

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA - PPGBIOTEC
CENTRO DE APOIO MULTIDISCIPLINAR – CAM

DISSERTAÇÃO

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DA POPULAÇÃO DE *Fusarium
decemcellulare* ISOLADO DE GUARANAZEIRO (*Paullinia cupana* var *sorbilis*)**

CLAUDIA AFRAS DE QUEIROZ

Manaus - AM

2016

CLAUDIA AFRAS DE QUEIROZ

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DA POPULAÇÃO DE *Fusarium
decemcellulare* ISOLADO DE GUARANAZEIRO (*Paullinia cupana* var *sorbilis*)**

Orientador: Dr. Gilvan Ferreira da Silva

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas como requisito para obtenção de título de Mestre em Biotecnologia.

Unidade executora

Empresa brasileira de pesquisa agropecuária - EMBRAPA

Prazo de execução

24 meses

Fonte financiadora

Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM

Manaus - AM

2016

Ficha Catalográfica

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

Queiroz, Claudia Afras de

Q3d Diversidade e estrutura genética da população de *Fusarium decemcellulare* isolado de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) / Claudia Afras de Queiroz. 2016
65 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Gilvan Ferreira da Silva
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Superbrotamento. 2. Gemas vegetativas. 3. Hipertrofia floral. 4. Galhas. I. Silva, Gilvan Ferreira da II. Universidade Federal do Amazonas III. Título



98ª. ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

No dia 04 de março de 2016 às 10h, na Sala de Aula do Bloco “G” Setor Sul - UFAM. **Claudia Afras de Queiroz** defendeu sua Dissertação de Mestrado intitulada: “**Diversidade e estrutura genética da população de *Fusarium decemcellulare* isolado de guaranaziero (*Paullinia cupana* var *sorbilis*)**”.

Banca de Examinadores:

Membros	Parecer	Assinatura
Dr. Gilvan Ferreira da Silva – (EMBRAPA)	Aprovado (<input checked="" type="checkbox"/>) Reprovado ()	
Dra. Ieda Hortencio Batista – (UEA)	Aprovado (<input checked="" type="checkbox"/>) Reprovado ()	
Dr. Rogério Eiji Hanada - (INPA)	Aprovado (<input checked="" type="checkbox"/>) Reprovado ()	

Manaus, 04 de março de 2016.

Resultado Final: Aprovado (a) ()
Reprovado (a) ()

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia
Coordenador PPGBIOTEC/UFAM
Prof. Dr. Carlos Gustavo Nunes da Silva
Coordenador

*A todos da minha família, em especial a Lucy Daniela Rocha,
pelo suporte, cuidado, amor e carinho!*

DEDICO

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus pelo o Dom da Vida e por todas as inúmeras bênçãos concedidas.

Aos meus filhos/sobrinhos que são a alegria da minha vida Karina, Fernando, Rafael e Letícia
Gabriela.

A Minha querida mãe Perpetua irmã Claudiane e irmãos Fábio e Fabrício por todo suporte, torcida e
carinho.

Ao meu querido orientador, Dr. Gilvan Ferreira da Silva pela paciência, amizade, orientação, por me
nortear nesse mundo da pesquisa;

A Universidade Federal do Amazonas – UFAM ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação
em Biotecnologia – PPGBIOTEC, e aos professores pelo conhecimento transmitido.

À FAPEAM – Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Amazonas, pela concessão da bolsa de
estudos sem ela não teria esse título;

A Embrapa Amazônia Ocidental, pela estrutura e permissão para execução do meu trabalho no
Laboratório de Biologia Molecular, em especial, aos técnicos Jeferson Chagas, Karina Bichara e Irani
Moraes, pelo suporte, ajuda e orientação.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desse trabalho, muito
obrigada!

RESUMO

O guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) é uma espécie de origem amazônica com grande potencial econômico devido as diferentes propriedades químicas de interesse farmacêutico e industrial. O Brasil é o único produtor de guaraná sendo a Bahia seguida do Amazonas os principais produtores. Entre os principais fatores responsáveis pela redução da produção no Amazonas estão as pragas e doenças causadas por fungo. Por muitos anos considerados uma doença secundária, o superbrotamento causado por *Fusarium decemcellulare* atualmente constitui um problema para a cultura do guaraná no Amazonas e foi recentemente também reportada na Bahia. A doença apresenta pelo menos três sintomas bem característicos como o superbrotamento de gemas vegetativas, hipertrofia floral e galhas no caule. O presente trabalho teve como objetivo analisar a diversidade e estrutura da população, bem como a filogenia de *F. decemcellulare* proveniente dos principais municípios produtores de guaraná no estado do Amazonas. Foram analisados 299 isolados de *F. decemcellulare* coletados de nove municípios do estado do Amazonas com base em 10 marcadores ISSR que geraram 167 bandas polimórficas. O número de alelos observados (N_a) variou entre 1,48 para Presidente Figueiredo à 1,98 para Manaus e o número efetivo de alelos (N_e) foi de 1,55 para Maués e de 1,41 para Presidente Figueiredo, os valores para Heterozigosidade (H) e Índice de Shannon (I) foram muito similares entre as nove populações, com mínimo para Rio Preto da Eva (H=0.29 e I=0.43) e máximo para Manaus (H=0.39 e I=0.48). A análise de variância molecular (AMOVA) revelou que a maior variabilidade genética está dentro das populações de *F. decemcellulare* (83%) do que entre as populações. E nenhuma correção genética foi verificada entre sintomas do qual o isolado foi obtido ou por local de coleta. Nas análises de estrutura de população e relacionamento genético entre os 299 isolados das nove populações foram estruturados em dois grupos (K=2) indicando a ocorrência de duas populações do patógeno na região. Para verificar se os diferentes grupos identificados correspondem à mesma espécie filogenética sequenciamento parcial do gene EF-1 α foi obtido com sucesso para 288 isolados e com base em 19 haplótipos identificados na população, 34 isolados foram selecionados para análise filogenética com mais três regiões (*rpb1*, *rpb2* e ITS+LSU rDNA). As quatro regiões concatenadas formaram três diferentes clusters sugerindo a ocorrência de três possíveis espécies de *F. decemcellulare* em guaranazeiro. A análise dos 34 isolados com ISSR também indica a ocorrência de três clusters com 54% de similaridade, embora o marcador não tenha sido capaz de diferenciar as possíveis espécies identificadas na filogenia.

Palavras chaves: Superbrotamento; Gemas vegetativas; Hipertrofia floral; Galhas;

ABSTRACT

Guarana plant (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) is an Amazonian species with great economic potential because of the different chemical properties of pharmaceutical and industrial interest. Brazil is the only of guarana seeds producer and Bahia followed by Amazonas major producers. Pests and diseases caused by fungi are among the main factors responsible for low production in the Amazon region. For many years considered a disease with no economic importance the oversprouting caused by *Fusarium decemcellulare* that is becoming a serious problem for the guarana culture in the Amazon and was also recently reported in guarana crops in the Bahia state, the disease has at least three characteristic symptoms: oversprouting of vegetative buds, floral hypertrophy and stem galls. This study aimed to analyze the diversity and genetic structure of *F. decemcellulare* from the main producing area of guarana in the Amazonas by molecular ISSR marker and conduct phylogenetic analysis to determine the occurrence of species complex in guarana plant. We analyzed 300 isolates collected from eight districts of Amazonas state based on 10 ISSR markers that generated 167 polymorphic bands. The number of observed alleles (N_a) ranged from 1.48 (Presidente Figueiredo) to 1.98 (Manaus) and the effective number of alleles (N_e) was 1.54 (Urucará) and 1.41 (Presidente Figueiredo), the values for heterozygosity (H) and Shannon Index (I) were very similar among the eight populations, with minimal to Rio Preto da Eva ($H = 0.29$ and $I = 0.43$) and maximum to Manaus ($H = 0.39$ and $I = 0.48$). The analysis of molecular variance (AMOVA) showed high genetic variability within populations (77%). Population genetic analysis by PCO (Principal coordinates analysis) and genetic structure of 300 isolates identified two populations from *F. decemcellulare* in guarana plant in Amazon. To verify if the different populations identified represent the same phylogenetic species, partial sequencing of the EF-1 α was successfully obtained for 275 isolates and based on 19 haplotypes identified in the population 34 isolates were selected to phylogenetic analysis with (*rpb1*, *rpb2* and ITS + LSU rDNA). The concatenated data from four regions grouped isolates in three different clusters suggesting the occurrence of three putative species in guarana plant. The analysis of 34 isolates with ISSR also revealed the occurrence of three clusters with 54% similarity, although the marker has not been able to differentiate the putative species identified in the phylogeny. In both cases isolates were not grouped by symptoms, geographical origin or *mating type*, indicating the occurrence of different species can be the main factor to cluster distribution of *F. decemcellulare* from guarana plant.

Key words: oversprouting; vegetative buds; floral hypertrophy; galls; molecular marker

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Frutos do guaranazeiro.....16
- Figura 2** – Inflorescência do guaranazeiro. **A** e **B** – Inflorescência saudável; **C** e **D** – Inflorescência doente com hipertrofia e hiperplasia floral.....21
- Figura 3** – **A** - Superbrotamento das gemas vegetativas; **B** – Foto ampliada do superbrotamento da gema vegetativa; **C**- Encurtamento dos entrenós.....21
- Figura 4** – - Galha no caule; **B** – Galha no caule com gemas compactadas e hipertrofiadas.....22
- Figura 5** – Sintomas de superbrotamento em guaranazeiro. **1**-hipertrofia/hiperplasia floral; **2**-superbrotamento da gema; **3**-galhas do caule.....27
- Figura 6** – Dendrograma baseado na identidade genética de Nei (1978) entre as nove populações de *Fusarium decemcellulare*.....33
- Figura 7** – Dendrograma obtido pelo agrupamento UPGMA de 299 isolados de *Fusarium decemcellulare* pelo coeficiente de Dice. ■ Boa Vista do Ramos; ■ Presidente Figueiredo; ■ Itacoatiara; ■ Itapiranga; ■ Manaus; ■ Maués; ■ Rio Preto da Eva; ■ São Sebastião de Uatumã e ■ Uruará.....34
- Figura 8** – Número de (K) que melhor explica a estrutura das nove populações de *Fusarium. decemcellulare*.....36

Figura 9 – Análise de agrupamento $k=2$ para <i>Fusarium decemcellulare</i> isolado de guaranazeiro no estado do Amazonas obtido a partir de 299 isolados, as cores verde e vermelha correspondem a cada grupo inferido.....	37
Figura 10 - Análise de coordenadas principais (PCoA). A - Representação gráfica dos 299 isolados de nove populações de <i>Fusarium decemcellulare</i> coletados em guaranazeiros do Estado do Amazonas; B - os grupos identificados por STRUCTURE em azul a população um e em vermelho a população dois.....	38
Figura 11 - Dendrograma obtido pelo agrupamento UPGMA dos 34 isolados de <i>Fusarium decemcellulare</i> pelo coeficiente de Dice. Os três cluster identificados por cor, cluster 1 na cor lilás, cluster 2 na cor vermelha e na cor verde o cluster 3.....	42
Figura 12 - Dendrograma obtido pelo agrupamento UPGMA dos isolados de <i>Fusarium decemcellulare</i> pelo coeficiente de Dice, utilizando o programa NTSYS.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição da população de <i>Fusarium decemcellulare</i> do Estado do Amazonas por local de coleta.....	26
Tabela 2 - Marcadores ISSR selecionados para análise da diversidade em <i>Fusarium decemcellulare</i>	28
Tabela 3 - Primers de ISSR utilizados para análise da diversidade em <i>Fusarium decemcellulare</i>	30
Tabela 4 - Parâmetros de diversidade genética das nove populações de <i>Fusarium decemcellulare</i> coletadas em guaranazeiros no Estado do Amazonas.....	32
Tabela 5 - Identidade (acima diagonal) e a distância genética (abaixo diagonal) de Nei (1978) entre as nove populações de <i>Fusarium decemcellulare</i>	32
Tabela 6 – Sumário da AMOVA expondo a distribuição de variação dentro e entre as nove populações de <i>Fusarium decemcellulare</i>	39
Tabela 7 - Padrões totais de bandas para dados binários (diplóide) dos grupos identificados por STRUCTURE para população de <i>Fusarium decemcellulare</i>	39
Tabela 8 - Relação dos isolados de <i>Fusarium decemcellulare</i> separados em cluster de acordo com o filograma obtido com base na análise combinada de <i>ef-1a</i> , <i>rpb1</i> , <i>rpb2</i> e ITS+LSU rDNA.....	41
Tabela 9 - Relação dos isolados de <i>Fusarium Decemcellulare</i> com sintomas e locais de coleta.....	56

LISTA DE ABREVIações

BOVDR – Boa Vista do Ramos

PFIGU – Presidente Figueiredo

FDC – *Fusarium decemcellulare*

ITACO – Itacoatiara

ITAPI - Itapiranga

MANAU – Manaus

MAUES - Maués

RPDEV – Rio Preto da Eva

SSDUA – São Sebastião de Uatumã

URUCA – Uruará

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	14
2 – Revisão	16
2.1 – Guaranazeiro.....	16
2.2 – Gênero <i>Fusarium</i>	17
2.2.1 – <i>Fusarium decemcellulare</i>	17
2.2.2 – Doenças causadas por <i>Fusarium decemcellulare</i>	19
2.3 – Diversidade e Estrutura de população de patógeno.....	22
3 – OBJETIVOS	25
3.1 – Geral.....	25
3.2 – Específicos.....	25
4 – MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 - Isolamento de <i>F. decemcellulare</i>	26
4.2 – Cultivo de monospórico.....	27
4.3 – Extração de DNA genômico.....	27
4.4 – Genotipagem por ISSR.....	27
4.5 – Análises da diversidade e estrutura da população de <i>F. decemcellulare</i>	28
4.6 – Análise filogenética de <i>Fusarium decemcellulare</i>	29
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 – Análise da população de <i>F. decemcellulare</i> com marcador ISSR.....	30
5.2 – Diversidade genética de <i>F. decemcellulare</i> isolados de guaranazeiro.....	31
5.3 - Estrutura da população de <i>F. decemcellulare</i> isolado de guaranazeiro.....	35
5.4 - Seleção de haplótipos EF-1 α	40
5.5 - Análise filogenética de <i>F. decemcellulare</i> obtido de guaranazeiro.....	40
6 – CONCLUSÃO	44
7 – RECOMENDAÇÕES E PERSPECTIVAS	44
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
9 – APÊNDICE A - Relação dos isolados de <i>F. decemcellulare</i>	56
10 – APÊNDICE B - Dendrograma obtido pelo agrupamento UPGMA dos isolados de <i>F. decemcellulare</i>	63

1. INTRODUÇÃO

O guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) é uma espécie nativa da Amazônia de grande importância econômica para a região, pois suas sementes são matéria-prima para a produção de bebidas industrializadas e energéticos pois são ricas em cafeína além de apresentar outros compostos químicos como flavonoides, teobromina, teofilina e taninos, que lhes conferem características estimulantes e medicinais (Campos et al., 2011).

