

Diversidade Microbiana da Amazônia

Vol. 2

Editores:

Oliveira L.A., Bentes J.L.S., Jesus M.A., Rocha L.C., Fernandes
O.C., Andrade S.L., Souza A.Q.L.



Copyright © 2018, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

PRESIDENTE DA REPÚBLICA

Michel Temer

MINISTRO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES

Gilberto Kassab

DIRETOR DO INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA

Luiz Renato de França

EDITORA INPA

Editor: Mario Cohn-Haft. **Produção editorial:** Rodrigo Verçosa, Shirley Ribeiro Cavalcante, Tito Fernandes. **Bolsistas:** Brenda Costa, Alan Alves, Mariana Franco de Sá e Sabrina Trindade.

FICHA CATALOGRÁFICA

D618 Diversidade microbiana da Amazônia Vol.2 /Editor L. A. Oliveira... [et.al.].--
Manaus: Editora INPA, 2017.
348.: il. color.

ISBN 978-85-211-0175-8

1. Microbiologia - Amazônia. 2. Diversidade. I. Oliveira, L. A.

CDD 576.9811



Editora do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Av. André Araújo, 2936 – Caixa Postal 2223
Cep : 69067-375 Manaus – AM, Brasil
Fax : 55 (92) 3642-3438 Tel: 55 (92) 3643-3223
www.inpa.gov.br e-mail: editora@inpa.gov.br

Distribuição de *mating type* e diversidade de *Fusarium decemcellulare* isolados de mudas de guaranazeiro em viveiro

Queiroz C.A. de¹, Sousa S.B.de², Hanada R.E³, Silva G.F.⁴

^{1,2}PPG em Biotecnologia - Universidade Federal do Amazonas / Embrapa Amazônia Ocidental; ³Pesquisador, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia; ⁴Pesquisador, Embrapa Amazônia Ocidental; Email: gilvan.silva@embrapa.br

Resumo

O guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) é uma espécie nativa da região amazônica de importância econômica devido ao alto teor de cafeínas e outros compostos bioativos produzidos nas sementes que são utilizadas como matéria-prima para a produção de bebidas industrializadas. Entre os problemas responsáveis pela baixa produção de guaraná no Amazonas estão as doenças causadas por fungos, entre elas o superbrotamento causado por *Fusarium decemcellulare*, que coloniza tecidos meristemáticos em mudas e plantas adultas. Visando comparar a distribuição de *mating type* e diversidade genética, o patógeno entre mudas obtidas de viveiro e plantas adultas em fase de produção, no presente trabalho foram analisados 81 dos diferentes sintomas da doença, sendo 64 obtidos de mudas sintomáticas e 17 de plantas cultivadas no campo. A distribuição de *mating type* (*Mat-1* e *Mat-2*) revelou uma significativa diferença na proporção 1/1 nos e entre os fungos isolados em mudas de viveiro (58 dos 64 isolados pertencem ao *Mat-1*), em relação aos isolados em condições de campo, onde a razão entre *Mat-1* e *Mat-2* foi igual, indicando uma possível habilidade do patógeno em realizar reprodução sexuada e consequente aumento da variabilidade genética em ambiente aberto. Os dados de agrupamento com base em 72 bandas polimórficas obtidas com o marcador ISSR mostraram uma maior correlação entre os isolados obtidos de mudas conforme o esperado. Contudo, não houve nenhuma correlação genética entre sintomas e tipo de *mating* nos grupos formados.

Palavras-chave: Superbrotamento, ISSR, *mating type*, marcador molecular, reprodução sexuada

Introdução

O guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) é uma espécie nativa da Amazônia de grande importância econômica para a região. As sementes de guaraná são ricas em cafeína, flavonoides e taninos, que lhes conferem características estimulantes e medicinais (Campos *et al.*, 2011). Essas sementes servem de matéria-prima

para a produção de bebidas industrializadas, antitérmico, antidiarreico, estimulante, analgésico e antigripal (Costa *et al.*, 2005).

