombinação sexual (Tabela 10).

Diferenças foram encontradas para os índices de diversidade nas populações. Considerado o índice de Shannon, a diversidade encontrada na Bahia (4,1) foi mais alta que a diversidade de Minas Gerais (2,1) e do Rio Grande do Norte (2,3). Os dados encontrados para o índice de Hill e o Índice Stoddart e Taylor foram semelhantes (Tabela 11). Quanto ao índice de Simpson, os valores de diversidade do Estado da Bahia (0,028), Rio Grande do Norte (0,03) e Minas Gerais (0,04). Para os valores de equitabilidade, apenas Sebastião Laranjeiras variou pois foi o único local que apresentou dois isolados com o mesmo haplótipo (Tabela 11).



**Figura 7.** Análise de agrupamento de *Mycosphaerella musicola* das diferentes localidades com o uso dos primers ISSR. Cada barra na figura dividida em cores de K representa um indivíduo, onde K é o número de agrupamentos (assumido  $k = 14$ ). Os isolados são ordenados por sua probabilidade de adesão ao grupo.

**Tabela 10 .** Valores de  $I_A$  e  $rd$  para os isolados de *Mycosphaerella musicola* utilizando os primers ISSR. Cruz das Almas, 2013.

| Localidades/ISSR                 | *N | $I_A$ Mín. | $I_A$ Máx. | $I_A$ Obs.            | $rd$ Mín.  | $rd$ Máx. | $rd$ Obs.              |
|----------------------------------|----|------------|------------|-----------------------|------------|-----------|------------------------|
| <b>Bahia</b>                     | 63 | -0,22359   | 1,44611    | 1,44611**             | -0,00738   | 0,047717  | 0,047717**             |
| <b>Velho Chico</b>               | 14 | -0,5289    | 1,3469     | 1,3469**              | -0,02173   | 0,055338  | 0,055338**             |
| <i>Bom Jesus da Lapa</i>         | 14 | -0,5289    | 1,3469     | 1,3469**              | -0,02173   | 0,055338  | 0,055338**             |
| <b>Baixo Sul</b>                 | 13 | -0,52615   | 1,75917    | 1,75917**             | -0,02327   | 0,077792  | 0,077792**             |
| <i>Gandu</i>                     | 2  | -          | -          | -                     | -          | -         | -                      |
| <i>Morro de São Paulo</i>        | 1  | -          | -          | -                     | -          | -         | -                      |
| <i>Presidente Tancredo Neves</i> | 7  | -0,69914   | 1,6        | 1,12931**             | -0,03185   | 0,072901  | 0,051455**             |
| <i>Wenceslau Guimarães</i>       | 2  | -          | -          | -                     | -          | -         | -                      |
| <i>Teolândia</i>                 | 1  | -          | -          | -                     | -          | -         | -                      |
| <b>Sertão Produtivo</b>          | 11 | -0,49304   | 1,17912    | 1,17912**             | -0,01998   | 0,047773  | 0,047773**             |
| <i>Sebastião Laranjeiras</i>     | 11 | -0,49304   | 1,17912    | 1,17912**             | -0,01998   | 0,047773  | 0,047773**             |
| <b>Vitória da Conquista</b>      | 8  | -0,77173   | 1,98809    | 1,59383**             | -0,03693   | 0,09513   | 0,076264**             |
| <i>Barra do Choça</i>            | 8  | -0,77173   | 1,98809    | 1,59383**             | -0,03693   | 0,09513   | 0,076264**             |
| <b>Litoral Sul</b>               | 9  | -0,5559    | 1,33075    | 0,520186*             | -0,03292   | 0,078811  | 0,030807*              |
| <i>Itajuípe</i>                  | 9  | -0,5559    | 1,33075    | 0,520186*             | -0,03292   | 0,078811  | 0,030807*              |
| <b>Vale do Jiquiriçá</b>         | 2  | -          | -          | -                     | -          | -         | -                      |
| <i>Mutuípe</i>                   | 2  | -          | -          | -                     | -          | -         | -                      |
| <b>Recôncavo</b>                 | 6  | -0,71233   | 2,0274     | -0,1643 <sup>ns</sup> | -0,1018    | 0,28974   | -0,02349 <sup>ns</sup> |
| <i>Governador Mangabeira</i>     | 4  | -          | -          | -                     | -          | -         | -                      |
| <i>Muritiba</i>                  | 2  | -          | -          | -                     | -          | -         | -                      |
| <b>Rio Grande do Norte</b>       | 11 | -0,55838   | 1,1973     | 0,609822*             | -0,02349   | 0,050373  | 0,025657*              |
| <b>Mossoró</b>                   | 5  | -0,892857  | 3,21429    | 1,25*                 | -0,0686813 | 0,247253  | 0,096154*              |
| <i>Baraúna</i>                   | 5  | -0,892857  | 3,21429    | 1,25*                 | -0,0686813 | 0,247253  | 0,096154*              |
| <b>Chapada do Apodi</b>          | 3  | -          | -          | -                     | -          | -         | -                      |
| <i>Apodi</i>                     | 3  | -          | -          | -                     | -          | -         | -                      |
| <b>Vale do Açu</b>               | 3  | -          | -          | -                     | -          | -         | -                      |
| <i>Ipanguaçu</i>                 | 3  | -          | -          | -                     | -          | -         | -                      |
| <b>Minas Gerais</b>              | 9  | -0,64115   | 1,78469    | 0,909091*             | -0,03591   | 0,099971  | 0,050923*              |
| <b>Lavras</b>                    | 9  | -0,64115   | 1,78469    | 0,909091*             | -0,03591   | 0,099971  | 0,050923*              |
| <i>Lavras</i>                    | 9  | -0,64115   | 1,78469    | 0,909091*             | -0,03591   | 0,099971  | 0,050923*              |
| <b>TOTAL-ISSR</b>                | 83 | -0,20576   | 1,32919    | 1,32919**             | -0,00683   | 0,044134  | 0,044134**             |

Locais sublinhado e negrito = Estado, negrito = microrregiões, itálico = municípios.