No cenário mundial, o Brasil é praticamente o único produtor de guaraná em escala industrial, sendo que o estado da Bahia contribui com 72,4% da produção e o Amazonas com 19,5% (CONAB 2014). Até a década de 80 o principal produtor nacional era o município de Maués, seguido por outros como Parintins, Itacoatiara, Manacapuru e Manaus, nessa mesma época a plantação de guaraná vinha sendo introduzida no estado da Bahia (Correa et al., 1979).

As doenças são os principais fatores que contribuem para essa baixa produtividade no Estado do Amazonas, dentre elas, está o superbrotamento que tem como agente etiológico *Fusarium decemcellulare*, que afeta desde o estágio de mudas às plantas adultas impedindo seu desenvolvimento consequentemente acarretando um problema sério para a cultura do guaraná no estado (Batista e Bolkan 1982).

De acordo com Araújo e colaboradores (2007), o superbrotamento tem ocorrência generalizada nos municípios produtores do estado do Amazonas, contudo a maior prevalência foi observada em Urucará (41,36%), Itacoatiara (31,43%), Maués (27,89%) e Boa Vista do Ramos (23,77%). O estado da Bahia teve os primeiros sintomas da doença reportados em novembro de 2013.

A doença afeta órgãos em crescimento ativo como as gemas vegetativas e apresentam pelo menos três sintomas bem característicos como o superbrotamento das gemas vegetativas (característica pela presença de inúmeras brotações a partir de uma gema, apresentando entrenós curtos a partir dos quais surgem vários ramos secundários), hipertrofia floral (caracterizada pela má formação do tecido, endurecimento e secamento das flores) e galhas no caule (caracterizadas por inúmeros brotos numa mesma gema, formando uma massa desordenada e compacta) (Araujo et al., 2007).

Desde a identificação do agente etiológico na década de 80 por Batista e Bolkan (1982) e os trabalhos epidemiológicos realizados por Araújo e colaboradores (2007), pouca importância foi dada a este patossistema e inúmeras questões ainda continuam sem respostas, não se sabe exatamente como esse fungo penetra no hospedeiro, se em guaranazeiro existe a ocorrência de

formas homotáticas (não patogênicas) e heterotáticas (patogênicas) como observado em cacauero, muito menos sobre a diversidade e comportamento da população nas áreas produtoras de guaraná.

Diante disso, a presente pesquisa visa analisar a estrutura e diversidade genética *F. decemcellulare* isolado de mudas e plantas adultas de guaranazeiro com superbrotamento, hipertrofia floral ou galhas por meio do marcador molecular ISSR.

2. REVISÃO

2.1 - Guaranazeiro

O guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) é uma espécie nativa da Amazônia de grande importância econômica para a região, de cultura perene sua produção inicia em torno dos três anos e segue produzindo até vinte anos. Seus frutos apresentam a coloração vermelha e, em menores proporções, alaranjada e amarela, são colhidos quando a casca está parcialmente aberta evitando a queda das sementes (Figura 1). As sementes são ricas em cafeína, flavonoides e taninos, que lhes conferem características estimulantes e medicinais (Campos et al., 2011). O extrato das sementes de guaraná em forma de pó ou xarope é matéria-prima para a produção de bebidas industrializada e energética. Já na indústria farmacêutica os compostos ativos são utilizados como antitérmico, antidiarreico, estimulante, analgésico e antigripal (Costa et al., 2005).



Figura 1 - Frutos do guaranazeiro.

O Brasil é praticamente o único produtor de guaraná em escala industrial, o estado da Bahia contribui com 72,4% da produção e o Amazonas com 19,5% (IBGE 2014). Até a década de 80 o principal produtor nacional 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 no baixo sul da Bahia onde havia a antiga zona cacaeira iniciaram o cultivo de guaraná. Em menos de dez anos, com plantios mais novos e produtivos, a Bahia se transformou no maior produtor mundial,

com 2.800 mil toneladas de sementes anuais enquanto o Amazonas fica em segunda posição sendo responsável por em média 1.100 toneladas na safra de 2014 (IBGE 2014).

Atualmente o baixo sul da Bahia é responsável por exportar o produto em pó e em grãos para diversos países como: Estados Unidos, Alemanha, Itália e França (EBDA 2014). Nas condições do Sul da Bahia, praticamente não havia problemas de pragas e doenças que causam danos econômicos aos guaranazeiros, ao contrário do município amazonense de Maués, que teve seu plantio atingido pela antracnose em associação com outras doenças como o superbrotamento causado *F. decemcellulare*, que afeta desde o estágio de mudas às plantas adultas impedindo seu desenvolvimento, conseqüentemente acarretando um problema sério para a cultura do guaraná no estado onde houve coevolução entre os patógenos e hospedeiros. Contudo, em 2013, sintomas de superbrotamento foram reportados no baixo sul da Bahia (Relatório da Câmara Setorial de Guaraná, 2013) e pragas como o tripses também já foram relatadas na região (Lucio Pereira Santos, comunicação pessoal 2015). Por mais que relatos oficiais destas pragas e doenças não estejam disponíveis, isto só reforça a necessidade de pesquisa e estudos visando o desenvolvimento de estratégias de resistência.

2.2 - Gênero *Fusarium*

O gênero *Fusarium* apresenta mais de 780 espécies e subespécies descritas (Zipcodezoo, 2016), tem como característica crescimento rápido, colônias com coloração pálida ou colorida variando do violeta a púrpuro escuro ou do creme ao laranja, com micélio aéreo difuso (Dosmsch, et al., 1980), com distribuição cosmopolita sendo encontrado no solo, ar, plantas e alimentos (Urban et al., 2010), bastante ativo na decomposição de substrato celulósicos das plantas, sendo que alguns isolados são parasitas de plantas. Em humanos, cujo sistema imunológico está enfraquecido, podem ocorrer infecções disseminadas, espalhando-se pelo corpo inteiro. Os responsáveis por essas patogenicidades em humanos são os membros do complexo *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e raramente outras espécies de *Fusarium* (Zipcodezoo, 2016).

O gênero produz duas formas de conídios, os microconídios que são unicelulares e uninucleados e os macroconídios que são multicelulares onde cada célula possui somente um núcleo, sendo essa segunda, a forma mais comum encontrada, todos os núcleos de um macroconídios são geneticamente idênticos por serem descendentes mitóticos de um mesmo núcleo (Puhalla 1981).

2.2.1 - *Fusarium decemcellulare*

F. decemcellulare (teleomorfo *Albonectria rigidiuscula*) possui crescimento rápido em placa de petri contendo batata-dextrose-ágar, produzindo pigmento róseo (Gerlach e Nirenberg, 1982), culturas com cinco a sete dias de cultivo já produzem macroconídios que contém geralmente de 7 a 9 septos, com uma parede espessa, curvados e fusoides, possuem morfologia celular apical arredondada, enquanto que a morfologia basal tem o formato de um pé, são encontrados em uma massa de cor amarelada conhecido como esporodóquio (Leslie e Summerell, 2006). Os microconídios são produzidos em micélios aéreos algodonosos podendo ser formados em cadeias ou falsas cabeças, são transparentes em formato oval e não possuem septos (Gerlach e Nirenberg, 1982; Leslie e Summerell, 2006).

O estágio sexual de *F. decemcellulare*, o peritécio varia a coloração de branco ao pálido, possuindo forma subglobosa, globosa ou elipsóide. Diversos trabalhos mostram a ocorrência das formas homotática e heterotática e conseqüentemente dos alelos funcionais idiomorfos conhecidos como MAT-1 e MAT-2 presentes no mesmo cromossomo (Wollenweber e Reinking 1935; Alexander e Carmichael, 1973; Leslie e Summerell, 2006, Guimarães 2013).

Isolados homotáticos possuem os MAT-1 e MAT-2 podendo se autofecundar, nesses casos são raros recombinantes serem produzidos, já a forma heterotática para sua reprodução é indispensável o encontro de isolados que possuem *mating-types* distintos e tem como consequência o aumento da diversidade genética da população (Blakeslee, 1904; Duarte et al., 1999; Leslie e Summerel, 2006).

O *F. decemcellulare* possui uma clara diferenciação morfológica no número de ascósporos entre isolados homotáticos e heterotáticos, sendo encontrado quatro a oito ascósporos por ascos respectivamente (Wollenweber e Reinking 1935; Alexander e Carmichael, 1973; Leslie e Summerell, 2006, Guimarães 2013).

Trabalhos realizados por de Alexander e Carmichael, (1973) revelam que os isolados heterotáticos possuem um padrão aleatório de ascósporos variando de um a oito ascósporos por asco e sugerem ainda que a variação pode estar relacionada com deficiência nutricional. E que apesar dos homotáticos coexistirem com os heterotáticos, se houver a ocorrência de troca de genes entre os dois grupos deve ser extremamente rara, o que indica a existência de espécies biológicas diferentes, o que corrobora com trabalhos anteriores que já indicavam a existência de duas espécies (Ford et al., 1967; Alexander e Carmichael, 1973; Guimarães 2013).

Em trabalhos publicados na década de 70, é comum encontrar a descrição da fase sexuada apenas com a formação de quatro ascósporos por ascos (Booth 1960, Alexander e Cook 1965, Bourret e Ford et al., 1965). Para Alexander e Carmichael, (1973), possivelmente, essas descrições foram feitas baseadas apenas nos grupos homotáticos. Os autores ainda levantam a

hipótese de que esses resultados provavelmente podem ser atribuídos há uma possível abundância maior de homotáticos na natureza, o que aumenta a probabilidade de serem coletados para estudo.

A diferença na patogenicidade entre isolados homotáticos e heterotáticos já havia sido relatada nos estudos de Ford et. al., 1967, Thomas e Snyder 1970, utilizando isolados de cacauzeiro observaram que as formas homotáticas não causam a doença, diferentemente da heterotática. Guimarães (2013) trabalhando com isolados de cacauzeiro, confirmou a diferenciação morfológica existente entre isolados homotáticos que possuem quatro ascósporos por asco e isolados heterotáticos com oito ascósporos por asco, assim como o modo de vida endofítico de um isolado homotático inoculado em *Theobroma cacao*.

Análise filogenética realizada por Guimarães (2013) com base em sequências parciais dos genes *tef-1 α* , *rpb2*, *act1* e da região ITS-LSU de isolados obtidos de sintomas como galha-floral e superbrotamento de mangueira, cacauzeiro, *Spathodea campanulata* (Espatódea), pimenta do reino, serrapilheira, solo e guaranazeiro, mostrou a ocorrência de duas espécies filogenéticas uma homotática e outra heterotática indicando a ocorrência de um complexo de espécies em *F. decemcellulare* já relatadas desde 1967.

Segundo Almeida e Araújo (2013), o termo “complexo de espécies” indica organismos que pertencem a diferentes espécies, mas que apresentam um padrão morfológico, fisiológico e/ou outros caracteres fenotípicos similares. Contudo, do ponto de vista de estrutura e genética de população, assim como mostrado em *F. decemcellulare*, pode ocorrer distinção em aspectos como patogenicidade e suscetibilidade, bem como em sua epidemiologia tornando crítica sua correta identificação e distribuição na população.

2.2.3 - Doenças causadas por *Fusarium decemcellulare*

De acordo com Farr e Rossman (2016) já foram realizados 134 registros em 73 espécies hospedeiras diferentes principalmente em plantas dicotiledôneas. Entretanto já foram relatados casos em monocotiledônea como arroz e milho. Além dos casos reportados na lista da USDA mencionada acima, o patógeno também foi encontrado em mais seis espécies como *seringueira* (*Hevea brasiliensis*), erva-mate (*Ilex paraguariensis*), limão-de-Caiena (*Averrhoa bilimbi L.*), café (Coffee arabica) e *Cedrelinga cateniformis* e em 2015 foi reportado em rambutan (*Nephelium lappaceum*), longan (*Dimocarpus longan*) ambos da mesma família do guaranazeiro (Bastos e Santos, 2001; Poletto et al., 2004; Lombard et al., 2008; Ms. Luz M. Serrato-Diaz et al., 2015).

Os sintomas causados por *F. decemcellulare*, são muito variáveis e dependem muito do hospedeiro e do tecido ou órgão atingido. São observados sintomas como a formação de cancrs em órgãos lenhosos da planta, podendo causar rachaduras longitudinais e deformação nos galhos,

impedindo a circulação da seiva causando a morte prematura da planta, essa doença já foi descrita em hospedeiros como a fruteira-do-conde (*Annona squamosa* L.), seringueira (*H. brasiliensis*) e cedro-branco (*C. cateniformis*) (Junqueira et al., 2001; Lombard et al., 2008; Dória, 2012). A podridão de raízes com consequente amarelecimento e perdas das folhas é relatada em erva-mate (*Ilex paraguariensis*) (Grigoletti e Auer 2001).

O sintoma mais comumente relatado é o superbrotamento de estruturas como flor, gemas e caule reportado em vários hospedeiros como a mangueira, cacaueteiro, limão-de-caiena e guaranazeiro (Ploetz et al., 1996; Junqueira et al., 2001; Bastos e Santos, 2001, Vicente et al., 2012).

Em guaranazeiro o superbrotamento atinge plantas nos diferentes estádios de desenvolvimento desde a fase de mudas e pode atacar diferentes órgãos ou tecidos como flor, gemas vegetativas e caule causando sintomas variados, classificados como hipertrofia/hiperplasia floral, superbrotamento da gema e galha no caule, em todos os sintomas temos morte precoce dos tecidos afetados (Batista e Bolkan 1980, Batista, 1982; Araújo et al., 2006). O tripses artrópode recentemente reclassificado como *Pseudophilothrips adisi* (zur Strassen, 1978) comb. nov. descrito de *Liothrips* (Mound et al., 2010), foi confirmado como inseto transmissor do superbrotamento em guaranazeiro em 1985 por Adis e colaboradores que isolaram *F. decemcellulare* a partir do tripses e confirmaram a habilidade deste em transmitir a doença.

A hiperplasia ou hipertrofia em inflorescência é caracterizado pela ocorrência da multiplicação exagerada de células (hiperplasia) e aumento de tamanho de parte das células no tecido das flores, deixando-as compactas e endurecidas (Figura 2). Essa anomalia ocorre no segundo semestre do ano, seguida da morte do tecido e secamento precoce da inflorescência (Araújo et al., 2006).

O superbrotamento das gemas vegetativas ocorre no primeiro semestre do ano e se caracteriza pelo aparecimento de uma ou várias brotações a partir de uma gema vegetativa, resultando na proliferação de ramos vegetativos com entrenós curtos, a partir dos quais surge nova onda de ramos secundários, resultando numa massa densa e irregular (Figura 3) acompanhadas de hiperplasia e hipertrofia com secamento e morte precoce dos tecidos (Batista, 1982; Araújo et al., 2006).