O principal produtor nacional, até a década de 80, era o município de Maués com 90% da pequena produção brasileira, seguido por outros, como Parintins, Itacoatiara, Manacapuru e Manaus (Correa *et al.*, 1989). Nessa época, com a ampliação do uso comercial da semente, vários agricultores do baixo Sul da Bahia, antiga zona cacaeira iniciou cultivo de guaraná. Em menos de dez anos, com plantios mais novos e produtivos, a Bahia tornou-se o maior produtor, com 2.800 mil toneladas de sementes anuais, enquanto o Amazonas passou para a segunda posição, com a produção média de 1.100 toneladas na safra (IBGE 2014). Atualmente, o sul da Bahia exporta o produto em pó e em grãos para diversos países, como Estados Unidos, Alemanha, Itália e França (EBDA, 2014). Na Bahia praticamente não havia problemas de pragas e doenças que causam danos econômicos aos guaranazeiros, ao contrário do município amazonense de Maués, que com a antracnose em seu plantio associada com outras doenças como o superbrotamento causado por *F. decemcellulare*, atinge órgãos em crescimento ativo como as gemas vegetativas e apresentam pelo menos três sintomas bem característicos, como o superbrotamento das gemas vegetativas, hipertrofia floral e galhas no caule (Araujo *et al.*, 2007).

O superbrotamento atinge tecidos meristemáticos e ocorre desde a muda até a planta adulta, independente, portanto, do estágio fenológico, podendo ocorrer durante todo o ano. A doença provoca maiores perdas quando atinge os tecidos florais, pois inviabiliza a produção de frutos.

Quanto ao sistema de reprodução, o *F. decemcellulare* possui as formas homotálica e heterotálica. A habilidade de autofecundação dos isolados homotáticos em comparação com os heterotáticos, não necessitam do encontro de *mating types* distintos, que promove, o aumento da diversidade genética da população (Leslie e Summerel, 2006).

Desde a identificação do agente etiológico do superbrotamento em guaranazeiro na década de 80 por Batista & Bolkan (1982) e os trabalhos epidemiológicos realizados por Araújo *et al.* (2007), pouca importância foi dada a este patossistema e questões sobre os mecanismos moleculares utilizados pelo patógeno no desenvolvimento da doença ainda são uma incógnita.

Este trabalho teve como foco o estudo da distribuição de *mating type* e diversidade genética de isolados de *F. decemcellulare* obtidos de mudas em viveiro e análise comparativa com isolados obtidos de plantas adultas em fase de produção, ambos oriundos da cidade de Manaus, e análise da distribuição de *mating type* e das correlações

genéticas entre os sintomas de hiperplasia de gemas vegetativas, hipertrofia floral ou galhas no caule por meio do marcador molecular ISSR.

Material e Métodos

A pesquisa foi realizada no laboratório de Biologia Molecular na Embrapa da Amazônia Ocidental (CPAA) localizada na cidade de Manaus-AM.

O isolamento foi realizado conforme descrito por Batista e Bolkan (1982) a partir de três diferentes sintomas de superbrotamento (galhas, superbrotamento de gemas e hipertrofia floral). A partir do isolamento foi realizado o cultivo monospórico. Os isolados foram obtidos em meio batata-dextrose BD sob agitação de 150 rpm para obtenção de massa micelial, que foi filtrada e em seguida realizada a extração de DNA utilizando o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990). A quantificação de DNA foi mensurada por meio de espectrofotômetro Nanodrop e em gel de agarose (0,8%).

A verificação de *mating types* na população de *F. decemcellulare* foi realizada com base em dois pares de *primers* para cada *Mating* (Tabela 1). As reações de PCR foram realizadas com um volume final de 20 µL, com 1µL de *primers* (0,25 µM), tampão 10X (500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl pH 8,4; 1% Triton X-100), 1,2 µL MgCl₂ (1,5 mM), 0,4 µL dNTP (0,2 mM), 0,05 U/µL Taq polimerase, 20 ng/µL de DNA.