**Tabela 11.** Parametros de diversidade genética para os Estados e microrregiões de *M. Musicola*, com os primers ISSR, Cruz das Almas, 2013.

| ISSR                   | *N        | H'                             | N1                           | G'                           | $\lambda$                        | E (gn)    | E (gn)'  | E5       |
|------------------------|-----------|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------------|-----------|----------|----------|
| <b>Rio G. do Norte</b> | 11        | 2,3979<br>(2,06 - 2,73)        | 11,0<br>(9,0 - 13,0)         | 11,0<br>(9,0 - 13,0)         | 0,0909<br>(0,02 - 0,15)          | 11        | 9        | 1        |
| Apodí                  | 3         | -                              | -                            | -                            | -                                | -         | -        | -        |
| Baraúna                | 5         | 1,6094<br>(1,13 - 2,07)        | 5,0<br>(4,0 - 6,0)           | 5,0<br>(4,0 - 6,0)           | 0,2000<br>(0,01 - 0,38)          | 5         | -        | 1        |
| Ipanguaçú              | 3         | -                              | -                            | -                            | -                                | -         | -        | -        |
| <b>BAHIA</b>           | 63        | 4,1431<br>(3,99 - 4,28)        | 63,0<br>(58,0 - 68,0)        | 63,0<br>(58,0 - 68,0)        | 0,0159<br>(0,01 - 0,02)          | 49*       | 8,72     | 1        |
| Barra do Choça         | 8         | 2,0794<br>(1,69 - 2,45)        | 8,0<br>(6,0 - 10,0)          | 8,0<br>(6,0 - 10,0)          | 0,1250<br>(0,01 - 0,23)          | 8         | -        | 1        |
| B. Jesus da Lapa       | 14        | 2,6391<br>(2,34 - 2,93)        | 14,0<br>(12,0 - 16,0)        | 14,0<br>(11,0 - 17,0)        | 0,0714<br>(0,02 - 0,11)          | 14        | -        | 1        |
| Gandu                  | 2         | -                              | -                            | -                            | -                                | -         | -        | -        |
| G. Mangabeira          | 4         | 1,3863<br>(0,85 - 1,91)        | 4,0<br>(3,0 - 5,0)           | 4,0<br>(3,0 - 5,0)           | 0,2500<br>(-0,03 - 0,53)         | 4         | -        | 1        |
| Itajuípe               | 9         | 2,1972<br>(1,83 - 2,55)        | 9,0<br>(7,0 - 11,0)          | 9,0<br>(7,0 - 11,0)          | 0,1111<br>(0,02 - 0,20)          | 9         | -        | 1        |
| Morro de S. Paulo      | 1         | -                              | -                            | -                            | -                                | -         | -        | -        |
| Muritiba               | 2         | -                              | -                            | -                            | -                                | -         | -        | -        |
| Mutuípe                | 2         | -                              | -                            | -                            | -                                | -         | -        | -        |
| P. Tancredo Neves      | 7         | 1,9459<br>(1,52 - 2,36)        | 7,0<br>(5,0 - 9,0)           | 7,0<br>(5,0 - 9,0)           | 0,1429<br>(0,01 - 0,27)          | 7         | -        | 1        |
| S. Laranjeiras         | 11        | 2,3979<br>(2,06 - 2,73)        | 11,0<br>(9,0 - 13,0)         | 11,0<br>(9,0 - 13,0)         | 0,0909<br>(0,02 - 0,15)          | 10        | -        | 1        |
| Teolândia              | 1         | -                              | -                            | -                            | -                                | -         | -        | -        |
| W. Guimarães           | 2         | -                              | -                            | -                            | -                                | -         | -        | -        |
| <b>MINAS GERAIS</b>    | 9         | 2,1972<br>(1,82 - 2,56)        | 9,0<br>(7,0 - 11,0)          | 9,0<br>(7,0 - 11,0)          | 0,1111<br>(0,02 - 0,20)          | 9         | 9        | 1        |
| Lavras                 | 9         | 2,1972<br>(1,82 - 2,56)        | 9,0<br>(7,0 - 11,0)          | 9,0<br>(7,0 - 11,0)          | 0,1111<br>(0,02 - 0,20)          | 9         | -        | 1        |
| <b>TOTAL</b>           | <b>83</b> | <b>4,4188</b><br>(4,29 - 4,54) | <b>83,0</b><br>(77,0 - 89,0) | <b>83,0</b><br>(77,0 - 89,0) | <b>0,0120</b><br>(0,008 - 0,015) | <b>82</b> | <b>-</b> | <b>1</b> |

\*N= População total; H'= Índice de Shannon; N1= Índice de Hill; G'= índice de Stoddart e Taylor;  $\lambda$ = Índice de Simpson; E (gn) = Riqueza; E (gn)' = Riqueza após calculo da raferação para o menor valor (n=9); E<sub>5</sub>= Equitabilidade calculada por (G-1)/(N1-1).

### 3.3. Primers combinados (SSR/ISSR)

Alta variabilidade genética foi encontrada entre os isolados de *M. musicola* com o uso dos *primers* combinados (SSR/ISSR), pois 100% dos haplótipos foram únicos com o uso dos *primers* combinados.

Em relação à composição genética com base no agrupamento Bayesiano de todos os isolados foi avaliada com o uso do programa Structure versão 2.3.4. A análise inferiu a presença de 21 prováveis grupos ancestrais para localidades em

estudo, diferente do que ocorreu com o uso dos *primers* SSR e dos *primers* ISSR em que foram encontrados 14 prováveis grupos ancestrais. Contudo, três grupos foram mais evidentes, representados pelas cores: lilás, azul claro e verde escuro conforme o gráfico (Figura 9).

Os isolados dos demais grupos foram formados por uma mistura dos 21 grupos (cores), tendo uma composição variada. Por exemplo, o isolado 82, possui aproximadamente 7% do grupo representado pelo vermelho, e o restante de sua composição é dada pelos demais grupos (cores). Isso ocorre com os outros isolados que se apresentam posteriormente a ele, evidenciado a formação de uma população clonal (Figura 9).

O teste de Mantel é um teste para estimar a correlação entre as distâncias genéticas e as distâncias geográficas, e teve como resultado os *primers* combinados foi de 0,13, sendo significativo a 5% ( $P \leq 0,05$ ).

De acordo com a análise, percebe-se que ocorreu maior variação dentro de municípios 93,28% para a análise realizada com os *primers* combinados (SSR/ISSR), sendo altamente significativo (Tabela 12).

**Tabela 12.** Variabilidade genética dos isolados de *Mycosphaerella musicola* com base na análise molecular da variância (AMOVA) dos *primers* combinados (SSR/ISSR). Cruz das Almas, 2013.