A galha ocorre nas gemas terminais de plantas jovens, ou nas gemas sucessivas de entrenós de ramos maduros de plantas adultas, se caracterizando pela proliferação de brotos diminutos numa mesma gema, formando uma massa compacta e desorganizada (Figura 4), o aparecimento de galha se dar em toda planta, nas regiões do caule e galhos, sem formação de

novos ramos a partir destas gemas ocorrendo o secamento e morte precoce destas massas de brotações (Araújo et al., 2006).

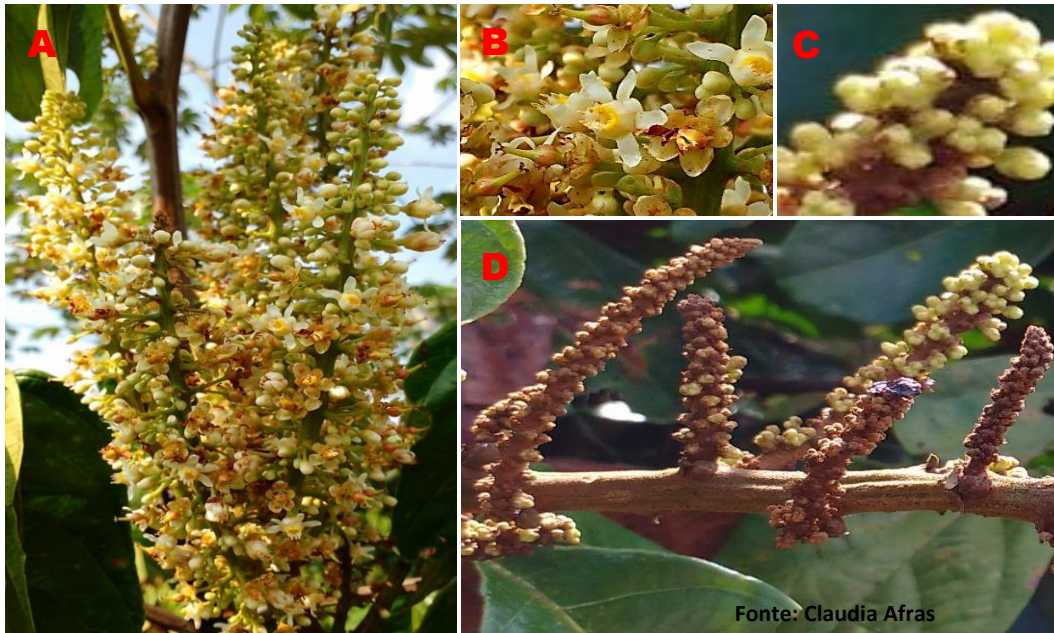


Figura 2 – Inflorescência do guaranazeiro. **A e B** – Inflorescência saudável; **C e D** – Inflorescência doente com hipertrofia e hiperplasia floral



Figura 3 – **A** - Superbrotamento das gemas vegetativas; **B** – Foto ampliada do superbrotamento da gema vegetativa; **C**- Encurtamento dos entrenós



Figura 4 –A - Galha no caule; B – Galha no caule com gemas compactadas e hipertrofiadas

Como mencionado anteriormente há indícios que *F. decemcellulare* em seu modo de vida endofítico (homotática) pode ser uma espécie diferente da patogênica (heterotática) (Ford et al., 1967; Alexander e Carmichael, 1973; Guimarães 2013). Contudo estudos mais aprofundados tanto sobre a interação, quanto acerca da biologia reprodutiva, filogenia e análise de genomas completos poderiam dar uma melhor compreensão do que levou as diferenças fisiológicas, genômicas e evolutivas que podem ser a chave para a compreensão da patogenicidade causado por este fungo.

2.3 - Diversidade e Estrutura de População de Patógeno

Segundo Leboldus et al (2015), em virtude do foco na resistência de plantas, estudos e ferramentas genética e genômica foram desproporcionalmente direcionadas para o hospedeiro, embora o entendimento da genética do patógeno seja igualmente importante.

O conhecimento sobre a dinâmica na população do patógeno é fundamental para determinação do risco na quebra de resistência e adequado controle do patógeno. As diferentes ferramentas moleculares, o custo mais acessível do sequenciamento de nova geração, permite atualmente combinar a análise da estrutura da população com a identificação de genes de virulência podem em conjunto ajudar no estabelecimento de uma resistência durável (MCDonalds & Linde 2002; Hammond-Kosack et al 2004; Leboldus et al 2015).

Com micro-organismos podem ser considerados dois tipos de diversidade genética, a diversidade gênica que se refere ao número e frequências de alelos em loci individuais numa população, e a diversidade genotípica que diz respeito ao número e frequência de genótipos multilocus, ou indivíduos geneticamente distintos numa população, essa última comum quando se

refere a indivíduos que se reproduzem de forma assexuada, as duas juntas contribuem para forma a estrutura genética e diversidade da população (McDonalds e Linde 2002).

A estrutura da população refere-se à quantidade da diversidade genética e sua distribuição dentro e entre as populações (Brown 1978). E é uma consequência das interações entre as cinco forças que afetam a evolução das populações: 1- mutação, 2-fluxo gênico e genotípico, 3- sistema de reprodução, 4- seleção e 5- tamanho da população. Portanto, um desequilíbrio em qualquer uma dessas cinco forças pode influenciar na estrutura da população (McDonalds e Linde 2002). O estudo da estrutura de população é importante por proporcionar uma melhor compreensão da história ecológica e evolutiva da espécie analisada (Hall et al., 1994; Nason et al., 1997; Rocha e Lobo, 1998).

O conhecimento da estrutura de populações do patógeno assim como seu potencial evolutivo é essencial para o controle da doença, o gerenciamento de genes de resistência e a elaboração de fungicidas e antibióticos eficazes (Palumbi, 2001).

Patógenos que possuem fluxo genotípico representa um risco maior do que o patógeno que possui o fluxo gênico, pois o fluxo genotípico envolve um pacote de alelos ligados e coadaptados que já foram selecionados, enquanto o fluxo gênico diz respeito apenas a frequência alélica, outra fator importante que aumenta o risco para a quebra da resistência do hospedeiro.

Além disto, devido à quantidade populacional do patógeno comparado a do hospedeiro, associado ao tipo de reprodução que pode ser sexuada/fluxo gênico, assexuada/fluxo genotípico ou mista, o patógeno leva vantagem nessa briga, pois a capacidade de mutação e seleção de genes de virulência é maior que a capacidade de mutação e seleção de gene de resistência do hospedeiro.

Estudos sobre a interação patógeno-hospedeiro, com a identificação de genes de resistências da planta e genes de avirulência do patógeno demonstram muitos avanços desde o primeiro modelo gene-a-gene proposto por Flor em 1956, principalmente com as novas ferramentas moleculares disponíveis, que permite uma rápida e ampla identificação de genes virulência, e efetores do patógeno que podem ser utilizados no combate a doença (Hammond-Kosack et al., 2004; Gawehns et al., 2012; Leboldus et al., 2015).

No que concerne *F. decemcellulare*, ainda não existem estudos sobre os mecanismos moleculares a interação patógeno-hospedeiro (fatores de patogenicidade ou virulência) utilizados no processo de infecção ou a respeito da variabilidade, diversidade e estrutura da população. E muitas perguntas ainda estão sem respostas como, por exemplo: existe alta ou baixa diversidade genética de *F. decemcellulare* isolados de guaranazeiro? *F. decemcellulare* possuem populações estruturadas?

O conhecimento sobre a diversidade e estrutura de população de *F. decemcellulare* fornecerá subsídios para o desenvolvimento de estratégia controle da doença em guaranazeiro. O estudo de diversidade será de suma importância para conhecer e entender os aspectos evolutivos da espécie, sua patogenicidade, virulência e dispersão no Estado do Amazonas. Neste sentido, será útil a identificação de diferentes haplótipos que poderão ser avaliados durante a fenotipagem para o desenvolvimento de plantas resistentes. Além disto, este foi o primeiro estudo em genética de populações deste patógeno e poderá servir de referência para estudos futuros nas várias culturas afetadas.

3. OBJETIVOS

3.1 - Geral

Analisar estrutura e diversidade da população de *Fusarium decemcellulare*, visando fornecer suporte aos programas de melhoramento do guaranazeiro.

3.2 - Específicos

Obter isolados a partir de material vegetal com sintomas de superbrotamento em guaranazeiro no estado do Amazonas;

Determinar se existe correlação genética entre isolados obtidos do mesmo sintoma;

Identificar diferentes háplótipos na população de *F. decemcellulare* visando à seleção de isolados na população do patógeno que possam ser utilizados na obtenção de plantas resistentes;

4 - MATERIAL E MÉTODOS

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

4.1 - Isolamento de *F. decemcellulare*

O isolamento foi realizado conforme descrito por Batista e Bolkan (1982) a partir de três diferentes sintomas de superbrotamento: hiperplasia de gemas vegetativas, galhas do caule e hipertrofia floral (Figura 5). Para obtenção da população de isolados representativa dos diferentes municípios produtores de guaraná do estado do Amazonas, as coletas foram realizadas em nove municípios: Maués, Presidente Figueiredo, Boa Vista do Ramos, Itacoatiara, Itapiranga, Urucará, São Sebastião de Uatumã, Rio Preto da Eva e Manaus (Tabela 1), os isolados de cada local foram denominados de populações, sendo assim trabalhamos com nove populações de *F. decemcellulare*. A fim de obter uma amostra mais representativa possível, o material foi coletado de acordo com a disponibilidade de sintomas no campo em cada área amostrada (Tabela 9, Apêndice A).

Tabela 1 – Distribuição da população de *Fusarium decemcellulare* do Estado do Amazonas por local de coleta

População	Município	Nº de Isolados
1	Manaus	90
2	Maués	52
3	Presidente Figueiredo	19
4	Boa Vista do Ramos	37
5	Itacoatiara	20
6	Itapiranga	04
7	Urucará	45
8	São Sebastião do Uacumã	15
9	Rio Preto da Eva	17
		299

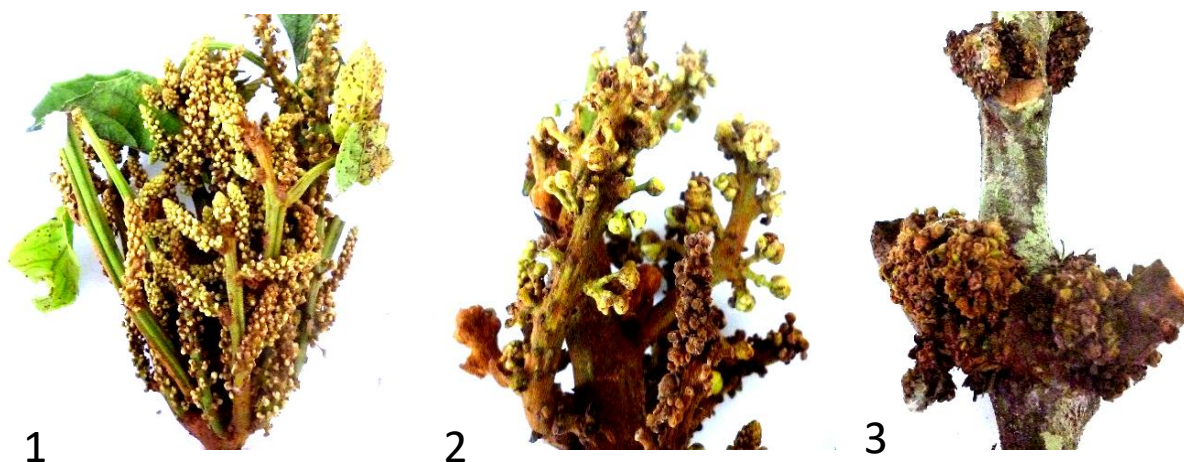


Figura 5 - Sintomas de supebrotamento em guaranazeiro. 1- hipertrofia/hiperplasia floral; 2- superbrotamento da gema; 3- galhas do caule

4.2 - Cultivo monospóric

As culturas provenientes dos isolamentos com morfologia típica de *F. decemcellulare* foram transferidas para SNA (Synthetic Nutrient-poor Agar) para esporulação. A cultura monospórica foi obtida a partir de uma suspensão de esporos plaqueado em ágar-água (AA) incubadas a 25 °C por 12 horas. Para o isolamento de um único conídio germinado foi utilizado um microscópio estereoscópico e cada isolado monospórico obtido foi preservado em água destilada esterilizada pelo método de *Castellani* e armazenados a 10 °C (*Castellani* 1939) e a -80°C.

4.3 - Extração de DNA

Os isolados monospóricos foram repicados e colocados em frascos com 50 mL de meio de cultura BD (batata, dextrose) sob agitação 125 rpm e temperatura de 25 °C por quatro dias para obtenção de massa micelial, que foi filtrada e seca para posterior extração de ácido nucléico.

Os micélios foram macerados em nitrogênio líquido para extração de DNA total conforme método CTAB (*Doyle & Doyle*, 1990). A quantificação do DNA extraído foi feita por meio do espectrofotômetro NanoDrop 2000 (*Thermo Fisher Scientific*) e em gel de agarose 0,8% para análise da quantidade e qualidade das amostras.

4.4 - Genotipagem por ISSR

Com o intuito de avaliar a diversidade genética e estrutura da população de *F. decemcellulare*, 299 isolados foram genotipados com 10 marcadores previamente selecionados (Tabela 2) a partir de 100 primers de ISSR (UBS set#9).

As reações de PCR foram realizadas em volume de 20 µL utilizando 50 ng 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 para amplificação foram de 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.

Tabela 2 - Marcadores ISSR selecionados para análise da diversidade em *Fusarium decemcellulare*

Primer	Sequência	Repetição	Anelamento
UBC 807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	(AG) ₈ T	49°C
UBC 811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	(GA) ₈ C	51°C
UBC 826	ACACACACACACACACC	(AC) ₈ C	49°C
UBC 827	ACACACACACACACACG	(AC) ₈ G	50°C
UBC 828	TGTGTGTGTGTGTGTGA	(TG) ₈ A	49°C
UBC 830	TGTGTGTGTGTGTGTGG	(TG) ₈ G	49°C
UBC 835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	(AG) ₈ YC	49°C
UBC 836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	(AG) ₈ YA	49°C
UBC 840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	(GA) ₈ YT	50°C
UBC 842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	(GA) ₈ YG	50°C

4.5 - Análises da diversidade e estrutura da população de *F. decemcellulare*

O polimorfismo gerado pelos marcadores ISSR foram convertidos em uma matriz binária, onde (1) indica a presença e (0) a ausência de cada banda produto da PCR para cada isolado das nove populações amostradas. A diversidade genética foi estimada método hierárquico de ligação média entre grupos UPGMA (-Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) com base no coeficiente de Dice com o auxílio do programa Popgene 1.31 Yeh et al. (1999).