Tabela 1. Lista de primers utilizados para verificação de *mating type* em *F. decemcellulare*

| <i>MATING TYPE</i> | <i>PRIMERS</i> | ORIENTAÇÃO | SEQUÊNCIA (5'-3') | Nº DE BASES | pb |
|--------------------|------------------|----------------|------------------------|-------------|-----|
| <i>MAT-1</i> | FDC MAT 1.1.1 | <i>Forward</i> | ACGCTTTCATGGCTTTTCG | 19 | 190 |
| | | <i>Reverse</i> | GCCCATTTGTTGCGATTATG | 20 | |
| | FDC MAT 1.1.3 | <i>Forward</i> | TGCTTTGACTTCTGGATTCTCA | 22 | 591 |
| | | <i>Reverse</i> | CCCAAATTCGAGGTCCCTAT | 20 | |
| <i>MAT-2</i> | FDC MAT 1.2.1 | <i>Forward</i> | ATGAGCTCCTTCACTGGCGC | 20 | 300 |
| | | <i>Reverse</i> | CCATTGCCGTCAAGAGCAAAC | 21 | |
| | FDC MAT 1.2.3 | <i>Forward</i> | ACAGTCATGGCTGGAATGCA | 20 | 400 |
| | | <i>Reverse</i> | CCCACCCCAAATCACCTGAAT | 21 | |

As condições dos ciclos foram: desnaturação inicial de 94 °C por 03 minutos; 30 ciclos de desnaturação (94 °C por 30 segundos), anelamento (60 °C por 01 minuto para os

primers do *mat1* e 62° C por 01 minuto para o *primers* do *mat 2*) e extensão (72 °C – 02 minutos); e extensão final em 70 °C por 10 minutos.

Os isolados foram genotipados com 5 marcadores (Tabela 3) previamente selecionados da lista de 100 *primers* de ISSR (UBS set#9). As reações de PCR foram realizadas em volume de 20µL utilizando 50ng de DNA; tampão 1X com 1,5 mM de MgCl₂; 0,5mM de dNTPs; 1U de Taq DNA Polimerase e 0,25 µM de *primer*. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 92 °C por 30 segundos, anelamento por 1 minuto (com temperatura variando de acordo com cada primer selecionado), síntese a 72 °C por 2 minutos e extensão final por 10 minutos a 72°C. Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose 1,0% e fotodocumentados para posterior análise do perfil de bandas obtido para cada isolado.

A dispersão dos isolados de *F. decemcellulare*, de acordo com os dados de diversidade dos marcadores ISSR, foi realizada por Análise de Coordenadas Principais (PCoA), assim como a variação genética entre e dentro de populações pela análise de variância molecular (AMOVA) foram realizadas usando o GenAlex 6.5 (Peakall e Smouse 2012). Para análise da dissimilaridade foi utilizado o programa DARwin 6 (Perrier e Jacquemoud-Collet, 2006), utilizando o coeficiente de similaridade de jaccard pelo método Neighbor-joining.

A estrutura genética da população foi estimada por meio de análise bayesiana utilizando o programa STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000) como proposto por Falush *et al.* (2007). Para cada valor de número de populações K (1 a 5), foram feitas vinte simulações independentes, onde em cada simulação foram feitas 100.000 iterações com um descarte inicial (burn-in), para evitar distorção dos resultados. O número provável de populações (K) foi determinado por meio dos valores de ΔK , segundo Evanno *et al.* (2005). O limite arbitrário de 80% foi considerado para a inclusão de determinado isolado de acordo com o número de população determinado pelo valor de K.

Resultados e Discussão

Utilizando 64 mudas de guaranazeiro crescidas em viveiro e 17 plantas de guaranazeiro do campo em fase de produção, obtivemos 81 isolados de *F. decemcellulare* (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição de *mating type* dos isolados de *F. decemcellulare* obtidos de diferentes sintomas de superbrotamento em guaranzeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)