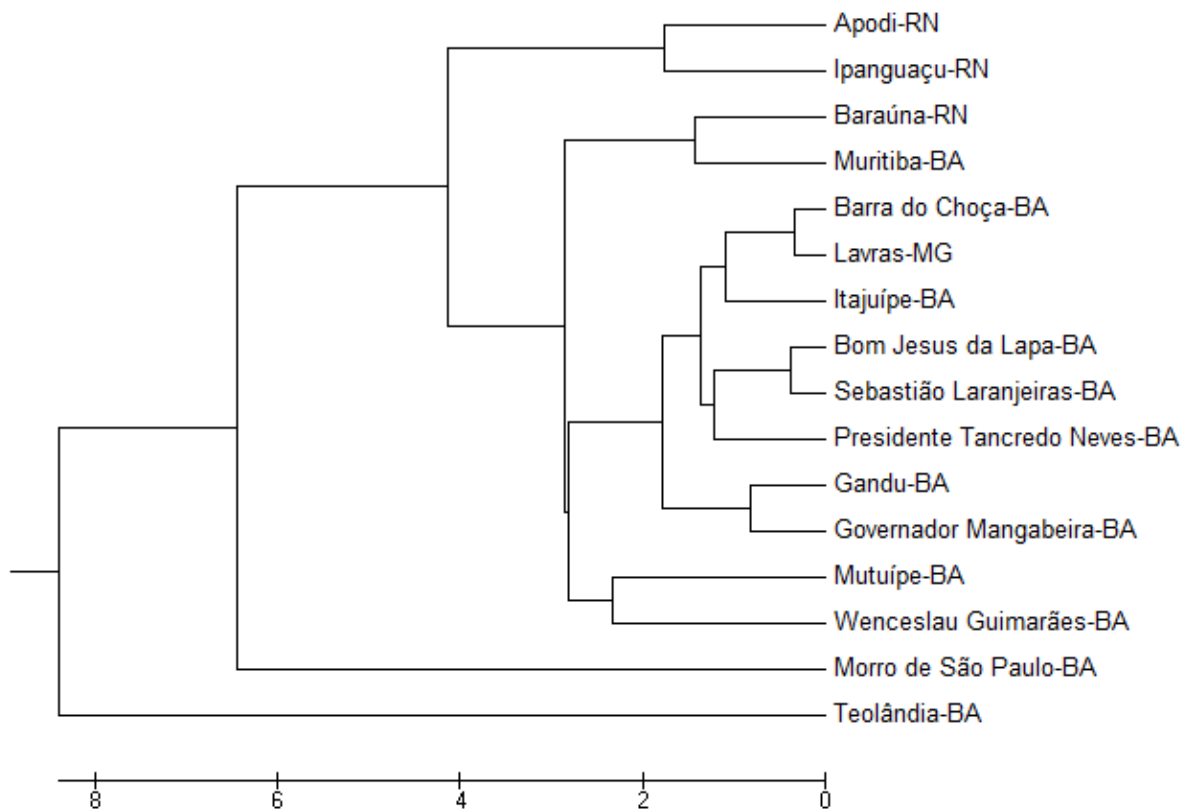
| Fonte de variação                    | GL | Componentes da variância | Porcentagem da variação | F         | P       |
|--------------------------------------|----|--------------------------|-------------------------|-----------|---------|
| Entre Estados                        | 2  | 0,29480                  | 3,28                    | 0,03283   | 0,07331 |
| Entre municípios dentro de Estado    | 13 | 0,30849                  | 3,44                    | 0,03552   | 0,02053 |
| Entre haplótipos dentro de município | 67 | 8,37671                  | 93,28                   | 0,06718** | 0,00098 |
| TOTAL                                | 82 | 8,98001                  |                         |           |         |

F= Índice de Fixação; P= Significância, GL= Grau de liberdade. \*\*  $P < 0,001$ , <sup>ns</sup> = não significativo.

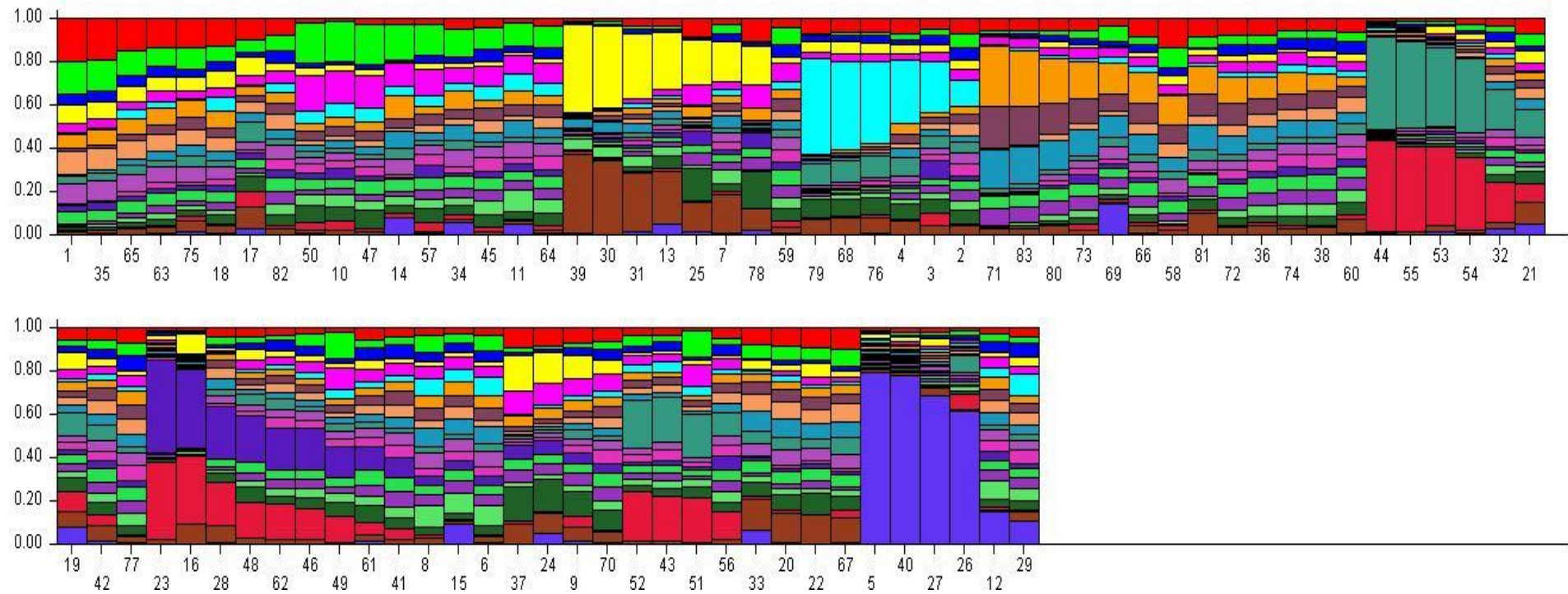
Em relação ao dendrograma formado pelos municípios (Figura 10) percebe-se que os municípios do Rio Grande do Norte ficaram agrupados. Já Lavras (Minas Gerais), ficou próximo ao município Barra do Choça (Bahia), os mesmos estão distantes aproximadamente 1.147 Km. Os municípios de Teolândia e Morro de São Paulo, ambos localizados na Bahia, ficaram agrupados isoladamente.

A diferenciação genética estimada pela média com o uso dos *primers* combinados (SSR/ISSR) foi de aproximadamente 0,02 entre Bahia e Minas Gerais,

0,06 entre Bahia e Rio Grande do Norte e 0,09 entre Minas Gerais e o Rio Grande do Norte. O fluxo gênico ( $N_m$ ) para os *primers* combinados (SSR/ISSR) foi de aproximadamente 17,3 entre Bahia e Minas Gerais, 6,8 entre Bahia e Rio Grande do Norte e 4,9, entre Minas Gerais e o Rio Grande do Norte (Tabela 13). Assim como, com a análise os SSR e dos ISSR, o maior valor para fluxo gênico foi entre a Bahia e Minas Gerais, e o menor valor entre Minas Gerais e Rio Grande do Norte.



**Figura 10.** Dendrograma baseado na distância genética de Nei (1972) dos 16 municípios de *M. musicola*. Cruz das Almas, 2013.