Os parâmetros de genética populacional foram estimados para analisar as relações genéticas entre as nove populações e a AMOVA (Análise de Variância Molecular) foi implementada para verificar a distribuição hierárquica de diversidade genética entre e dentro das populações. Essas informações foram inferidas com auxílio do software GenAlex 6.1 (Peakall and Smouse, 2006).

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 interações 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.

4.6 - Análise filogenética de *Fusarium decemcellulare*

Triagem e seleção de isolados foram realizadas com base em 324 isolados por meio da amplificação e sequenciamento parcial do gene EF-1 α , cujos haplótipos gerados foram utilizados para seleção de 34 isolados os quais foram sequenciados com mais três regiões (RPB1, RPB2 e ITS+LSU rDNA). Os primers utilizados e as condições de amplificação foram realizadas conforme descrito por (O'Donnel et al., 1998) e (O'Donnel et al., 2008).

Os fragmentos foram purificados com Clean-up (Thermo) para remoção dos primers e posterior sequenciamento, usando o kit *BigDye*® Terminator v3.1 sequenciamento usando 3500 *Genetic Analyser*.

Os alinhamentos das sequências de nucleotídeos foram realizados no programa utilizando-se a ferramenta CLUSTALW (Thompson; Higgins; Gibson 1994), implementado pelo programa MEGA 7 (Kuma *et al.* 2016).

As inferências filogenéticas foram realizadas pelo método de Máxima verossimilhança, utilizando o modelo evolutivo Kimura-2 parâmetros, com bootstrap de 1000 repetições, com o auxílio do programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 (Mega 7.0).

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Análise da população de *F. decemcellulare* com marcador ISSR

Com base em 299 isolados analisados foram geradas 167 bandas. O número de bandas por marcador utilizado variou de 11(UBC 811) a 22 (UBC 842) e o tamanho dos fragmentos de ~250 a 4000 pares de base. Todas as bandas geradas foram polimórficas, indicando que os primers de ISSR selecionados foram altamente informativos para a população de *F. decemcellulare* (Tabela 3).

Tabela 3 – Primers de ISSR utilizados para análise da diversidade em *Fusarium decemcellulare*

Primer	Motivos	N ^a	P (%) ^b
UBC 807	(AG) ₇ T	15	100
UBC 811	(GA) ₈ C	11	100
UBC 826	(AC) ₈ C	15	100
UBC 827	(AC) ₈ G	16	100
UBC 828	(TG) ₈ A	15	100
UBC 830	(TG) ₈ G	17	100
UBC 835	(AG) ₈ YC	19	100
UBC 836	(AG) ₈ YA	21	100
UBC 840	(GA) ₈ YT	16	100
UBC 842	(GA) ₈ YG	22	100

N^a Número de bandas; P (%)^b Percentagem de bandas polimórfica por primer

O marcador ISSR tem sido largamente usado para o estudo genético de fitopatógenos por ser um dos marcadores genéticos mais versáteis por reunir a simplicidade e baixo custo (Capote et al., 2012), além de não necessitar de informação prévia da sequência de DNA em estudos de diversidade e variabilidade genética (Barth et al., 2002). Diversos trabalhos utilizando ISSR para análise da diversidade em diferentes espécies ou *forma specialis* (f. sp) do gênero *Fusarium* obtiveram número de bandas polimórficas entre 92,3 a 99,6% mostrando a habilidade do marcador em detectar variações genética entre os isolados (Hinz et al. 2009, Yuan et al. 2013, Dariva et al. 2015). Resultados que se assemelham ao do presente estudo, onde 100% das bandas foram polimórficas para todos os dez marcadores utilizados.

5.2 - Diversidade genética de *F. decemcellulare* isolados de guaranazeiro

A análise de nove populações de *F. decemcellulare* revelou que a maior similaridade genética entre os 299 isolados foi de 0,49%. O número efetivo de alelos (N_e) foi de 1,41 em Presidente Figueiredo e 1,55 em Maués. A heterozigosidade (H_e) foi utilizada para avaliar o conteúdo polimórfico de cada loco, variando de 0,238 em Presidente Figueiredo a 0,322 em Maués. Já o índice de Shannon proporcional a heterozigosidade teve a variação entre 0,353 para Presidente Figueiredo a 0,484 em Maués (Tabela 4), esses resultados revelam uma grande diversidade genotípica nas populações analisadas.

A maioria dos índices de diversidade depende da estimativa da heterozigosidade na população, contudo, o índice de Shannon apresenta vantagem nesse sentido, pois tem sido utilizado em análise populacional com marcadores dominantes, por não se basear na heterozigosidade.

Resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo foram encontrados por outros autores. Na pesquisa Shanshan e Lin (2011) utilizando dez marcadores de ISSR com 48 isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lini* obtiveram através do índice de Shannon (I) os valores de 0,478 a 0,1809, demonstrando uma abundante diversidade nas populações analisadas. Já no trabalho de Yuan e colaboradores (2013) utilizando o marcador ISSR encontraram uma variação de 0,0675 a 0,1117 para o índice de Shannon, revelando uma grande diversidade genotípica para as seis populações de espécie *F. oxysporum* f. sp. *lini*. No estudo de Nourollahi e Madahjalali (2016) analisando isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lentis*, obtiveram um total de 28 alelos produzidos por marcadores SSR, a diversidade genética de acordo com o índice de informação de Shannon variou entre 0,252 a 0,374, sendo a variabilidade genética considerada baixa.

As estimativas de identidade e de distância genética de Nei (1978) para *F. decemcellulare* nas nove populações são mostradas na Tabela 5. As populações que apresentaram a maior identidade genética entre elas foram as de Urucará e São Sebastião de Uatumã 0,2110, já os municípios de Itapiranga e Itacoatiara apresentaram a menor identidade genética 0,809, indicando que entre as nove populações de *F. decemcellulare* as dos municípios de Urucará e São Sebastião de Uatumã estão mais próximos geneticamente e as populações dos municípios de Itacoatiara e Itapiranga estão geneticamente mais distantes. A distância genética foi consistente com a identidade genética entre as mesmas populações, esses resultados podem estar relacionados às distâncias geográficas entre as regiões de coleta, que variou entre de 50,9 km a 339 km a partir de Manaus. O dendrograma foi construído entre as nove populações a partir desta matriz de identidade genética de Nei (1978) pelo método UPGMA (Figura 6).

Tabela 4 - Parâmetros de diversidade genética das nove populações de *Fusarium decemcellulare* coletadas em guaranazeiros no Estado do Amazonas

População	N	Pp	Na	Ne	I	He	uHe
Manaus	90	97,63	1,981	1,543	0,473	0,301	0,320
Maués	52	97,01	1,964	1,553	0,484	0,322	0,325
Presidente Figueiredo	19	67,66	1,485	1,417	0,353	0,238	0,244
Boa Vista do Ramos	37	94,01	1,916	1,491	0,430	0,285	0,289
Itacoatiara	20	89,22	1,838	1,531	0,452	0,304	0,311
Itapiranga	04	87,04	1,822	1,523	0,433	0,317	0,312
Urucará	45	89,82	1,838	1,544	0,476	0,319	0,323
São Sebastião de Uatumã	15	84,43	1,766	1,528	0,453	0,305	0,315
Rio Preto da Eva	17	85,03	1,778	1,505	0,435	0,291	0,299
Media Geral	299	89,06	1,831	1,516	0,447	0,300	0,305

N=Número de Isolados; Pp=Porcentagem de locos polimórficos; Na=Numero de alelos diferentes; Ne=Numero de alelos efetivos; I=Índice de informação de Shannon; He=Heterozigosidade; uHe=Heterozigosidade enviesada

Os valores demonstrados no dendrograma baseado na distância genética de Nei (1978) indica uma alta divergência genética entre as populações em função da eficiência do fluxo alélico. O fluxo de genes pode ter uma forte implicação na diversidade genética da população. Na ausência deste, a deriva genética causa o desenvolvimento de diferentes frequências alélicas em locus neutros, levando à diferenciação na população de isolados (Keller et al., 1997)

Tabela 5 - Identidade (acima diagonal) e a distância genética (abaixo diagonal) de Nei (1978) entre as nove populações de *Fusarium decemcellulare*

Pop ID	BOVDR	PFIGU	ITACO	ITAPI	MANAU	MAUES	RPDEV	SSDUA	URUCA
BOVDR	****	0.9695	0.8631	0.9386	0.9643	0.9238	0.8707	0.8728	0.8704
PFIGU	0.0310	****	0.8483	0.9350	0.9637	0.9174	0.8580	0.8675	0.8827
ITACO	0.1472	0.1645	****	0.8098	0.8643	0.8223	0.8597	0.8833	0.8910
ITAPI	0.0633	0.0672	0.2110	****	0.9559	0.9073	0.8534	0.8656	0.8764
MANAU	0.0364	0.0370	0.1458	0.0451	****	0.9471	0.8894	0.8958	0.9108
MAUES	0.0792	0.0862	0.1956	0.0973	0.0544	****	0.8497	0.8461	0.8700
RPDEV	0.1385	0.1531	0.1511	0.1585	0.1172	0.1629	****	0.9444	0.9409
SSDVA	0.1361	0.1421	0.1241	0.1443	0.1100	0.1671	0.0572	****	0.9801
URUCA	0.1388	0.1247	0.1154	0.1319	0.0934	0.1393	0.0609	0.0201	****

BOVDR – Boa Vista do Ramos
PFIGU – Presidente Figueiredo;
ITACO – Itacoatiara;
ITAPI – Itapiranga;
MANAU – Manaus;

MAUES – Maués;
RPDEV – Rio Preto da Eva;
SSDUA – São Sebastião de Uatumã;
URUCA – Urucará.

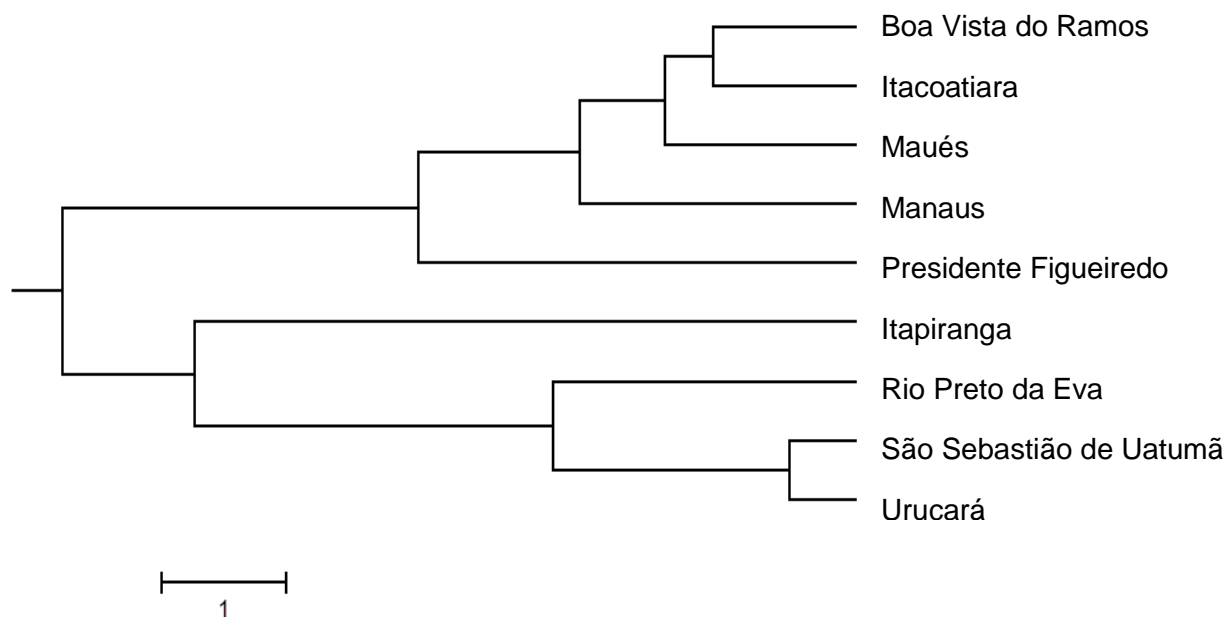


Figura 6 - Dendrograma baseado na identidade genética de Nei (1978) entre as nove populações de *Fusarium decemcellulare*

O dendrograma com os 299 isolados de *F. decemcellulare* obtido pelo agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de Dice mostra que os isolados foram agrupados independentes do local de coleta, sintomas ou *mating type* (Figura 7) e (Figura 12, Apêndice B). Resultados diferentes foram obtido por Shanshan e Lin (2011) que utilizando os dados de ISSR obtiveram um dendrograma agrupados pelo método de UPGMA, que indicou uma clara relação entre a distância genética das populações e a distância geográfica em três grupos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*, analisados apesar da alta diversidade encontrada nessas populações. No estudo de Momeni e Nazari (2016) um dendrograma baseado na distância genética de Nei (1978) mostrou as populações de *F. verticillioides* separadas em cinco grupos distintos com base na origem geográfica.