| ISOLADOS | MATING TYPE | LOCAL DA COLETA | ORIGEM DO GENÓTIPO | SINTOMAS | ISOLADOS | MATING TYPE | LOCAL DA COLETA | ORIGEM DO GENÓTIPO | SINTOMAS |
|----------|-------------|-----------------|------------------------|----------|----------|-------------|-----------------|------------------------|----------|
| F02 | 2 | EMBRAPA (A100) | PLANTA 002 | HGV | F132 | 2 | VIVEIRO MANAUS | BRS LUZEIA PL 1816/EXP | HGV |
| F04 | 1 | EMBRAPA (A100) | CLONE 003 | HGV | F133 | 1 | VIVEIRO MANAUS | BRS LUZEIA PL 1816/EXP | HGV |
| F06 | 1 | EMBRAPA (A100) | CLONE 003 | HGV | F135 | 1 | VIVEIRO MANAUS | BRS LUZEIA PL 1816/EXP | HGV |
| F15 | 1 | EMBRAPA (A100) | PLANTA 001 | HGV | F136 | 1 | VIVEIRO MANAUS | 574 BAG | G |
| F85 | 1 | AREA ORGANICA | 41 | HF | F137 | 1 | VIVEIRO MANAUS | 575 BAG | G |
| F87 | 1 | AREA ORGANICA | 41 | HF | F138 | 1 | VIVEIRO MANAUS | 576 BAG | G |
| F91 | 2 | VIVEIRO MANAUS | FMI 305 A | HGV | F139 | 1 | VIVEIRO MANAUS | 577 BAG | G |
| F92 | 1 | VIVEIRO MANAUS | FMI 305 A | HGV | F140 | 2 | VIVEIRO MANAUS | PL 1752 BRS AMAZONAS | HF |
| F93 | 2 | VIVEIRO MANAUS | FMI 305 A | HGV | F141 | 2 | VIVEIRO MANAUS | PL 1752 BRS AMAZONAS | HF |
| F94 | 2 | VIVEIRO MANAUS | FMI 305 A | HGV | F142 | 2 | VIVEIRO MANAUS | PL 1752 BRS AMAZONAS | HF |
| F95 | 2 | VIVEIRO MANAUS | 305 B | G | F143 | 2 | VIVEIRO MANAUS | PL 1752 BRS AMAZONAS | HF |
| F97 | 1 | VIVEIRO MANAUS | 307 B | G | F145 | 1 | VIVEIRO MANAUS | PL 1752 BRS AMAZONAS | HF |
| F98 | 1 | VIVEIRO MANAUS | 308 B | G | F146 | 1 | VIVEIRO MANAUS | PL 1752 BRS AMAZONAS | HF |
| F99 | 1 | VIVEIRO MANAUS | 309 B | G | F147 | 1 | VIVEIRO MANAUS | PL 1752 BRS AMAZONAS | HF |
| F100 | 1 | VIVEIRO MANAUS | 310 B | G | F148 | 1 | VIVEIRO MANAUS | PL 1779 CLONE 217 | HF |
| F101 | 1 | VIVEIRO MANAUS | 311 B | G | F150 | 1 | VIVEIRO MANAUS | PL 1779 CLONE 217 | HF |
| F102 | 1 | VIVEIRO MANAUS | 312 B | G | F151 | 1 | VIVEIRO MANAUS | BAG 296 E 145 A | HGV |
| F103 | 1 | VIVEIRO MANAUS | P382 | G | F152 | 1 | VIVEIRO MANAUS | BAG 296 E 145 A | HGV |
| F104 | 1 | VIVEIRO MANAUS | P383 | G | F155 | 1 | VIVEIRO MANAUS | BAG 296 E 145 A | HGV |
| F106 | 1 | VIVEIRO MANAUS | P385 | G | F156 | 1 | VIVEIRO MANAUS | PL 1797 CLONE 609 | HGV |
| F107 | 1 | VIVEIRO MANAUS | P386 | G | F157 | 1 | VIVEIRO MANAUS | PL 1797 CLONE 610 | HGV |
| F108 | 2 | VIVEIRO MANAUS | P387 | G | F158 | 1 | VIVEIRO MANAUS | P702 | G |
| F109 | 1 | VIVEIRO MANAUS | P382 | G | F159 | 1 | VIVEIRO MANAUS | P702 | G |
| F111 | 1 | VIVEIRO MANAUS | P384 | HF | F160 | 1 | VIVEIRO MANAUS | P702 | G |
| F112 | 1 | VIVEIRO MANAUS | P385 | HF | F163 | 1 | VIVEIRO MANAUS | PL 1797 CLONE 609 | G |
| F113 | 1 | VIVEIRO MANAUS | P386 | HF | F164 | 1 | VIVEIRO MANAUS | PL 1797 CLONE 609 | G |
| F114 | 1 | VIVEIRO MANAUS | E29 | G | F165 | 1 | VIVEIRO MANAUS | PL 1797 CLONE 609 | G |
| F115 | 1 | VIVEIRO MANAUS | E29 | G | F166 | 1 | VIVEIRO MANAUS | P 328 | G |
| F116 | 1 | VIVEIRO MANAUS | E29 | G | F167 | 1 | VIVEIRO MANAUS | P 329 | G |
| F117 | 1 | VIVEIRO MANAUS | E29 | G | F170 | 1 | MANAUS | Embrapa | HF |
| F118 | 1 | VIVEIRO MANAUS | E29 | G | F398 | 1 | MANAUS | Embrapa | HGV |
| F119 | 1 | VIVEIRO MANAUS | E29 | G | F400 | 1 | MANAUS | Embrapa | HGV |
| F120 | 1 | VIVEIRO MANAUS | E29 | G | F401 | 1 | MANAUS | Embrapa | G |
| F121 | 1 | VIVEIRO MANAUS | E29 | G | F402 | 2 | MANAUS | Embrapa | G |
| F125 | 1 | VIVEIRO MANAUS | FMI 305 A | G | F403 | 2 | MANAUS | Embrapa | G |
| F126 | 1 | VIVEIRO MANAUS | FMI 305 A | G | F404 | 2 | MANAUS | Embrapa | G |
| F127 | 1 | VIVEIRO MANAUS | FMI 305 A | G | F406 | 2 | MANAUS | Embrapa | HGV |
| F128 | 1 | VIVEIRO MANAUS | BRS LUZEIA PL 1816/EXP | G | F407 | 2 | MANAUS | Embrapa | G |
| F129 | 1 | VIVEIRO MANAUS | BRS LUZEIA PL 1816/EXP | G | F408 | 2 | MANAUS | Embrapa | G |
| F130 | 1 | VIVEIRO MANAUS | BRS LUZEIA PL 1816/EXP | G | F409 | 2 | MANAUS | Embrapa | HGV |
| F131 | 1 | VIVEIRO MANAUS | BRS LUZEIA PL 1816/EXP | G | - | - | - | - | - |