**Figura 9.** Análise de agrupamento de *Mycosphaerella musicola* das diferentes localidades com o uso dos primers combinados (SSR/ISSR). Cada barra na figura dividida em cores de K representa um individuo, onde K é o numero de agrupamentos (assumido  $k = 21$ ). Os isolados são ordenados por sua probabilidade de adesão ao grupo.

**Tabela 13.** Diferenciação genética estimada pelo índice de  $G_{st}$  (diagonal acima) e fluxo gênico (diagonal abaixo,  $N_m$ ) para as três localidades: Bahia, Minas Gerais e Rio Grande do Norte com o uso dos primers combinados (ISSR/SSR). Cruz das Almas, 2013.

| Local               | Bahia   | Minas Gerais | Rio Grande do Norte |
|---------------------|---------|--------------|---------------------|
| Bahia               | ***     | 0,0280       | 0,0685              |
| Minas gerais        | 17,3398 | ***          | 0,0926              |
| Rio Grande do Norte | 6,8033  | 4,9019       | ***                 |

Com o uso dos *primers* combinados (SSR/ISSR), a hipótese nula de recombinação foi aceita para as populações em estudo pelo índice de associação ( $I_A$ ) e o desequilíbrio de ligação multilocus ( $rd$ ), exceto para a população total, para Bahia, Minas Gerais e Rio Grande do Norte em nível de Estado, e para as microrregiões Velho Chico (município Bom Jesus da Lapa), Baixo Sul (município Presidente Tancredo Neves), Sertão produtivo (município Sebastião Laranjeiras), Vitória da Conquista (município Barra do Choça), Litoral Sul (município Itajuípe) localizadas no Estado da Bahia, a microrregião Lavras (município Lavras) localizada no Estado de Minas Gerais, em que os valores de associação multilocus foram significativos (Tabela 14), indicando a hipótese de recombinação sexual.

Diferenças foram encontradas para os índices de diversidade nas populações. Considerado o índice de Shannon, a diversidade encontrada na Bahia (4,1) foi mais alta que a diversidade de Minas Gerais (2,1) e do Rio Grande do Norte (2,3). Os dados encontrados para o índice de Hill e o Índice Stoddart e Taylor foram semelhantes (Tabela 15). Quanto ao índice de Simpson, os valores de diversidade do Estado da Bahia (0,015), Rio Grande do Norte (0,09) e o maior valor foi o de Minas Gerais (0,11). Para os valores de equitabilidade, não houve diferenças pois todos os haplótipos foram únicos (Tabela 15).



**Tabela 14 .** Valores de  $I_A$  e rd para os isolados de *Mycosphaerella musicola* utilizando os primers combinados (SSR/ISSR). Cruz das Almas, 2013.

| Localidades/comb                 | *N | $I_A$ Mín. | $I_A$ Máx. | $I_A$ Obs.             | rd Mín.  | rd Máx.  | rd Obs.                |
|----------------------------------|----|------------|------------|------------------------|----------|----------|------------------------|
| <b><u>Bahia /comb</u></b>        | 63 | -0,22061   | 0,319761   | 0,288462**             | -0,00615 | 0,008909 | 0,008037**             |
| <b>Velho Chico</b>               | 14 | -0,49248   | 0,943118   | 0,507313*              | -0,00933 | 0,017867 | 0,009611*              |
| <i>Bom Jesus da Lapa</i>         | 14 | -0,49248   | 0,943118   | 0,507313*              | -0,00933 | 0,017867 | 0,009611*              |
| <b>Baixo Sul</b>                 | 13 | -0,55944   | 1,00788    | 0,676375**             | -0,01116 | 0,020098 | 0,013488**             |
| <i>Gandu</i>                     | 2  | -          | -          | -                      | -        | -        | -                      |
| <i>Morro de São Paulo</i>        | 1  | -          | -          | -                      | -        | -        | -                      |
| <i>Presidente Tancredo Neves</i> | 7  | -0,73481   | 1,72373    | 0,922838*              | -0,01674 | 0,039268 | 0,021023*              |
| <i>Wenceslau Guimarães</i>       | 2  | -          | -          | -                      | -        | -        | -                      |
| <i>Teolândia</i>                 | 1  | -          | -          | -                      | -        | -        | -                      |
| <b>Sertão Produtivo</b>          | 11 | -0,51604   | 1,08713    | 0,715581**             | -0,01087 | 0,022909 | 0,015079**             |
| <i>Sebastião Laranjeiras</i>     | 11 | -0,51604   | 1,08713    | 0,715581**             | -0,01087 | 0,022909 | 0,015079**             |
| <b>Vitória da Conquista</b>      | 8  | -0,70293   | 1,5583     | 1,0353*                | -0,01681 | 0,037277 | 0,024766*              |
| <i>Barra do Choça</i>            | 8  | -0,70293   | 1,5583     | 1,0353*                | -0,01681 | 0,037277 | 0,024766*              |
| <b>Litoral Sul</b>               | 9  | -0,68629   | 1,18595    | 0,626087*              | -0,01646 | 0,028445 | 0,015016*              |
| <i>Itajuípe</i>                  | 9  | -0,68629   | 1,18595    | 0,626087*              | -0,01646 | 0,028445 | 0,015016*              |
| <b>Vale do Jiquiriçá</b>         | 2  | -          | -          | -                      | -        | -        | -                      |
| <i>Mutuípe</i>                   | 2  | -          | -          | -                      | -        | -        | -                      |
| <b>Recôncavo</b>                 | 6  | -0,81434   | 1,72087    | -0,23816 <sup>ns</sup> | -0,0291  | 0,061495 | -0,00851 <sup>ns</sup> |
| <i>Governador Mangabeira</i>     | 4  | -          | -          | -                      | -        | -        | -                      |
| <i>Muritiba</i>                  | 2  | -          | -          | -                      | -        | -        | -                      |
| <b>Rio Grande do Norte</b>       | 11 | -0,55822   | 1,19014    | 0,675724*              | -0,01047 | 0,022321 | 0,012673*              |
| <b>Mossoró</b>                   | 5  | -0,88333   | 2,11667    | 0,672222 <sup>ns</sup> | -0,03046 | 0,072989 | 0,02318 <sup>ns</sup>  |
| <i>Baraúna</i>                   | 5  | -0,88333   | 2,11667    | 0,672222 <sup>ns</sup> | -0,03046 | 0,072989 | 0,02318 <sup>ns</sup>  |
| <b>Chapada do Apodi</b>          | 3  | -          | -          | -                      | -        | -        | -                      |
| <i>Apodi</i>                     | 3  | -          | -          | -                      | -        | -        | -                      |
| <b>Vale do Açu</b>               | 3  | -          | -          | -                      | -        | -        | -                      |
| <i>Ipanguaçu</i>                 | 3  | -          | -          | -                      | -        | -        | -                      |
| <b>Minas Gerais</b>              | 9  | -0,62934   | 1,36873    | 0,667954*              | -0,01441 | 0,031345 | 0,015297*              |
| <b>Lavras</b>                    | 9  | -0,62934   | 1,36873    | 0,667954*              | -0,01441 | 0,031345 | 0,015297*              |
| <i>Lavras</i>                    | 9  | -0,62934   | 1,36873    | 0,667954*              | -0,01441 | 0,031345 | 0,015297*              |
| <b>TOTAL/comb</b>                | 83 | -6,21335   | 0,313845   | 0,712631**             | -9,91753 | 9,96311  | 0,010196**             |

Locais sublinhado e negrito = Estado, negrito = microrregiões, itálico = municípios.