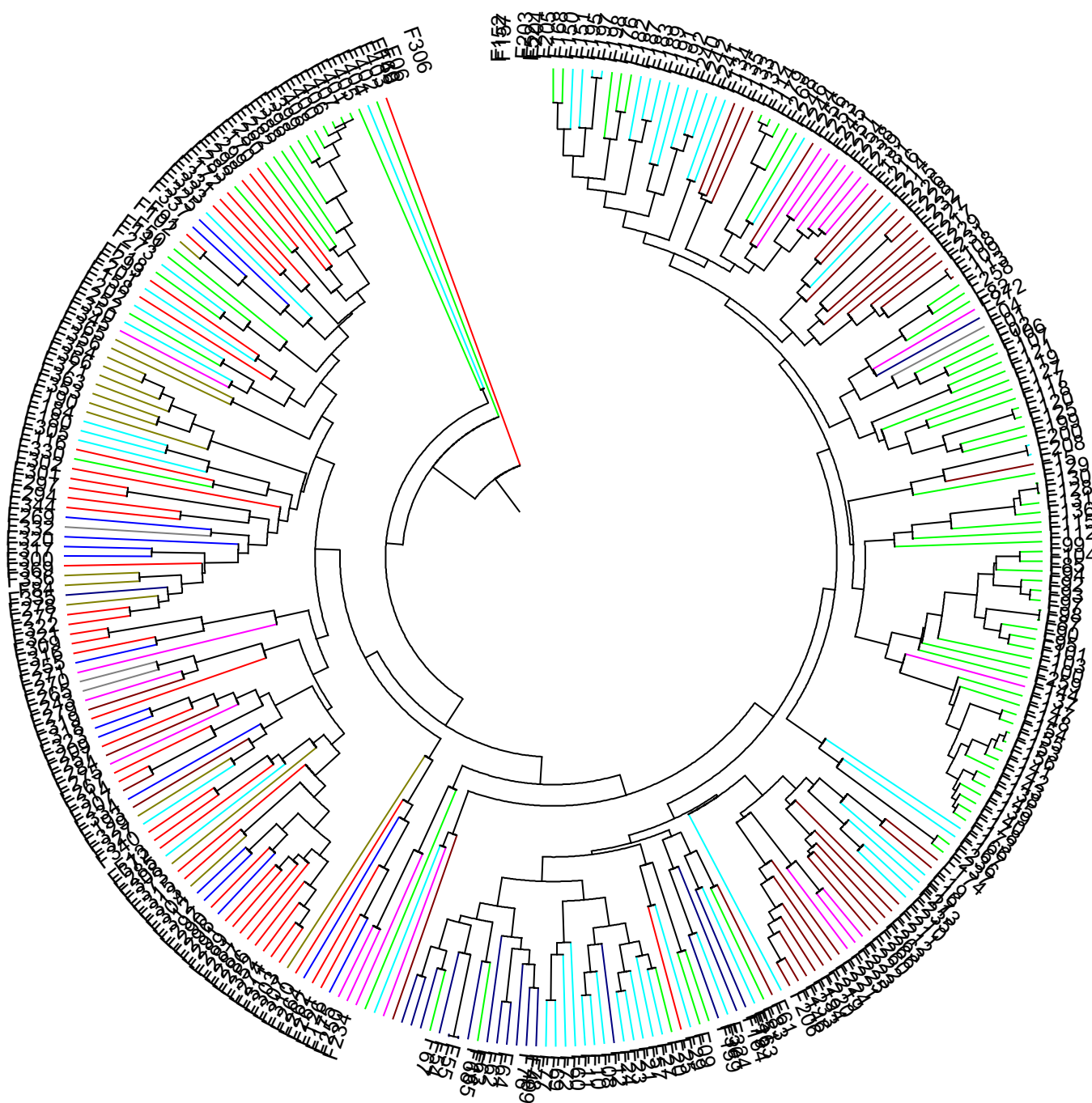


Figura 7 – Dendrograma obtido pelo agrupamento UPGMA de 299 isolados de *Fusarium decemcellulare* pelo coeficiente de Dice. ■ Boa Vista do Ramos; ■ Presidente Figueiredo; ■ Itacoatiara; ■ Itapiranga; ■ Manaus; ■ Maués; ■ Rio Preto da Eva; ■ São Sebastião de Uatumã e ■ Uruará

A alta diversidade encontrada para *F. decemcellulare*, pode ser explicado devido à forma de reprodução, possivelmente mista, visto que esta espécie pode reproduzir-se de forma sexuada/fluxo gênico o que permite recombinação genética aumentando a diversidade como de forma

assexuada/fluxo genotípico. Essas diferentes formas de reprodução contribuem para o sucesso evolutivo do patógeno aumentando capacidade de mutação e seleção de genes de virulência para a quebra da resistência do hospedeiro (Blakeslee, 1904; Duarte et al., 1999; Leslie e Summerel, 2006).

Os resultados verificados através do dendrograma obtido pelo agrupamento UPGMA sugerem que outro fator tem atuado para a formação dos agrupamentos e possível estruturação da população do patógeno em guaranazeiro. Os dados obtidos neste trabalho combinado com a análise da diversidade e filogenia indicam que os grupos formados, possivelmente estão relacionados com a formação de pelo menos duas diferentes espécies do patógeno (item 5.5).

5.3 - Estrutura da população de *F. decemcellulare* isolado de guaranazeiro

As relações genéticas entre os isolados das nove populações utilizando a análise bayesiana implementada pelo programa STRUCTURE, foi $K=2$, demonstrando que os 299 isolados de *F. decemcellulare* estão estruturados em duas populações distintas representadas pelas cores vermelho e verde (Figura 8 e 9), onde o primeiro grupo em vermelho foi formado por 166 isolados distribuídos em 33 de Boa Vista do Ramos, 16 de Itacoatiara, 68 de Manaus, 36 de Maués, e 13 de Presidente Figueiredo, já o segundo grupo em verde foi formado por 100 isolados sendo quatro de Boa vista do Ramos, quatro de Itacoatiara, 14 de Manaus, quatro de Maués, três de Itapiranga, 14 de Rio Preto da Eva, 14 de São Sebastião de Uatumã e 43 de Urucará. Os isolados que tiveram fidelidades estimadas menores que 80% foram atribuídas a um grupo *admixture*, totalizando 33 isolados, sendo um de Itapiranga, oito de Manaus, 12 de Maués, seis de Presidente Figueiredo, três de Rio Preto da Eva, um de São Sebastião de Uatumã e dois de Urucará (Pritchard et al., 2000). É possível observar que a população do município de Urucará é a única que está presente exclusivamente no grupo *admixture*

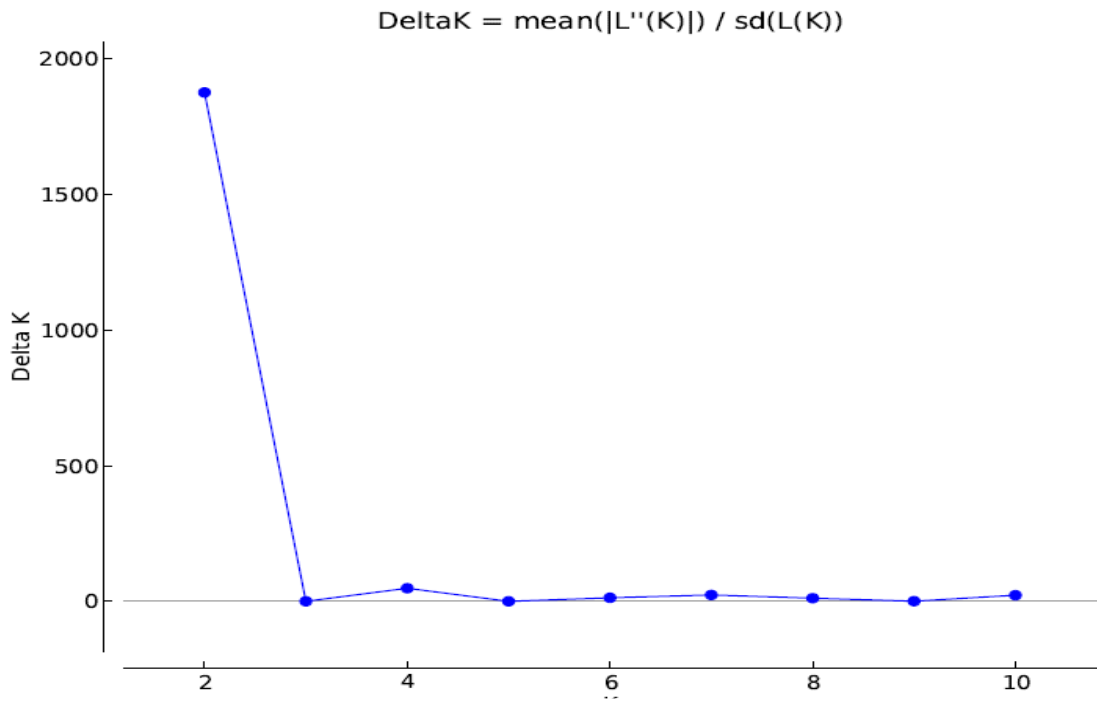


Figura 8 - Número de (K) que melhor explica a estrutura das nove populações de *Fusarium decemcellulare*

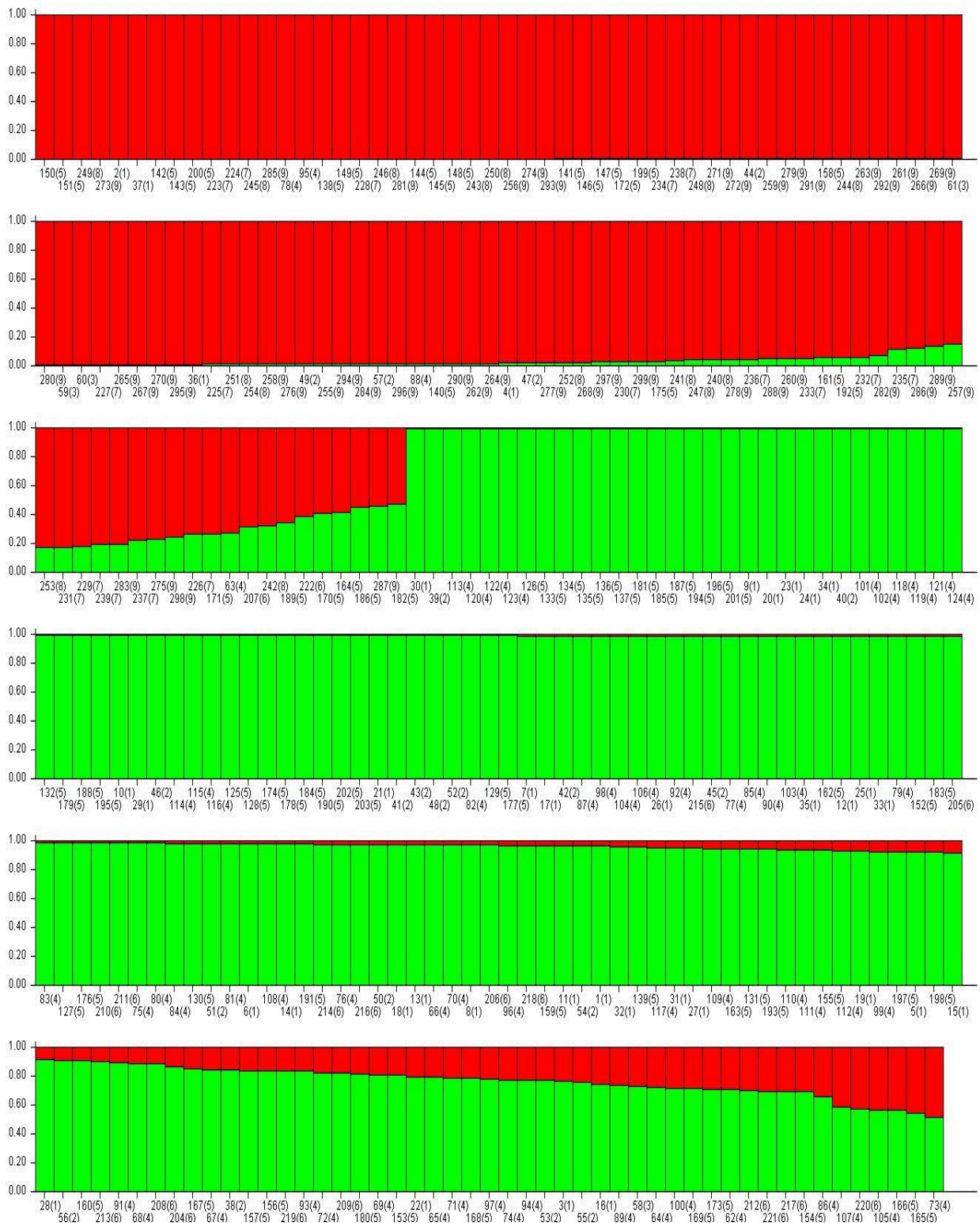


Figura 9 – Análise de agrupamento $k=2$ para *Fusarium decemcellulare* isolado de guaranzeiro no estado do Amazonas obtido a partir de 299 isolados, as cores verde e vermelha correspondem a cada grupo inferido

Os dados obtidos por meio da análise de PCoA (Figura 10) mostram o agrupamento dos indivíduos independente de sua origem amostral.

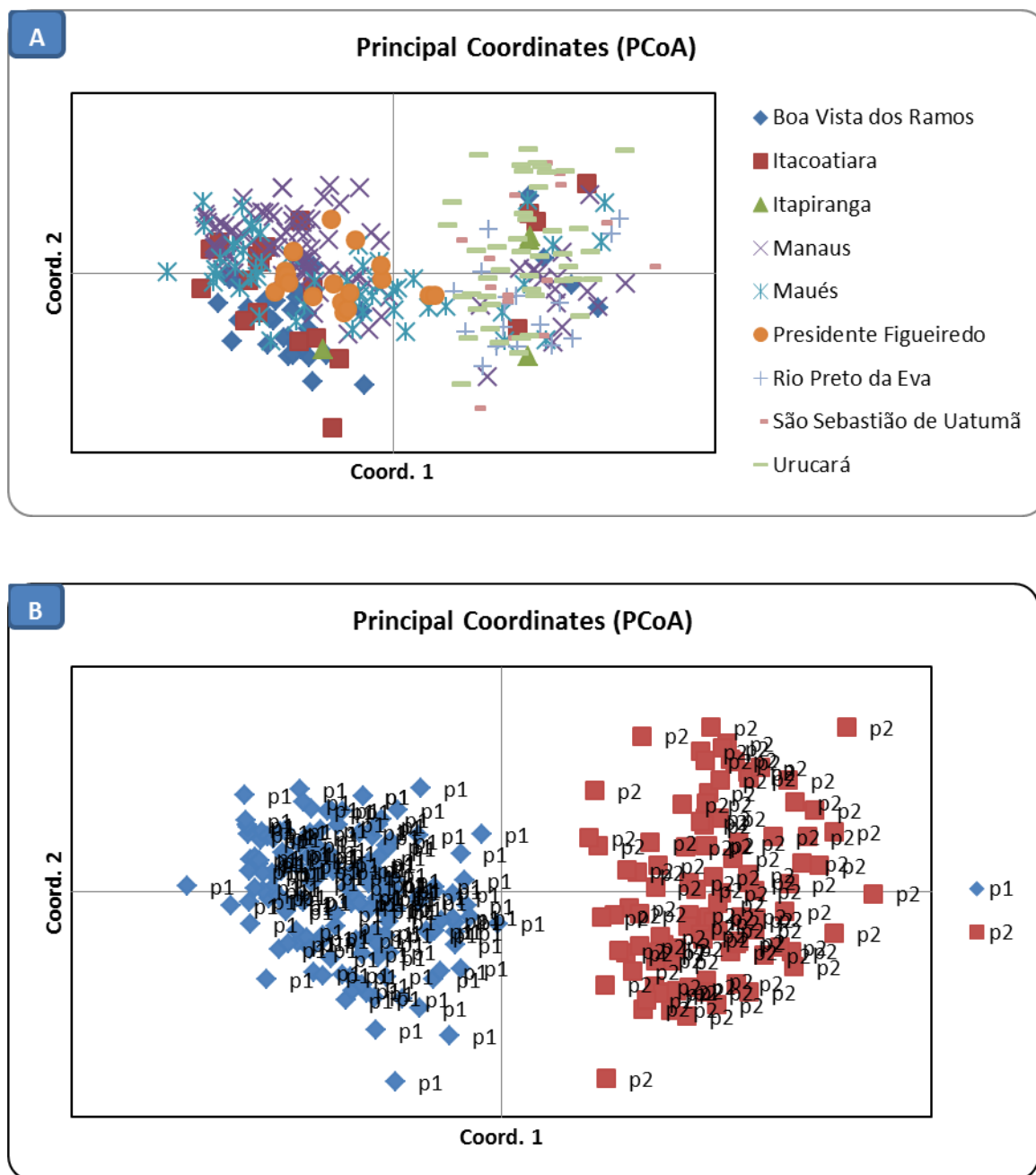


Figura 10 - Análise de coordenadas principais (PCoA). **A**- Representação gráfica dos 299 isolados de nove populações de *Fusarium decemcellulare* coletados em guaranazeiros do Estado do Amazonas; **B**- os grupos identificados por STRUCTURE em azul a população um e em vermelho a população dois

A análise de variância molecular (AMOVA) revelou alta variabilidade genética dentro das populações de *F. decemcellulare* (83%) para o conjunto das populações e diferenciação genética significativa ($P < 0.01$) nas duas análises (Tabela 6).