Sintomas Tecidos: HGV (Hiperplasia gema vegetativa); HF (Hipertrofia floral); G (galha);

A análise do *mating type* dos 81 isolados não mostrou a ocorrência de homotáticos e identificou 63 isolados do *Mat-1* e 18 *Mat-2* (Tabela 2). A distribuição de *mating* nos isolados analisados difere da proporção 1/1, contudo, a ocorrência dos dois *mating type* na população indica o potencial para a reprodução sexuada na população de *F. decemcellulare* em guaranazeiro. Dos 17 isolados de *F. decemcellulare* do campo, nove são do *Mat 1* e oito do *Mat 2*, com distribuição similar de 1/1 o que é esperado para reprodução sexuada. Já dos 64 isolados de viveiro, 58 pertencem ao *Mat 1* e apenas 6 ao *Mat 2*. Essa diferença na distribuição de *mating type* se deve provavelmente às condições limitadas de dispersão do patógeno.

De acordo com McDonalds e Linde (2002), um fator determinante no aumento da diversidade genética de um patógeno é a possibilidade de ocorrência de diferentes tipos de reprodução podendo ser sexuada/fluxo gênico, assexuada/fluxo genotípico ou mista, aumentando capacidade de mutação e seleção de genes de virulência que é maior que a capacidade de mutação e seleção de gene de resistência do hospedeiro.

A diversidade genética dos 81 isolados foi analisada por meio do marcador molecular ISSR com base em 72 bandas polimórficas. O número de bandas por marcador usado variou de 11 (UBC 811) a 16 (UBC 827). Todas as bandas foram polimórficas, indicando que os *primers* de ISSR selecionados foram altamente informativos (Tabela 3). Hinz *et al.* (2009), analisando 95 isolados de *Fusarium oxysporum* com oito marcadores ISSR, obtiveram apenas 52 bandas das quais 92,3% foram polimórficos, diferente do resultado encontrado neste estudo onde 100% das bandas é polimórfica para todos os 5 marcadores utilizados. Bayraktar e Dolar (2011) analisaram a diversidade genética de 70 isolados de *Fusarium* spp. usando *primers* ISSR obtiveram uma alta variabilidade genética entre os isolados reforçando a aplicação desta técnica em estudo de diversidade genética.