**Tabela 15.** Parâmetros de diversidade genética para os Estados e microrregiões de *M. Musicola*, com os *primers* combinados (SSR/ ISSR), Cruz das Almas, 2013.

| SSR/ISSR               | *N        | H'                             | N1                           | G'                           | λ                                | E (gn)    | E (gn)'  | E5       |
|------------------------|-----------|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------------|-----------|----------|----------|
| <b>Rio G. do Norte</b> | 11        | 2,3979<br>(2,06 - 2,73)        | 11,0<br>(9,0 - 13,0)         | 11,0<br>(9,0 - 13,0)         | 0,0909<br>(0,02 - 0,15)          | 11        | 9        | 1        |
| Apodí                  | 3         | -                              | -                            | -                            | -                                | -         | -        | -        |
| Baraúna                | 5         | 1,6094<br>(1,13 - 2,07)        | 5,0<br>(4,0 - 6,0)           | 5,0<br>(4,0 - 6,0)           | 0,2000<br>(0,01 - 0,38)          | 5         | -        | 1        |
| Ipanguaçú              | 3         | -                              | -                            | -                            | -                                | -         | -        | -        |
| <b>BAHIA</b>           | 63        | 4,1431<br>(3,99 - 4,28)        | 63,0<br>(58,0 - 68,0)        | 63,0<br>(58,0 - 68,0)        | 0,0159<br>(0,01 - 0,02)          | 63        | 9        | 1        |
| Barra do Choça         | 8         | 2,0794<br>(1,69 - 2,45)        | 8,0<br>(6,0 - 10,0)          | 8,0<br>(6,0 - 10,0)          | 0,1250<br>(0,01 - 0,23)          | 8         | -        | 1        |
| B. Jesus da Lapa       | 14        | 2,6391<br>(2,34 - 2,93)        | 14,0<br>(12,0 - 16,0)        | 14,0<br>(11,0 - 17,0)        | 0,0714<br>(0,02 - 0,11)          | 14        | -        | 1        |
| Gandu                  | 2         | -                              | -                            | -                            | -                                | -         | -        | -        |
| G. Mangabeira          | 4         | 1,3863<br>(0,85 - 1,91)        | 4,0<br>(3,0 - 5,0)           | 4,0<br>(3,0 - 5,0)           | 0,2500<br>(-0,03 - 0,53)         | 4         | -        | 1        |
| Itajuípe               | 9         | 2,1972<br>(1,83 - 2,55)        | 9,0<br>(7,0 - 11,0)          | 9,0<br>(7,0 - 11,0)          | 0,1111<br>(0,02 - 0,20)          | 9         | -        | 1        |
| Morro de S. Paulo      | 1         | -                              | -                            | -                            | -                                | -         | -        | -        |
| Muritiba               | 2         | -                              | -                            | -                            | -                                | -         | -        | -        |
| Mutuípe                | 2         | -                              | -                            | -                            | -                                | -         | -        | -        |
| P. Tancredo Neves      | 7         | 1,9459<br>(1,52 - 2,36)        | 7,0<br>(5,0 - 9,0)           | 7,0<br>(5,0 - 9,0)           | 0,1429<br>(0,01 - 0,27)          | 7         | -        | 1        |
| S. Laranjeiras         | 11        | 2,3979<br>(2,06 - 2,73)        | 11,0<br>(9,0 - 13,0)         | 11,0<br>(9,0 - 13,0)         | 0,0909<br>(0,02 - 0,15)          | 11        | -        | 1        |
| Teolândia              | 1         | -                              | -                            | -                            | -                                | -         | -        | -        |
| W. Guimarães           | 2         | -                              | -                            | -                            | -                                | -         | -        | -        |
| <b>MINAS GERAIS</b>    | 9         | 2,1972<br>(1,82 - 2,56)        | 9,0<br>(7,0 - 11,0)          | 9,0<br>(7,0 - 11,0)          | 0,1111<br>(0,02 - 0,20)          | 9         | 9        | 1        |
| Lavras                 | 9         | 2,1972<br>(1,82 - 2,56)        | 9,0<br>(7,0 - 11,0)          | 9,0<br>(7,0 - 11,0)          | 0,1111<br>(0,02 - 0,20)          | 9         | -        | 1        |
| <b>TOTAL</b>           | <b>83</b> | <b>4.4188</b><br>(4,29 - 4,54) | <b>83,0</b><br>(77,0 - 89,0) | <b>83,0</b><br>(77,0 - 89,0) | <b>0,0120</b><br>(0,008 - 0,015) | <b>83</b> | <b>-</b> | <b>1</b> |

\*N= População total; H'= Índice de Shannon; N1= Índice de Hill; G'= índice de Stoddart e Taylor; λ= Índice de Simpson; E (gn) = Riqueza; E(gn)' = Riqueza após calculo da raferação para o menor valor (n=9); E5 = Equitabilidade calculada por (G-1)/(N1-1).

### 3.4. Período de incubação de *M. musicola*

Foram observados os sintomas iniciais da Sigatoka-amarela até aqueles característicos da doença durante a avaliação do período de incubação dos 17 isolados de *M. musicola*.

Foi realizada a análise de variância (dados não apresentados) para o período de incubação, cultivar Prata Gorutuba (suscetível a Sigatoka-amarela), com 17 isolados de *M. musicola* pertencentes às microrregiões onde se observou a

significância do efeito de isolados pelo teste F a 1% de probabilidade e a formação de dois grupos pelo teste de médias Scott-Knott a 5% de probabilidade (Tabela 16). Os resultados do teste de médias Scott-Knott corroboram com o dendrograma formado pelos ISSRs, não havendo grupos definidos em função dos locais de coleta.

O período de incubação variou de 19,4 dias para o isolado 41 MG até 26,3 dias para o isolado 61 BA, variando 6,9 dias entre o período de incubação mais curto e o mais longo (Figura 16).