Tabela 6 – Sumário da AMOVA expondo a distribuição de variação dentro e entre as nove populações de *Fusarium decemcellulare*

Fonte de variação	d.f.	SSD	MSD	Est. Var.	Variation (%)	PhiPT	P-value
Entre as populações	8	1417.761	157.529	4.711	17%		
Dentro das populações	298	6710.493	23.220	23.220	83%	0,169	P <0.001
Total	297	8128.254		27.931	100%		

d.f.= Graus de liberdade; **SS**=soma das observações ao quadrado;
MS= média de observações ao quadrado;
Est. var.= variância estimada; %
Var.= percentual da variância total;
PhiPT= proporção da variância genética total entre indivíduos dentro das populações.
P-value estimativas são baseadas em 999 permutações;

O maior número de bandas polimórficas e as bandas mais frequentes respectivamente foram de 164 e 159 na população um e dois. Na primeira população, foi observado sete bandas exclusivas desse grupo, enquanto que na segunda população foram observadas apenas duas (Tabela 7).

Tabela 7- Padrões totais de bandas para dados binários (diplóide) dos grupos identificados por STRUCTURE para população de *Fusarium decemcellulare*

População	Pop1	Pop2
Nº Bandas	164	159
Nº Bandas Freq. >= 5%	147	155
Nº Bandas Privadas	7	2
Nº Bandas L Comum (<=25%)	0	0
Nº Bandas L Comum (<=50%)	0	0
Média H	0.268	0.301
Média do desvio padrão H	0.012	0.013
Média Uh	0.269	0.304
Média do desvio padrão uh	0.013	0.013

*Nº Bandas = Nº de Bandas Diferentes

*Nº. Bandas Freq. >= 5% = N.º de Bandas Diferentes com Frequência >= 5%

*Nº Bandas privadas = Número de bandas exclusivas para uma única população

*Nº. Bandas L Comum (<= 25%) = Nº de Bandas Locais Comuns (Freq.>= 5%) Encontradas em 25% ou Menos Populações

*Nº. Bandas L Comum (<= 50%) = Nº de Faixas Locais Comuns (Freq.>= 5%) Encontradas em 50% ou Menos Populações

*H = Heterozigiosidade Esperada = $2 * p * q$

*uH = Unbiased Expected Heterozygosity = $(2N / (2N-1)) * H$

* Onde para Diploid Dados binários e assumindo Hardy-Weinberg Equilibrium, $q = (1 - \text{Band Freq.})^{0.5}$ and $p = 1 - q$.

Assim como no dendrograma gerado pelo método UPGMA e programa Structure, os dados obtidos por meio da análise de PCoA indicaram que os indivíduos estão agrupados independente da origem das amostras. Resultado semelhante foi relatado nos trabalhos de Leong et al., (2009), onde realizando a caracterização molecular de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* não foi encontrado nenhuma correlação entre o perfil genético dos isolados em relação ao hospedeiro ou localidade. Maior diversidade genética dentro da população em relação à diversidade entre populações foi observada em outras espécies de *Fusarium* como *Fusarium poae* isolado da Argentina e Inglaterra (Dinolfo et al., 2010) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Bayraktar et al., 2008). Em *F. oxysporum* coletado a partir de espécies hospedeiras diferentes, a variabilidade genética de isolados coletados do mesmo hospedeiro foi maior (67,4%) quando comparada entre hospedeiros diferentes (32,4%) (Klassen et al., 2007).

5.4 – Seleção de haplótipos EF-1 α

Dos 299 isolados monospóricos de nove locais de coleta no estado do Amazonas. A sequência parcial do fator de alongação 1 alfa (EF-1 α) foram obtidos com sucesso para 288 isolados e identificados 19 haplótipos, dentro de cada haplótipos foram identificados isolados de diferentes locais de coleta, sintomas e *mating type* (Tabela 9, Apêndice A).

5.5 - Análise filogenética de *F. decemcellulare* obtido de guaranazeiro

Com base nos haplótipos identificados foram selecionados 34 isolados para a análise filogenética utilizando o sequenciamento parcial das regiões *rpb1*, *rpb2* e ITS+LSU rDNA (Tabela 8). A análise combinada das sequências das quatro regiões agrupou os 34 isolados de *F. decemcellulare* em três diferentes clusters. Embora o suporte entre os grupos formados apresente baixa resolução, provavelmente isso se deve ao número de regiões utilizadas, estes dados podem ser um indicativo da ocorrência de três possíveis espécies de *F. decemcellulare* em guaranazeiro.

Análise comparativa dos dados filogenéticos com as 167 bandas do marcador multilocus ISSR a partir da genotipagem dos 34 isolados com base no coeficiente de Dice, também indicam a ocorrência de três clusters com 54% de similaridade (Figura 11). Embora o marcador ISSR não tenha sido capaz de gerar a mesma distribuição da análise filogenética dos 34 isolados. Da mesma forma que a análise filogenética com as quatro regiões sequenciadas, o marcador ISSR não agrupou os isolados por sintomas, locais de coleta.

Tabela 8 - Relação dos isolados de *Fusarium decemcellulare* separados em cluster de acordo com o filograma obtido com base na análise combinada de *ef-1 α* , *rpb1*, *rpb2* e ITS+LSU rDNA

	ISOLADO	HAPLÓTIPO	LOCAL DE COLETA	SINTOMAS
Cluster 1	F356	Fd-14	RIO PRETO DA EVA	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA
	F132	Fd-14	MANAUS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA
	F167	Fd-17	MANAUS	GALHA
	F168	Fd-16	MANAUS	GALHA
	F234	Fd-03	BOA VISTA DO RAMOS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA
	F244	Fd-16	ITACOATIARA	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA
	F261	Fd-04	ITACOATIARA	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA
	F266	Fd-05	ITACOATIARA	GALHA
	F274	Fd-15	URUCARÁ	HIPERTROFIA FLORAL
	F298	Fd-12	URUCARÁ	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA
	F308	Fd-03	URUCARÁ	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA
	F333	Fd-04	SÃO SEBASTIÃO DO UATUMÃ	HIPERTROFIA FLORAL
	F117	Fd-18	MANAUS	GALHA
Cluster 2	F278	Fd-06	URUCARÁ	HIPERTROFIA FLORAL
	F281	Fd-06	URUCARÁ	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA
	F193	Fd-13	MAUÉS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA
	F187	Fd-11	MAUÉS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA
	F189	Fd-11	MAUÉS	HIPERTROFIA FLORAL
	F280	Fd-07	URUCARÁ	HIPERTROFIA FLORAL
	F334	Fd-07	RIO PRETO DA EVA	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA
	F299	Fd-18	URUCARÁ	HIPERTROFIA FLORAL
	F02	Fd-19	MANAUS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA
	F10	Fd-18	MAUÉS	HIPERTROFIA FLORAL
	F155	Fd-15	MANAUS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA
	F191	Fd-08	MAUÉS	HIPERTROFIA FLORAL
	F256	Fd-02	ITACOATIARA	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA
	F331	Fd-19	SÃO SEBASTIÃO DO UATUMÃ	HIPERTROFIA FLORAL
	F48	Fd-10	MAUÉS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA
Cluster 3	F08	Fd-01	MAUÉS	HIPERTROFIA FLORAL
	F173	Fd-01	MAUÉS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA
	F182	Fd-02	MAUÉS	
	F194	Fd-09	MAUÉS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA
	F264	Fd-10	ITACOATIARA	HIPERTROFIA FLORAL
	F269	Fd-13	ITAPIRANGA	HIPERTROFIA FLORAL

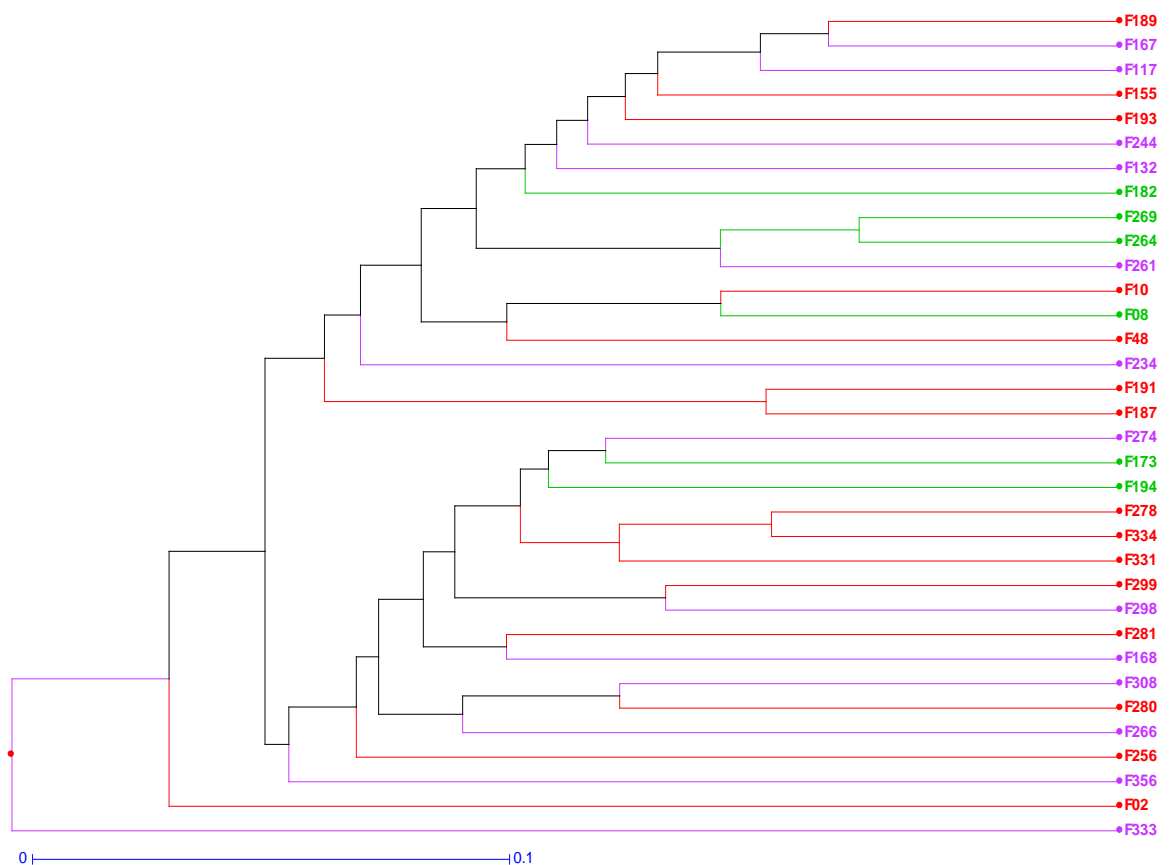


Figura 11- Dendrograma obtido pelo agrupamento UPGMA dos 34 isolados de *Fusarium decemcellulare* pelo coeficiente de Dice. Os três cluster identificados por cor, cluster 1 na cor lilás, cluster 2 na cor vermelha e na cor verde o cluster 3

O agrupamento independente do sintoma ou local de coleta é um indicativo que as três possíveis espécies têm ocorrência nas diferentes regiões produtoras e não existe especialização fisiológica para o desenvolvimento de sintomas específicos, ou seja, todos os isolados tem a mesma habilidade em causar os diferentes sintomas dependendo do tecido no qual a infecção e colonização ocorra.

A ocorrência de um complexo de espécies em *F. decemcellulare* já havia sido descrita por Guimarães (2013) com base em sequências parciais dos genes *tef-1a*, *rpb2*, *ac11* e da região ITS-LSU, utilizando isolados de *F. decemcellulare* de diferentes hospedeiros como cacaueteiro, mangueira, pimenta-do-reino, espatódea e guaranazeiro.

Diferente dos dados mostrados em guaranazeiro neste trabalho, Guimarães (2013) obteve duas possíveis espécies filogenética com base no *mating type*, onde isolados heterotáticos e possivelmente patogênicos, formam uma espécie distinta dos homotáticos ditos não patogênicos.

Trabalhos da década de 60 e 70, com base nos caracteres morfológicos da fase sexuada já indicavam uma diferença no número de ascósporos entre homotáticos (quatro ascósporos por asco) dos heterotáticos (oito ascósporos por asco), embora ambos sejam morfológicamente semelhantes na fase assexuada, onde por meio dos caracteres usualmente utilizados para diferenciá-los como a análise de macro e microconídios (Wollenweber e Reinking, 1935; Alexander e Carmichael, 1973; Guimarães 2013).

Os resultados aqui obtidos indicam que na população de *F. decemcellulare* de guaranazeiro o marcador foi eficaz em detectar a variabilidade, mas não foi capaz de separar espécies muito próximas que provavelmente ainda compartilham grande número de alelos. Esse resultado difere do encontrado por Dariva, J. et al., (2015) que utilizando nove primers de ISSR em 37 isolados de *Fusarium solani* e 13 isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* verificou-se a alta variabilidade genética intraespecífica, além de auxiliar na classificação morfológica das espécies. No estudo de Bayraktar e Dolar (2011) ao analisarem a diversidade genética de 70 isolados de *Fusarium* spp., utilizando primers ISSR obtiveram sete grupos distintos de isolados compostos por *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. proliferum*, *F. redolens*, *F. acuminatum*, *F. culmorum* e *F. solani*. O que nos leva a crê que as putativas espécies de *F. decemcellulare* identificadas em guaranazeiro por meio da filogenia, caso confirmadas, ainda são espécies muito próximas que possivelmente tem pouco tempo de divergência e este poderia ser um dos motivos pelo qual o ISSR não foi capaz de agrupar os isolados conforme os dados observados pela filogenia. É preciso considerar também que em termos epidemiológicos *F. decemcellulare* foi identificado pela primeira vez em guaranazeiro em 1980 por Batista e Bolkan indicando pouco tempo de distribuição e divergência da população.