Com base na similaridade genética, foi possível reunir os isolados em 6 grupos relacionados ao local de coleta, entretanto sem nenhuma correlação com o tipo de tecido sintomático do qual o fungo foi isolado (galha, gema vegetativa e flor) ou *mating type* (*mat-1* e *mat-2*) (Tabela 2 e Figura 1). Esses resultados demonstram que a variação do tipo de sintoma não está relacionada com possível especialização fisiológica ou genética do patógeno e sim com o local de infecção no hospedeiro.

Queiroz *et al.* (2016) analisaram 72 isolados de *F. decemcellulare* de diferentes sintomas pela técnica de Eric-PCR e encontraram uma alta diversidade entre os indivíduos e nenhuma correlação entre os sintomas. Silva (2009) usaram os marcadores RAPD e SSR em 66 isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* de diferentes municípios de Santa

Catarina, observando que não se agruparam por origens geográficas e que são distribuídos indistintamente nos grupos apresentando uma alta diversidade entre eles.

Tabela 3. Primers ISSR selecionados para análise da diversidade em *Fusarium decemcellulare*.

| Primer | Repetição | Anelamento | N | P (%) ^b |
|---------|------------------------|------------|----|--------------------|
| UBC 807 | AGA GAG AGA GAG AGA GT | 49°C | 15 | 100 |
| UBC 811 | GAG AGA GAG AGA GAG AC | 51°C | 11 | 100 |
| UBC 826 | ACA CAC ACA CAC ACA CC | 49°C | 15 | 100 |
| UBC 827 | ACA CAC ACA CAC ACA CG | 50°C | 16 | 100 |
| UBC 828 | TGT GTG TGT GTG TGT GA | 49°C | 15 | 100 |

N = Número de bandas. P (%)^b Percentagem de polimorfismo

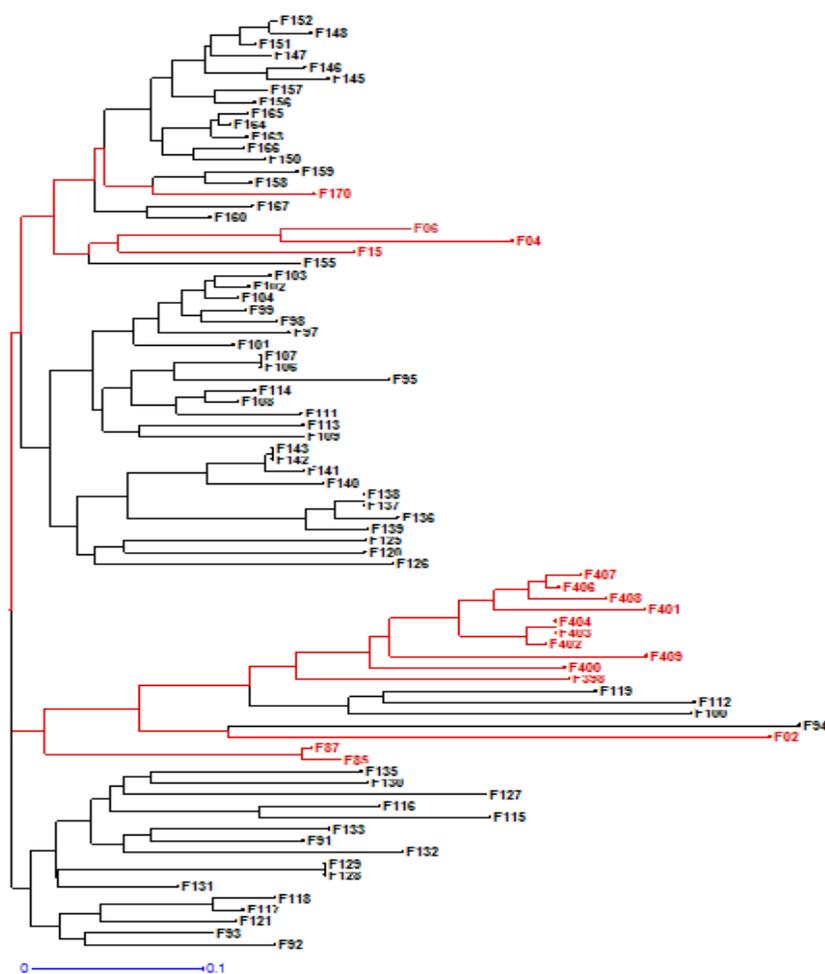
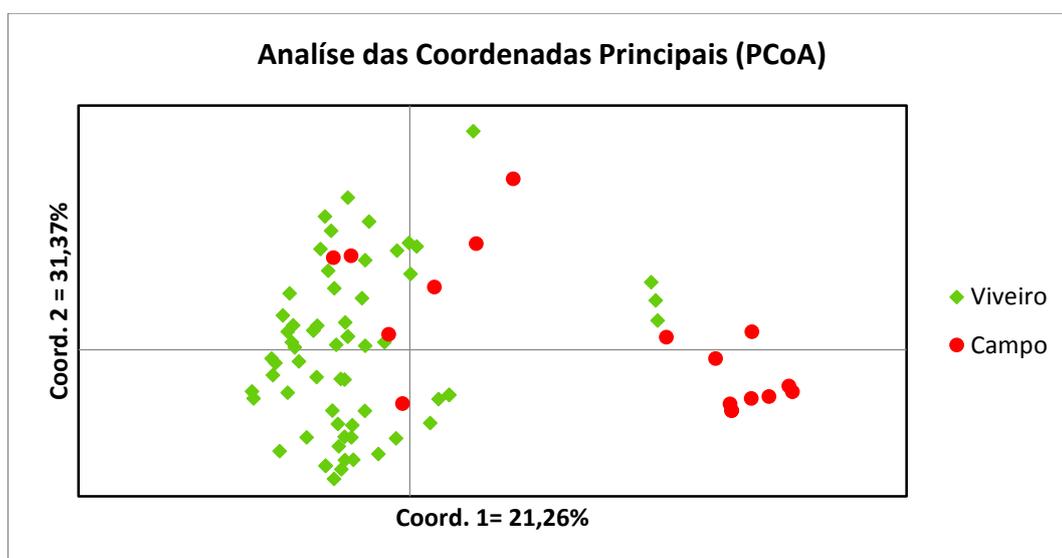