**Tabela 16.** Teste de médias do período de incubação dos isolados de *M. musicola* com seus respectivos municípios e microrregiões de origem.

| Isolados | Médias | Município             | Microrregiões        |
|----------|--------|-----------------------|----------------------|
| 61BA     | 26.3A  | Wenceslau Guimarães   | Baixo Sul            |
| 66BA     | 25.5A  | Gandu                 | Baixo Sul            |
| 11BA     | 24.8A  | Bom Jesus da Lapa     | Velho Chico          |
| 13BA     | 24.3A  | Pres. Tancredo Neves  | Baixo Sul            |
| 48RN     | 24.3A  | Apodi                 | Chapada do Apodí     |
| 18BA     | 23.7A  | Pres. Tancredo Neves  | Baixo Sul            |
| 26BA     | 23.5A  | Sebastião Laranjeiras | Sertão Produtivo     |
| 53BA     | 23.2A  | Barra do Choça        | Vitória da Conquista |
| 23BA     | 22.7A  | Barra do Choça        | Vitória da Conquista |
| 29BA     | 22.6A  | Barra do Choça        | Vitória da Conquista |
| 71BA     | 22.6A  | Morro de São Paulo    | Baixo Sul            |
| 64BA     | 22.5A  | Pres. Tancredo Neves  | Baixo Sul            |
| 70BA     | 22.5A  | Wenceslau Guimarães   | Baixo Sul            |
| 25BA     | 21.7B  | Barra do Choça        | Vitória da Conquista |
| 2BA      | 20.4B  | Bom Jesus da Lapa     | Velho Chico          |
| 65BA     | 19.7B  | Itajuípe              | Litoral Sul          |
| 41MG     | 19.4B  | Lavras                | Lavras               |

Médias com letras iguais pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

#### 4. DISCUSSÃO

No Brasil, a Sigatoka amarela provoca perda de produtividade em todas as áreas onde a bananeira é cultivada, podendo variar de 50% a 100% (CORDEIRO et al., 2005). Apesar de sua distribuição da doença por todo o país e os prejuízos causados pela doença, a variabilidade genética do patógeno é mal compreendida. O conhecimento da variabilidade genética de *M. musicola* pode ajudar na análise e escolha de estratégias para o controle da doença, principalmente no desenvolvimento de cultivares resistentes e o uso efetivo de genes de resistência em condições naturais (SHARMA, 2003).

Foi possível preservar 86 isolados (43,22%) de *Mycosphaerella musicola*, destes 83 foram utilizados para as análises desse estudo. Em geral, a obtenção de cultura pura desse fungo não é fácil, devido o mesmo apresentar crescimento lento e baixa esporulação em substratos artificiais (CORDEIRO et al., 2011).

Alta variabilidade foi detectada na população de *M. musicola* no presente estudo em que, com o uso dos *primers* combinados (SSR/ISSR), apresentaram 100% haplótipos distintos, com o uso dos *primers* SSR foram 98,79 % de haplotipos unicos e com os *primers* ISSR foram 83,13 % haplótipos diferentes. Gomes (2012) também observou alta variabilidade em estudo com uma população de *M. musicola* coletada no Estado de Minas Gerais em que 97% dos isolados apresentaram haplótipos distintos.

O mesmo foi observado quando se estudou uma espécie relacionada, *M. fijiensis*, em que 78% dos isolados apresentaram haplótipos distintos da região da Australásia-Pacífico (HAYDEN et al., 2003). Também foi observada alta variabilidade genética entre isolados de *M. musicola* quando avaliadas por meio de marcadores RAPD (MOREIRA et al., 2003). Segundo Gomes (2012) a alta variabilidade encontrada nas populações de Minas Gerais é mais provável devido à ocorrência de reprodução sexual, assim como quando ocorre a reprodução assexuada, a variação genética pode ser elevada, devido à ocorrência de mutações.

Com base na composição genética e no agrupamento Bayesiano, a análise inferiu a presença de 21 prováveis grupos ancestrais para localidades em estudo com o uso dos *primers* combinados (SSR/ISSR), diferente do que ocorreu com o uso dos *primers* SSR e dos *primers* ISSR em que foram encontrados a presença de 14 prováveis grupos ancestrais. Contudo, três grupos (cores) foram mais evidentes com o uso dos *primers* combinados (SSR/ISSR), quatro grupos (cores) com o uso dos *primers* ISSR e apenas um grupo (cor) com o uso dos *primers* SSR. Os resultados indicam que os isolados dos diferentes Estados compõem uma única população, sendo que esta é predominantemente clonal, e as diferenças genéticas entre isolados são devidas à mistura de diferentes linhagens clonais.

Isto não ocorreu no estudo de Gomes (2012) com populações de *Mycosphaerella musicola* coletados em Minas Gerais, em que foi formada uma população única no estudo da estrutura populacional. A maior parte da variação genética ocorreu dentro de cada população e o baixo nível de diferenciação entre as

populações indica um elevado grau de homogeneização sobre áreas maiores, que pode ter ocorrido devido a dispersão dos ascósporos (GOMES, 2012).

De acordo com a AMOVA para os SSR, ISSR e os *primers* combinados, ocorreu maior variação genética entre os haplótipos dentro de municípios do que entre municípios dentro de Estado ou entre Estados, em que apenas o ISSR não foi significativo. Assim como, Gomes (2012) estudando populações de *M. musicola* em Minas Gerais, que também encontrou maior variação genética dentro das populações do que entre populações.

Em relação aos dendogramas feitos por município para estudo da estrutura da população, houve o agrupamento dos municípios pertencentes ao Rio Grande do Norte (Apodi, Baraúna e Ipanguaçu), realizados com os *primers* SSR e com os *primers* combinados (SSR/ISSR). Já Lavras (Minas Gerais) ficou próximo a Barra do Choça (Bahia) nos dendogramas formados pelos primers combinados e os ISSRs, e no dendrograma formados pelos SSRs Lavras ficou próximo a Gandu e Presidente Tancredo Neves, ambos localizados na Bahia. Indicando novamente que o agrupamento não ocorreu de acordo com os locais de coleta.

O teste de mantel confirma o que foi observado nos dendogramas, pois os valores foram de 0,16 ( $P \leq 0,01$ ) para os *primers* SSR, 0,03, (não significativo) para os ISSR e 0,13 ( $P \leq 0,05$ ) para os *primers* combinados. O teste de Mantel foi utilizado para testar a hipótese nula que as matrizes de distância genética e geográfica não são linearmente correlacionadas, pois quanto mais próximo de 1 (um) os valores, mais correlacionadas as matrizes, o que não ocorreu no presente estudo.

Para a diferenciação genética os valores são considerados moderados ou médios, sendo que o maior valor de  $G_{ST}$  foi de 0,11 entre Rio Grande do Norte e Minas Gerais para os primers SSR, seguido de 0,9 entre Rio Grande do Norte e Bahia também com o uso dos SSR e 0,9 entre Rio Grande do Norte e Minas Gerais. Segundo Wright (1978), a diferenciação genética baixa revela uma homogeneidade entre as populações em estudo. Fluxo gênico, indicado por  $N_m$ , dá um significado biológico para o valor matemático de diferenciação da população, indicado pela  $G_{ST}$  (LINDE et al, 2002).

A diferenciação entre as localidades pode estar veiculada às barreiras topográficas, às diferenças climáticas e das vegetações existentes nessas

localidades, às barreiras genéticas seguidas de eventos de colonização do fungo, ou até mesmo a combinação desses fatores, influenciando no fluxo gênico.

De acordo com Hartl e Clark (2010), a diferenciação genética nos informa que as frequências alélicas entre as subpopulações se tornam diferentes, podendo resultar de seleção natural em favor de diferentes genótipos em subpopulações dissimilares, mas também de processos na transmissão de alelos de uma geração para a próxima ou de diferenças casuais na frequência alélica entre os fundadores iniciais das subpopulações.