6- CONCLUSÃO

Isolados de *F. decemcellulare* obtidos de guaranazeiro das diferentes regiões produtoras do estado do Amazonas estão estruturados em duas populações sem nenhuma correlação entre local de coleta ou sintomas.

População de *F. decemcellulare* apresenta alta diversidade genética, e maior variação é encontrada dentro das populações do que entre populações de *F. decemcellulare* isolado de guaranazeiro.

Em guaranazeiro, foi detectado a ocorrência de um complexo de espécies em *F. decemcellulare*, formado possivelmente por três diferentes espécies.

7- RECOMENDAÇÕES E PERSPECTIVAS

Análises filogenéticas com maior número de regiões são necessárias para confirmar o número de diferentes espécies de *F. decemcellulare* em guaranazeiro;

Testes de patogenicidade são necessários para verificar a virulência entre as diferentes espécies;

Cultivares resistentes de guaranazeiros deve ser testadas com base nos diferentes grupos de isolados obtidos por meio do marcador ISSR a fim de verificar o potencial dessas linhagens na quebra de resistência em guaranazeiro.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIS, J.; FONSECA, O. J. M.; STRASSEN, R. Z. A thrips as vector of the “supersprouting” fungus disease in guarana plants of the Central Amazon. **Fitopatologia Brasileira**, 1985, v. 10(3), 677-679.

AGAPOW, PAUL-MICHAEL, AND AUSTIN BURT. Indices of multilocus linkage disequilibrium. **Mol. Ecol. Notes**, 2001, v.1(1-2), 101-102.

ALEXANDER, J. V., AND R. J. COOK. *Fusarium* species and Calonectria associated with cushion gall of Cacao in Central America. *Cacao*, 1965, v10: 15-16.

ALEXANDER, J. V., AND N. M. CARMICHAEL. "Divergent patterns of ascus development in homothallic and heterothallic isolates of *Calonectria rigidiuscula*." *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 1973: 35-40.

ALMEIDA, LÍGIA A., AND RICARDO ARAUJO. "Highlights on molecular identification of closely related species." *Infection, Genetics and Evolution*, 2013, v13, 67-75.

ARAÚJO, J. C. A.; PEREIRA, J. C. R.; GASPAROTTO, L.; ARRUDA, M. R. 2006. O complexo superbrotamento do guaranazeiro e seu controle. Disponível em: <http://servicos.cpa.embrapa.br/livraria/arquivos_gratis/ComTec_45_2006.pdf>. Acesso em: 22/03/2015.

BARNETT, HORACE LESLIE, AND BARRY B. HUNTER. Illustrated genera of imperfect fungi. *American Phytopathological Society (APS Press)*, 1998, No. Ed. 4.

BARTH, S.; MELCHINGER, A. E.; LÜBBERSTEDT, T. Genetic diversity in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. investigated by cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology*, 2002, v11, 495-505.

BASTOS, C. N.; SANTOS, A. O. Superbrotamento de inflorescências do Limão-de-Caiena causado por *Fusarium decemcellulare*. *Fitopatologia Brasileira*, 2001, v26(2): 222.

BATISTA, M. F.; BOLKAN, H. A. 1980. O superbrotamento do guaranazeiro. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/667295>>. Acesso em: 20/06/2015.

BATISTA, M. F.; BOLKAN, H. A. O superbrotamento do guaranazeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 1982, v7, p. 315-317.

BENTLEY, S., PEGG, K. G., & DALE, J. L. Genetic variation among a world-wide collection of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* analysed by RAPD-PCR fingerprinting. *Mycological Research*, 1995, v99(11), p. 1378-1384.

BOOTH, COLIN. The genus *Fusarium*. kew: Commonwealth Micological Institute, 1971.

BOURRET, J. A., AND E. J. FORD. Distribution of *Calonectria rigidiuscula* and other *Fusarium* species in relation to cushion gall of cacao. *Cacao*, 1965, v10: 13-15.

BLAKESLEE, ALBERT FRANCIS. Sexual reproduction in the Mucorineae. *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences*, 1904, v40(4): 205-319.

BROWN, A. H. D. "Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation." *Theoretical and Applied Genetics*, 1978, v2(4): 145-157.

BRUNT, A. A. F., AND A. L. WHARTON. Etiology of a gall disease of cocoa in Ghana caused by *Calonectria rigidiuscula* (Berk. & Br.) Sacc. *Ann. Appl. Biol*, 1962, v50, p. 283-289.

CAMPOS, M.P.O. et .al. Guaraná (*Paullinia cupana*) improves fatigue in breast cancer patients undergoing systemic chemotherapy. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 2011, v17(6): 505-512.

CAPOTE, N.; PASTRANA, A. M.; AGUADO, A.; SANCHEZ-TORRES, P. Molecular tools for detection of plant pathogenic fungi and fungicide resistance. In: Cumagun, C. J. (Ed.). *Plant pathology*. Rijeka: InTech, Croatia. 2012, 151–202.

CARLOS, R. S. C; NASCENTE, A. S; FERREIRA, M. D. G; NUNES, A. M. L. 2005. Culrivo do Guaranazeiro em Rondônia. Disponível em <

<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Guarana/CultivodoGuaranazeiroRO>>. Acesso em 03/03/2015.

CLAY, KEITH, AND PAULA X. KOVER. The Red Queen Hypothesis and plant/pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 1996, v. 34(1), p. 29-50.

CONAB. 2014. Guaraná – Período: 01 a 31/08/2014. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_09_09_17_32_05_guarana_agosto_2014.pdf>. Acesso em: 10/01/2015.

CORNUET, J. M. AND LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 1997, v144: 2001-2014.

CORRÊA, MARIA PINHEIRO FERNANDES. Caracteres quantitativos e qualitativos para descrição morfológica do guaraná (*Paullinia cupana var. sorbilis* (Mart.) Ducke). 1989. 186p. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Fundação Universidade do Amazonas. Manaus, Amazonas.

CROWDY, S. H. Observations on the pathogenicity of *Calonectria rigidiuscula* (Berk. & Br.) Sacc. on *Theobroma cacao* L. *Ann. Appl. Biology*. 1947, v34: 45-59.

COSTA, R. S. D. C.; NASCENTE, A. S.; FERREIRA, M. D. G. R.; A. M. L. 2005 Cultivo do Guaranazeiro em Rondônia Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Guarana/CultivodoGuaranazeiroRO/index.htm>> Acessado em 18/12/2014.

DAREN W. BROWN, AND ROBERT H. PROCTOR. eds. *Fusarium: genomics, molecular and cellular biology*. Horizon Scientific Press, 2013.

DARIVA, J. et al. Genetic Variability Of *Fusarium solani* And *Fusarium oxysporum* f. sp. *Passiflorae* Isolated Associated With Passion Fruit. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 2015, v37(2), 377-386.

DINOLFO, M. I. et al. ISSR markers detect high genetic variation among *Fusarium poae* isolates from Argentina and England. *European Journal of Plant Pathology*, 2010, v127(4), 483-491.

DOYLE, J. J. AND DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 1990, v12: 13-15.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. *Compendium of soil fungi*. New York: Academic Press, 1980, 859p.

DUARTE, M. L. R.; ALBUQUERQUE, F. C.; CORRÊA, M. P. F.; BATISTA, M. F. Doenças da cultura do guaraná no trópico úmido. 1999, p. 109-113.

EBDA (2015) www.ebda.ba.gov.br Acessado em 01/10/2015.

EVANNO, G., S, REGNAUT, AND J. GOUDET. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Mol. Ecol.* 2005, v14: 2611–2620.

EXCOFFIER, L., LAVAL, G. E SCHNEIDER, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* 1, 47-50.

FALUSH, D., STEPHENS, M. E PRITCHARD, J. K. Inference of population structure: Extensions to linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 2003, v164: 1567-1587.

FARR, D.F. AND ROSSMAN, A.Y. *Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA*. Retrieved January 9, 2016, from [/http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases](http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases).

FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 1985, v39: 783-791.

FLOR, H.H. The complementary genic systems in flax and flax rusts. *Advance Genetic*, New York, 1956, v8, p. 29-54.

FORD, E. J.; BOURRET, J. A.; SNYDER, W. C. Biologic specialization in *Calonectria Fusarium rigidiuscula* in relation to green point gall of Cocoa. *Phytopathology*, 1967, v57(7), 710-712.

GAWEHNS, FLEUR, BEN JC CORNELISSEN, AND FRANK LW TAKKEN. "The potential of effector-target genes in breeding for plant innate immunity." *Microbial biotechnology*, 2013, v6(3), 223-229.

GERLACH, W.; NIRENBERG, H. 1982. *The Genus Fusarium – A Pictorial Atlas*. Disponível em:< <http://www.bba.de/veroeff/mitt/pdfs/mitt209.pdf>>. Acesso em: 22/03/2015.

GOUDET, J. FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.*, 1995, v86, 485-486.

GRIGOLETTI, J.A.; AUER, C.G. Podridão de raízes em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) causada por *Fusarium* sp. *Fitopatologia Brasileira*, 2001, v. 26, p.572.

GRÜNWARD, N. J., GOODWIN, S. B., MILGROOM, M. G., E FRY, W. E.. Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. *Phytopathology*, 2003, v93: 738-746.

GUILLOT, GILLES, FRÉDÉRIC MORTIER, AND ARNAUD ESTOUP. "GENELAND" a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes*, 2005, v5(3): 712-715.

GUILLOT, G. Inference of structure in subdivided populations at low levels of genetic differentiation – the correlated allele frequencies model revisited. *Bioinformatics*, 2008, v24: 2222-2228.

GUIMARÃES, E. A. *Biologia reprodutiva, filogenia e patogenicidade de Fusarium decemcellulare*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras. Lavras, Minas Gerais. 2013, 68p.

HALL, P., ORRELL, L.C. & BAWA, K.S. Genetic diversity and mating system in a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). *Am. J. Bot.* 1994, v81: 1104-1111.

HAMMOND-KOSACK, KIM, et al. "Plant pathogens: how can molecular genetic information on plant pathogens assist in breeding disease resistant crops." *Proceedings of the 4th International Crop Science Congress*. 2004.

HINZ, R. H., SILVA, C. M., PEREIRA, A., & TCACENCO, F. A. (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.

JOMBART, T. 2008. Adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24: 1403-1405.

JOMBART, T., DEVILLARD, S. AND BALLOUX, F. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genet*, 2010, v11: 94.

JUNIOR, M.L. Manejo cultural e biológico de doenças causadas por patógenos habitantes do solo, na cultura do feijoeiro comum. EMBRAPA Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, Brasil. Suplemento BH, 2008.

JUNQUEIRA, N. T. V.; SANTIAGO, D. V. R.; PINTO, A. C. Q.; CHAVES, R. C. 2001. Principais doenças da fruteira-do-conde no cerrado. Disponível em:< www.cpac.embrapa.br/download/4/t>. Acesso em: 29/03/2015.

KALINOWSKI, S. T. HP-Rare: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic diversity. *Mol. Ecol. Notes*, 2005, v5: 187-189.

KELLER SM, MCDERMOTT JM, PETTWAY RE, WOLFE MS, MCDONALD BA Gene flow and sexual reproduction in the wheat glume blotch pathogen *Phaeosphaeria nodorum* (anamorph *Stagonosporanodorum*). *Phytopathol*, 1997, v87: 353-358.

KLASSEN, J., YU, C. H. E. N., LANGE, R., & FERNANDO, W. D. Genetic variation in *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* strains causing fusarium-wilt of canola in Western Canada, 2007.

KUMAR S., STECHER G., AND TAMURA K. (2015). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* (submitted)

LANGELLA, O. 2002. Populations 1.2.32. Logiciel de génétique des populations. Available from Internet: <http://www.bioinformatics.org/~tryphon/populations>.

LESLIE, J. F. Fungal vegetative compatibility. *Annual Review of Phytopathology* 1993, v31: 127-150.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. *The Fusarium laboratory manual*. Malden: Blackwell, 2006. 160p.

LEBOLDUS, JARED M., et al. "Genotype-by-sequencing of the plant-pathogenic fungi *Pyrenophora teres* and *Sphaerulina musiva* utilizing Ion Torrent sequence technology." *Molecular plant pathology*, 2015.

LEONG, S. K., LATIFFAH, Z., & BAHARUDDIN, S. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* F. sp. *Cubense* of banana. *American Journal of Applied Sciences*, 2009, v6(7): 1301-1307.

LOMBARD, L.; BOGALE, M.; MONTENEGRO, F.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. A new bark canker disease of the tropical hardwood tree *Cedrelinga cateniformis* in Ecuador. *Fungal Diversity*, 2008.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalised regression approach. *Cancer Research*, 1967, v27: 209-220.

MCDONALD, BRUCE A., AND CELESTE LINDE. "Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance." *Annual Review of Phytopathology*, 2002, v40(1): 349-379.

MENDES, M. A. S.; URBEN, A. F. *Fungos relatados em plantas no Brasil*, Laboratório de Quarentena Vegetal. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2014. Disponível em: <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/fgbanco01.asp> Acesso em: 01/01/2015.

MOMENI H, NAZARI F. Population Genetic Structure among Iranian Isolates of *Fusarium verticillioides*. *J Plant Pathol Microbiol*, 2016, v7: 355.

Moncrief, I. et al. Specific discrimination of *Fusarium proliferatum* using inter-simple sequence repeats (ISSRs) and simple sequence repeats (SSRs). In APS Joint Meeting (Austin, TX, USA), 2013.

MOUND, L.A., WHEELER, G.S., AND WILLIAMS, D.A. Resolving Cryptic Species with Morphology and DNA; thrips as a Potential Biocontrol Agent of Brazilian peppertree, with a New Species and Overview of *Pseudophilothrips* (Thysanoptera). *Zootaxa*, 2010, v2432: 59-68.

NALIM, F.A., SAMUELS, G.J., WIJESUNDERA, R.L., GEISER, D.M. Biogeography of the *fusarium solani* species complex: sampling in the southern hemisphere. *Mycological Society of America. Inoculum*, 2003.v54, p.37.

NASON, J.D., PRESTON, A.R. & HAMRICK, J.L. Dispersal and dynamics of genetic structure in fragmented tropical tree populations. In *Tropical forest remnants; ecology, management, and conservation of fragmented communities* (W.F. Laurence & R.O. Bierregaard, eds). The University of Chicago Press, Chicago, 1997, p.304-320.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 1973, v70: 3321-3323.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 1978, v89: 583–590.

NEI M. AND KUMAR S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York, 2000.

NOUROLLAHI, K.; MADAHJALALI, M. Analysis of population genetic structure of Iranian *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* isolates using microsatellite markers. *Australasian Plant Pathol*, 2016, v46: 35–42.

O'DONNELL, K., KISTLER, H. C., CIGELNIK, E., & PLOETZ, R. C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, v95(5): 2044-2049.