Figura 1. Dendrograma da similaridade entre os 81 isolados de *F. decemcellulare*, obtido pelo método UPGMA

A relação entre os 81 isolados foi comparada pela análise das coordenadas principais (PCoA) entre os isolados de viveiro e de campo. As duas primeiras coordenadas principais apresentaram 21,26% e 31,37% da variação total. Nesta análise foi observada uma tendência de agrupamento dos isolados obtidos em viveiro que foi confirmada pela análise da estrutura das duas populações (Figura 2 A e B). A variância dentro das populações apresentou o maior valor (72%) da variação total, enquanto que 28% da variação foi observada entre as populações.

A



B

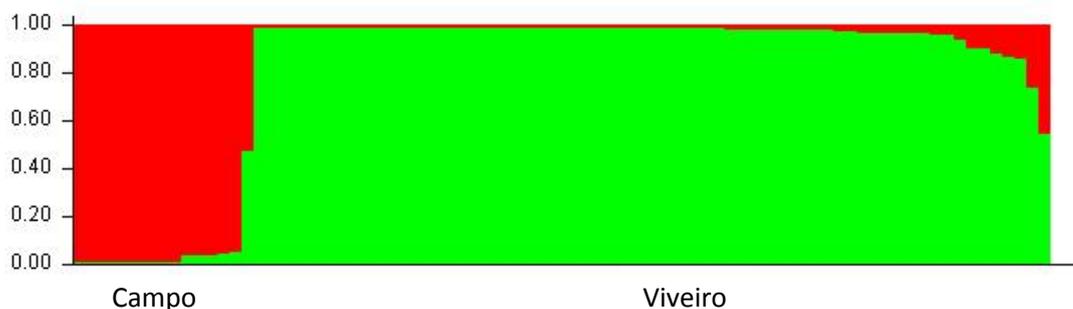


Figura 2. Em A representação gráfica da análise de coordenadas principais (PCoA) representa a diversidade genética entre os 81 isolados de *Fusarium decemcellulare* avaliados a partir de marcadores moleculares ISSR. Em B estrutura da população do patógeno obtida em viveiro em verde e no campo em vermelho. Escala na vertical corresponde à porcentagem de probabilidade de atribuição ao grupo genético pertencente ao viveiro ou campo.