O  $N_m$  indica que o fluxo gênico foi alto entre todos os Estados, observa-se que os valores de  $N_m$  para os *primers* combinados (SSR/ISSR) e os SSR foram mais próximos, isto pode ter ocorrido devido à especificidade dos *primers* SSR. Migrações resultam na introdução de novos genótipos e na recombinação dos genótipos, sendo que posteriormente contribuem para a alteração da composição genética das populações (OLIVEIRA, 2010). Sendo assim, quanto maior o número de migrantes, maior o fluxo gênico, que é responsável pela introdução de novas variantes de um patógeno em um determinado local, podendo alterar as relações do mesmo no patossistema (McDONALD e LINDE, 2002).

Os maiores valores encontrados para o fluxo gênico foi entre Bahia e Minas Gerais, o que provavelmente ocorre devido à proximidade dos dois Estados devido a dispersão dos esporos, o que favoreceu, provavelmente, para homogeneidade da população. Já os menores valores encontrados foram entre Minas Gerais e Rio Grande do Norte. Sendo assim, o  $N_m$  encontrado para as populações em estudo são considerados altos, haja vista que este número refere-se à quantidade de migrantes por geração e o fungo apresenta inúmeros ciclos reprodutivos por ano. Assim, um indivíduo migrante, em condições favoráveis, pode atingir as mesmas proporções dos indivíduos nativos.

A probabilidade de que altos níveis de fluxo gênico possam ocorrer em escala regional indica um risco substancial para a distribuição regional dos alelos mutantes, que permitem a discriminação de genes de resistência ou resistência a fungicidas (MOREIRA, 2006).

Linde et al. (2002), em estudo com populações de *M. graminicola*, utilizando marcadores RFLP, observaram que populações coletadas na Suíça, Israel, Oregon e Texas, apresentaram valor de fluxo gênico médio de  $N_m = 9$ . Esse valor significa

que uma média de 9 indivíduos precisam ser trocados a cada geração entre Suíça, Israel, Oregon, Texas entre as populações para explicar o seu grau atual de semelhança.

O fluxo gênico baseado no  $N_m$  para as populações em estudo indica que ocorre fluxo gênico entre as populações de *M. musicola* dos Estados, sendo o mesmo considerado alto. O fluxo gênico pode ter sido ocasionado pelo transito de material vegetativo infectado com a doença entre os Estados ou pela migração por ascósporos que são dispersos principalmente pelo vento.

Em relação  $I_A$  e  $rd$ , onde se testa a hipótese de recombinação sexual, a mesma foi rejeitada para as microrregiões Baixo Sul (município Pres. Tancredo Neves), Vitória da Conquista (Barra do Choça), Recôncavo (Governador Mangabeira), e para os Estados do Rio Grande do Norte e Minas Gerais (município Lavras) com o estudo com os primers SSRs. Já com os primers ISSR, a hipótese de recombinação sexual foi rejeitada apenas para a microrregião do Recôncavo e com os primers combinados (SSR/ISSR) foi para a microrregião do Recôncavo e para a microrregião Mossoró (município Baraúna-RN). Nota-se que a microrregião Recôncavo a hipótese de recombinação sexual foi rejeitada para as três análises, tanto os SSR, ISSR e a combinação dos dois.

O  $I_A$  é a medida tradicional de desequilíbrio de ligação multilocus (HAUBOLD et al., 1998), em síntese, a "distância" (número de locos em que eles diferem) entre todos os pares de indivíduos é calculada, e a variação destas distâncias comparado em relação ao esperado se não houver nenhum desequilíbrio de ligação. Inicialmente, o desequilíbrio de ligação está presente em uma população em uma taxa determinada pela distância genética entre os dois locos e o número de gerações desde que ele surgiu (FLINT-GARCIA et al, 2003).

Rivais et al. (2004), em estudo de populações de *Mycosphaerella fijiensis* coletados em plantações de banana em 13 países na América Latina, no Caribe e na África, observaram que o desequilíbrio de ligação ( $rd$ ) não diferiu significativamente de zero na maioria das populações, afirmando que resultados suportam a hipótese da existência de acasalamentos aleatório nas populações de *M. fijiensis*. Diferente do presente estudo em que a maioria das populações em estudo foram significativas.

Os índices de diversidade encontrados foram muito parecidos para os SSR, ISSR e os *primers* combinados, pois a quantidade de haplótipos únicos encontrados foi alta para os três. Em relação ao Índice de Shannon quanto maior ele for maior a porcentagem de polimorfismo nos locos (MOREIRA, 2006).

De acordo com o período de incubação observou-se a formação de dois grupos de acordo com o teste de Scott-knott que não diferem estatisticamente. Segundo Cordeiro (1997), a variável período de incubação, pode funcionar como indicador da agressividade de isolados. Ou seja, quanto maior o período de incubação menos agressivo é o isolado, sendo que o período de incubação no presente estudo de 19,4 dias para o isolado 41MG até 26,3 dias para o isolado 61BA.

Cordeiro (1997), avaliando a variabilidade patogênica de 18 isolados de *M. musicola*, observou alta variabilidade em 15 deles, atribuindo esta particularidade à ocorrência de reprodução sexuada, heterotalismo, anastomose de hifas e heterocariose. A frequência de genes de agressividade que atuam no hospedeiro, influenciando na adaptação sem preferência de genótipos particulares, pode aumentar sobremaneira vários ciclos de recombinação (McDONALD et al., 1999).

Com base nos resultados observa-se que o fungo *M. musicola* apresenta um alto potencial evolutivo e, conseqüentemente, maior risco de suplantar genes de resistência do hospedeiro, pois apresenta sistema reprodutivo misto (tanto a reprodução sexuada quanto a assexuada), e um alto fluxo gênico para as populações em estudo.

Contudo, não foi detectada nenhuma estruturação da população em estudo de acordo com os locais de coleta, o que foi confirmado pelo teste de Mantel. O conhecimento e a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações de *M. musicola* é essencial para adoção de estratégia de controle da doença e manutenção de uma resistência durável para as diversas regiões produtoras.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAPOW, P. A.; BURT, A. 'Indices of multilocus linkage disequilibrium'. **Molecular Ecology Notes**, v.1, p.101-102, 2001.

BUSSAD, W. de O.; MIAZAKI, E.S.; ANDRADE, D.F., **Introdução à análise de agrupamentos**. São Paulo: ABE, 105p., 1990.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.70, p.181-184, 1967.

CORDEIRO, Z.J.M. **Variabilidade patogênica de isolados de *Mycosphaerella musicola* e resistência induzida e genética em genótipos de bananeira**.

Piracicaba, 1997, 118p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P. Expressão da Resistência de Variedades de Banana à Sigatoka-Amarela. **Fitopatologia Brasileira** v. 30, p. 532-534. 2005.

CORDEIRO, Z.J.M.; ROCHA, H.S.; ARAÚJO, A.G., **Metodologias para Manuseio de *Mycosphaerella musicola* em Laboratório**. Documentos / Embrapa Mandioca e Fruticultura: 198, Cruz das Almas, 32p, 2011.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12, p. 13-15. 1990.

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

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. 4 ed. Edinburgh: Longman Group Limited, 464p., 1996.

FLINT-GARCIA, S.A.; THORNSBERRY, J.M.; BUCKLER, E.S., Structure of linkage disequilibrium in plants. **Ann. Rev. Plant Biol.** v.54, p.357–374, 2003.

GOMES, L.I.S., Etiology of Sigatoka diseases in Minas Gerais, genetic structure of the population of *Mycosphaerella musicola* and sensitivity of brasilian isolates of *Mycosphaerella fijiensis* to fungicides, 2012, 70p., (Tese de doutorado em Fitopatologia) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 2012.

HARLT, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de populações**. 4° ed. Porto Alegre: Artmed, 660p. 2010

HAUBOLD, B.; TRAVISANO, M.; RAINEY, P.B.; UDSON, R.R., Detecting linkage disequilibrium in bacterial populations. **Genetics**, v.150, p.1341–1348, 1998.

HAYDEN, H.L.; CARLIER, J.; AITKEN, E.A.B., Genetic structure of *Mycosphaerella fijiensis* populations from Australia, Papua New Guinea and the Pacific Islands. **Plant Pathology** 52, 703–12, 2003.

JURGENS, T.; LINDE, C.C.; McDONALD, B.A., Genetic structure of *Mycosphaerella graminicola* populations from Iran, Argentina and Australia. **European Journal of Plant Pathology**, v.115, p. 223-233, 2006.

LINDE, C. C.; ZHAN, J.; McDONALD, B. A. Population structure of *Mycosphaerella graminicola*: from lesions to Continents. **Phytopathology**, St. Paul, v.92, p.946-955, 2002.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Res.**, v.27, p.209-220, 1967.

MAYNARD SMITH, J., SMITH, N. H., O'ROURKE, M., SPRATT, B. G., How clonal are bacteria? **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v.90, p. 4384, 1993.

McDERMOTT, J. M.; McDONALD, B. A. Gene flow in plant pathosystems. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v.31, p.353-57, 1993.

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

MCDONALD, B.A., ZHAN, J., YARDEN, O., HOGAN, K., GARTON, J., PETTWAY, R.E., The population genetics of *Mycosphaerella graminicola* and *Phaeosphaeria nodorum*. In: Lucas, J.A., Bowyer, P., Anderson, H.M. (Eds.), *Septoria on Cereals: A Study of Pathosystems*. **CAB International**, Wallingford, UK, p. 44–69, 1999.

MEREDITH, D.S., Banana Leaf Spot Disease (Sigatoka) caused by *Mycosphaerella musicola* Leach. Kew, UK: Commonwealth **Agricultural Bureaux**,1970.

MOLINA, C.; KAEMMER, D.; APONTE, S.; WEISING, K.; KAHL, G., Microsatellite markers for the fungal banana pathogen *Mycosphaerella musicola*. **Molecular Ecology Notes**, v.1, p.137-139, 2001.

MOREIRA, R.F.C., **Estrutura genética de populações de *Crinipellis perniciosa* e *Moniliophthora roreri* utilizando marcadores RAPD e SSR**. Tese (Doutorado em Agronomia área de concentração Genética e Melhoramento de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Jaboticabal – SP, 2006.

MOREIRA, R.F.C., CORDEIRO, Z.J.M., VILARINHOS, A.D., 2003. Caracterização genética de isolados de *Mycosphaerella musicola* por marcadores RAPD. **Summa Phytopathologica**, v.29, p.275-277, 2003.

MOURICHON, X.; FULLERTON, R.A., Geographical distribution of the two species *Mycosphaerella musicola* Leach (*Cercospora musae*) and *M. fijiensis* Morelet (*C. fijiensis*), respectively agents of Sigatoka disease and black leaf streak disease in bananas and plantains. **Fruits**, v.45, p.213–218, 1990.

- MULLER, R.; PASBERG-GAUHL, C; GAUHL, F.; RAMSER, J.; KAHL, G.  
Oligonucleotide fingerprinting detects genetic variability at different levels in Nigerian *Mycosphaerella fijiensis*. **Journal of Phytopathology**, v. 145, p.25-30, 1997.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.70, n.12, p.3321-3323, 1973.
- OLIVEIRA, S.A.S., Genético structure, aggressiveness and fungicide sensitivity of *Phytophthora infestans* population from the south and southeast regions of Brazil. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa – MG, 96p., 2010.
- PRICE, E.W. e CARBONE, I., SNAP: workbench management tool for evolutionary population genetic analysis. *Bioinformatics*, v.21, p.402-404, 2005.
- R Core Team, R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, URL <http://www.R-project.org/>, 2012.
- RIVAIS, G.G.; ZAPATER, M.F.; ABADIE, C.; CARLIER, J., Founder effects and stochastic dispersal at the continental scale of the fungal pathogen of bananas *Mycosphaerella fijiensis*. **Molecular Ecology**, v.13, p. 471-482, 2004.
- SHANNON, C. E.;WEAVER, W. The Mathematical Theory of Communication. **University of Illinois Press**, Urbana, IL, 1949.
- SHARMA, T.R., Molecular diagnosis and application of DNA markers in the management of fungal and bacterial plant diseases. *Indian Journal of Biotechnology*, v. 2, p. 99-109, 2003.
- STODDART, J. A.;TAYLOR, J. F. Genotypic diversity: Estimation and prediction in samples. **Genetics**, v.118, p.705-711, 1988.
- SIMPSON, E. H. Measurement of diversity. **Nature**, v.163, p.688, 1949.

WRIGHT, S. Evolution and genetics of populations. Chicago: University of Chicago Press, 511p. 1978.

YEH, F. C.; BOYLE, T. J. B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. **Belg. J. Bot.**, v.129, p.157, 1997.

ZAPATER, M.F.; DICHEMIN, M.; DUSSART, J.F.M.; COSTE, D.; BROTTIER, P.; CARLIER, J. Microsatellite markers for the fungal banana pathogens *Mycosphaerella fijiensis*, *Mycosphaerella musicola* and *Mycosphaerella eumusae*. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 1121-1125, 2008.

ZHAN, J.; PETTWAY, R.E.; McDONALD, B.A., The global genetic structure of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* is characterized by high nuclear diversity, low mitochondrial diversity, regular recombination, and gene flow. **Fungal Genetics and Biology** v.38, p. 286-297, 2003.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os isolados de *M. musicola* apresentam grande variabilidade genética, contudo a população em estudo não foi agrupada de acordo com os locais de coleta. Desta forma, torna-se necessário a continuidade das pesquisas com um número maior de isolados, de forma a contribuir futuramente com os programas de melhoramento na seleção de genótipos com diferentes níveis de resistência em função da distribuição do fitopatógeno em diferentes escalas espaciais nos locais aonde a doença se faz presente.