Conclusões

A diferença significativa na razão entre *Mat-1* e *Mat-2* identificada na população de isolados obtidas em viveiro indica ausência de reprodução sexuada.

Uma elevada diversidade foi identificada em ambas as populações analisadas com base no marcador molecular ISSR independente da destruição e proporção 1/1 de *mating type*.

Duas populações estruturadas foram identificadas de acordo com o local de coleta e ausência de correlação genética entre os isolados e o sintoma do qual o fungo foi obtido.

Referências

- Alexander JV, Carmichael NM (1973). Divergent patterns of ascus development in homothallic and heterothallic isolates of *Calonectria rigidiuscula*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 100:35-40.
- Araújo JCA, Pereira JCR, Gasparotto L, Arruda MR, Moreira A (2007). Embrapa - Comunicado Técnico. *Antracnose do guaranazeiro e seu controle*. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/681674/1/ComTec462007.pdf>
- Batista MF, Bolkan HA (1982). O superbrotamento do guaranazeiro. *Fitopatol. Bras.* 7:315-317.
- Bayraktar H, Dolar FS, Maden S (2008). Use of RAPD and ISSR Markers in Detection of Genetic Variation and Population Structure among *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris* Isolates on Chickpea in Turkey. *Journal of Phytopathology*, Berlin, 156(3):146-154.
- Campos MPO, Riechelmann R, Matins LC, Hassan BJ, Casa FBA, Del-Giglio A (2011) Guarana (*Paullinia cupana*) improves fatigue in breast cancer patients undergoing systemic chemotherapy. *J. Altern. Complement. Med.* 17: 505-512.
- Costa RSDC, Nascente AS, Ferreira MDGR (2005). Cultivo do Guaranazeiro em Rondônia Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Guarana/CultivodoGuaranazeiroRO/index.htm>> Acessado em 18/10/2016.
- Doyle JJ, Doyle JL, Hortorium LHB (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- EBDA (2015). Site consultado - www.ebda.ba.gov.br Acessado em 01/01/2015.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Mol. Ecol.* 14:2611–2620
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003). Inference of population structure: Extensions to linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164: 1567-1587.
- Farr DF, Rossman AY (2016). Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved December 12, disponível em: <http://nt.ars-grin.gov/fungalatabases>.

- Ford EJ, Bourret JA, Snyder WC (1967). Biologic specialization in *Calonectria Fusarium rigidiuscula* in relation to green point gall of Cocoa. *Phytopathology*.57(7):710-712.
- Guimarães EA (2013). *Biologia Reprodutiva, Filogenia e patogenicidade de Fusarium decemcellulare*. Dissertação. (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais. 68p.
- Hinz RH, Silva CM, Pereira A, Tcacenco FA (2009). Análise da diversidade genética de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* no Estado de Santa Catarina-Brasil. Reunión de grupos de interés sobre los riesgos de la raza tropical, 4.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2013) Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa_201308.pdf>. Acesso em: 10 de Set. 2015.
- Leslie JF, Summerell BA (2006) *The Fusarium laboratory manual*. Malden: Blackwell. 388p.
- Mcdonald BA, Linde C (2002). Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.* 40:349-379.
- Queiroz CÁ, Silva AF, Cruz JC, Silva GF, Sousa NR, Matos KS, Hanada RE (2015). Caracterização de *Fusarium decemcellulare* isolado de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) por meio de ERIC-PCR – In: Oliveira et al. (eds.) Diversidade Microbiana da Amazônia. Manaus: INPA. p. 301-309.
- Silva CM (2009). *Análise da diversidade genética por marcadores RAPD e SSR em Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* no Estado de Santa Catarina. Dissertação. (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina. 65p.
- Perrier X, Jacquemoud-Collet, J.P. (2006). DARwin software <http://darwin.cirad.fr/darwin>.
- Peakall R, Smouse PE (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*. 28:2537-2539
- Pritchard J, Stephens M, Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959.