O'DONNELL, K. et al. Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. *Fungal Genetics and Biology*, 2013, v52: 20-31.

PALUMBI SR. Humans as the world's greatest evolutionary force. *Science* 2001, v293: 1786–90.

PLOETZ, R. First Report of *Fusarium decemcellulare* as a Pathogen of Mango in the United States (1996) The American Phytopathological Society. DOI: 10.1094/PD-80-1207C.

Poletto, I. et al. Zoneamento e Identificação de *Fusarium* spp. causadores de podridão de raízes em plantios de erva-mate (*Ilex paraguari*). *Ciência Florestal*, 2006, v16(1): 1-10.

PRITCHARD, J., M. STEPHENS, AND P. DONNELLY. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 2000, v155: 945–959.

PUHALLA, J.E. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Canadian Journal of Botany*, 1981, v63: 179-183.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2013. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

ROCHA, O.J. & LOBO, J.A. Genetic diversity and outcrossing rates in the guanacaste tree (*Enterolobium cyclocarpum* Jacq.) in the dry forests of Costa Rica. In Recent Advances in Biotechnology for Tree Conservation and Management, Proceedings of an IFS Workshop. International Foundation for science (IFS), Stockholm, 1998, p.65-81.

ROSALEE, A., COELHO, N. & DHINGRA, O.D. Grupos de compatibilidade vegetativa entre isolados de *Fusarium oxysporum* não patogênicos ao feijoeiro e de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Fitopatologia Brasileira*, 1999, v24: 546-548.

ROUSSET, F. Genepop'007: a complete reimplementaion of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resources*, 2008, v8: 103-106.

ROHLF, F.J. (2000) NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.2. Exeter Software. Setauket, New York.

SERRATO-DIAZ et al. First Report of *Fusarium decemcellulare* Causing Inflorescence Wilt, Vascular and Flower Necrosis of Rambutan (*Nephelium lappaceum*), Longan (*Dimocarpus longan*) and Mango (*Mangifera indica*). *Plant Disease*, 24 Feb 2015.

SCHULZ, BARBARA, AND CHRISTINE BOYLE. "The endophytic continuum." *Mycological research*, 2005, v109(06): 661-686.

SFALSIN, E. Caracterização morfológica e molecular de *Fusarium decemcellulare*, agente etiológico da galha-floral em cacauzeiro. 2012. 37p (Dissertação de Mestrado), Universidade Federal de Lavras. Lavras, Minas Gerais.

SHANSHAN, L., & LIN, Y. (, December). Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. lini by inter simple sequence repeat (ISSR). In IT in Medicine and Education (ITME), 2011 International Symposium on IEEE, 2011, v2: 672-676.

SNYDER, W. C. Heterothallism and ascospore number in *Calonectria rigidiuscula*. *Phytopathology*: 1964, p.1297-1299.

STODDART, J. A. E TAYLOR, J. F. Genotypic diversity: Estimation and prediction in samples. *Genetics*, 1988, v118: 705-711.

THOMAS, D. L., AND W. C. SNYDER. Relationships among clones of *Calonectria* (*Fusarium*) *rigidiuscula* isolated from gall diseases of *Theobroma cacao*. *Phytopathology* 1970, p60: 1542.

URBEN, A. F. ET AL. Curso de Taxonomia de *Fusarium*, Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2009.

WEIR, B. S. E COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 1984, v38: 1358-1370.

WOLLENWEBER, H. W., AND O. A. REINKING. *Die Fusarien*. Verlag Paul Parey, Berlin. 1935, p355.

VENTURA, J.A.; ZAMBOLIM, L .; GILBETSON, R.L. Proposição de nova forma especialis em *Fusarium subglutinans* no a bacaxieiro. *Fitopatologia Brasileira*, 1993, v.18. Resumo.

VICENTE, L. P.; DE LA PARTE, E. M.; PÉREZ, T. C. First report in Cuba of Green Point Gall of Cocoa Cushion caused by *Albonectria rigidiuscula* (*Fusarium decemcellulare*). *Fitosanidad*, 2012, v16(1): 19-25.

VIDOTTO, V. Manual de micologia médica. Ribeirão Preto: tecmed, 2004
<http://www.seagri.ba.gov.br/noticias/2014/12/01/bahia-maior-produtor-de-guaran%C3%A1-do-mundo#sthash.BaMB8Mkq.dpuf>. Acesso em 19/01/2015.

VIRDI JS, GULATI P, PAI M. Diversidade genética de microrganismos patogênicos e sua médica e pública importância para a saúde. J Med indiano Microbiol 2007, v25: 2-3.

YEH, F. C.; YANG, R.; BOYLE, T. POPGENE version 1.31: Microsoft Window-based freeware for population genetics analysis. University of Alberta, Edmonton, Canada, 1999.

YUAN, L.; MI, N.; LIU, S.; ZHANG, H.; LI, Z. 2013. Genetic diversity and structure of the *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* populations on linseed (*Linum usitatissimum*) in China. Phytoparasitica. 41: 391–401.

ZIPCODEZOO (2016) <http://zipcodezoo.com/index.php/Fusarium>. visto em 06/01/2016.

APÊNDICE A - Relação dos isolados de *F. decemcellulare*

Tabela 9 - Relação dos isolados de *Fusarium Decemcellulare* com sintomas e locais de coleta

ISOLADOS	EF3	HAPLOTIPOS	LOCAL DE COLETA	SINTOMAS
F227	X	Fd-10	Boa Vista do Ramos	Galha
F207	X	Fd-19	Boa Vista do Ramos	Galha
F221	X	Fd-13	Boa Vista do Ramos	Galha
F232	X	Fd-18	Boa Vista do Ramos	Galha
F242	X	Fd-19	Boa Vista do Ramos	Galha
F224			Boa Vista do Ramos	Galha
F234	X	Fd-3	Boa Vista do Ramos	Hiperplasia da gema vegetativa
F236	X	Fd-3	Boa Vista do Ramos	Hiperplasia da gema vegetativa
F238	X	Fd-13	Boa Vista do Ramos	Hiperplasia da gema vegetativa
F239	X	Fd-13	Boa Vista do Ramos	Hiperplasia da gema vegetativa
F213	X	Fd-16	Boa Vista do Ramos	Hiperplasia da gema vegetativa
F217	X	Fd-16	Boa Vista do Ramos	Hiperplasia da gema vegetativa
F235	X	Fd-16	Boa Vista do Ramos	Hiperplasia da gema vegetativa
F214	X	Fd-19	Boa Vista do Ramos	Hiperplasia da gema vegetativa
F219	X	Fd-19	Boa Vista do Ramos	Hiperplasia da gema vegetativa
F237	X	Fd-19	Boa Vista do Ramos	Hiperplasia da gema vegetativa
F240	X	Fd-19	Boa Vista do Ramos	Hiperplasia da gema vegetativa
F241	X	Fd-19	Boa Vista do Ramos	Hiperplasia da gema vegetativa
F243	X	Fd-19	Boa Vista do Ramos	Hiperplasia da gema vegetativa
F267	X	Fd-19	Boa Vista do Ramos	Hiperplasia da gema vegetativa
F212			Boa Vista do Ramos	Hiperplasia da gema vegetativa
F215			Boa Vista do Ramos	Hiperplasia da gema vegetativa
F223			Boa Vista do Ramos	Hiperplasia da gema vegetativa
F268	X	Fd-19	Boa Vista do Ramos	Hipertrofia floral
F233	X	Fd-1	Boa Vista do Ramos	Hipertrofia floral
F208	X	Fd-13	Boa Vista do Ramos	Hipertrofia floral
F209	X	Fd-13	Boa Vista do Ramos	Hipertrofia floral
F220	X	Fd-13	Boa Vista do Ramos	Hipertrofia floral
F222	X	Fd-13	Boa Vista do Ramos	Hipertrofia floral
F225	X	Fd-13	Boa Vista do Ramos	Hipertrofia floral
F226	X	Fd-13	Boa Vista do Ramos	Hipertrofia floral
F231	X	Fd-18	Boa Vista do Ramos	Hipertrofia floral
F210	X	Fd-19	Boa Vista do Ramos	Hipertrofia floral
F211	X	Fd-19	Boa Vista do Ramos	Hipertrofia floral
F228	X	Fd-19	Boa Vista do Ramos	Hipertrofia floral
F229	X	Fd-19	Boa Vista do Ramos	Hipertrofia floral
F216			Boa Vista do Ramos	Hipertrofia floral
F266	X	Fd-5	Itacoatiara	Galha
F253	X	Fd-19	Itacoatiara	Galha
F251	X	Fd-2	Itacoatiara	Galha

F255	X	Fd-13	Itacoatiara	Galha
F250	X	Fd-19	Itacoatiara	Galha
F256	X	Fd-2	Itacoatiara	Hiperplasia da gema vegetativa
F261	X	Fd-4	Itacoatiara	Hiperplasia da gema vegetativa
F252	X	Fd-10	Itacoatiara	Hiperplasia da gema vegetativa
F244	X	Fd-16	Itacoatiara	Hiperplasia da gema vegetativa
F254	X	Fd-16	Itacoatiara	Hiperplasia da gema vegetativa
F264	X	Fd-10	Itacoatiara	Hipertrofia floral
F245	X	Fd-15	Itacoatiara	Hipertrofia floral
F258	X	Fd-15	Itacoatiara	Hipertrofia floral
F246	X	Fd-19	Itacoatiara	Hipertrofia floral
F257	X	Fd-19	Itacoatiara	Hipertrofia floral
F259	X	Fd-19	Itacoatiara	Hipertrofia floral
F260	X	Fd-19	Itacoatiara	Hipertrofia floral
F263	X	Fd-19	Itacoatiara	Hipertrofia floral
F265	X	Fd-19	Itacoatiara	Hipertrofia floral
F262			Itacoatiara	Hipertrofia floral
F269	X	Fd-13	Itapiranga	Hipertrofia floral
F270	X	Fd-19	Itapiranga	Hipertrofia floral
F271	X	Fd-19	Itapiranga	Hipertrofia floral
F272	X	Fd-19	Itapiranga	Hipertrofia floral
F401			Manaus	Caule
F402			Manaus	Caule
F403			Manaus	Caule
F404			Manaus	Caule
F407	X	Fd-19	Manaus	Caule
F408	X	Fd-19	Manaus	Caule
F399	X	Fd-13	Manaus	Folha
F405	X	Fd-19	Manaus	Folha
F97	X	Fd-13	Manaus	Galha
F98	X	Fd-13	Manaus	Galha
F99	X	Fd-13	Manaus	Galha
F168	X	Fd-16	Manaus	Galha
F167	X	Fd-17	Manaus	Galha
F95	X	Fd-18	Manaus	Galha
F117	X	Fd-18	Manaus	Galha
F100	X	Fd-19	Manaus	Galha
F101	X	Fd-19	Manaus	Galha
F102	X	Fd-19	Manaus	Galha
F103	X	Fd-19	Manaus	Galha
F104	X	Fd-19	Manaus	Galha
F106	X	Fd-19	Manaus	Galha
F107	X	Fd-19	Manaus	Galha
F108	X	Fd-19	Manaus	Galha
F109	X	Fd-19	Manaus	Galha
F115	X	Fd-19	Manaus	Galha
F116	X	Fd-19	Manaus	Galha

F118	X	Fd-19	Manaus	Galha
F119	X	Fd-19	Manaus	Galha
F120	X	Fd-19	Manaus	Galha
F121	X	Fd-19	Manaus	Galha
F126	X	Fd-19	Manaus	Galha
F127	X	Fd-19	Manaus	Galha
F128	X	Fd-19	Manaus	Galha
F129	X	Fd-19	Manaus	Galha
F130	X	Fd-19	Manaus	Galha
F131	X	Fd-19	Manaus	Galha
F136	X	Fd-19	Manaus	Galha
F137	X	Fd-19	Manaus	Galha
F138	X	Fd-19	Manaus	Galha
F139	X	Fd-19	Manaus	Galha
F158	X	Fd-19	Manaus	Galha
F159	X	Fd-19	Manaus	Galha
F160	X	Fd-19	Manaus	Galha
F163	X	Fd-19	Manaus	Galha
F165	X	Fd-19	Manaus	Galha
F166	X	Fd-19	Manaus	Galha
F164			Manaus	Galha
F01	X	Fd-13	Manaus	Hiperplasia da gema vegetativa
F132	X	Fd-14	Manaus	Hiperplasia da gema vegetativa
F155	X	Fd-15	Manaus	Hiperplasia da gema vegetativa
F90	X	Fd-18	Manaus	Hiperplasia da gema vegetativa
F91	X	Fd-18	Manaus	Hiperplasia da gema vegetativa
F93	X	Fd-18	Manaus	Hiperplasia da gema vegetativa
F94	X	Fd-18	Manaus	Hiperplasia da gema vegetativa
F02	X	Fd-19	Manaus	Hiperplasia da gema vegetativa
F04	X	Fd-19	Manaus	Hiperplasia da gema vegetativa
F06	X	Fd-19	Manaus	Hiperplasia da gema vegetativa
F15	X	Fd-19	Manaus	Hiperplasia da gema vegetativa
F133	X	Fd-19	Manaus	Hiperplasia da gema vegetativa
F134	X	Fd-19	Manaus	Hiperplasia da gema vegetativa
F135	X	Fd-19	Manaus	Hiperplasia da gema vegetativa
F151	X	Fd-19	Manaus	Hiperplasia da gema vegetativa
F152	X	Fd-19	Manaus	Hiperplasia da gema vegetativa
F153	X	Fd-19	Manaus	Hiperplasia da gema vegetativa
F154	X	Fd-19	Manaus	Hiperplasia da gema vegetativa
F92			Manaus	Hiperplasia da gema vegetativa
F400			Manaus	Hiperplasia da gema vegetativa
F409			Manaus	Hiperplasia da gema vegetativa
F398	X	Fd-19	Manaus	Hiperplasia da gema vegetativa
F406	X	Fd-19	Manaus	Hiperplasia da gema vegetativa
F85	X	Fd-1	Manaus	Hipertrofia floral
F87	X	Fd-1	Manaus	Hipertrofia floral
F140	X	Fd-19	Manaus	Hipertrofia floral

F141	X	Fd-19	Manaus	Hipertrofia floral
F142	X	Fd-19	Manaus	Hipertrofia floral
F143	X	Fd-19	Manaus	Hipertrofia floral
F111	X	Fd-19	Manaus	
F112	X	Fd-19	Manaus	
F113	X	Fd-19	Manaus	
F114	X	Fd-19	Manaus	
F125	X	Fd-19	Manaus	
F144	X	Fd-19	Manaus	
F145	X	Fd-19	Manaus	
F146	X	Fd-19	Manaus	
F147	X	Fd-19	Manaus	
F148	X	Fd-19	Manaus	
F150	X	Fd-19	Manaus	
F156	X	Fd-19	Manaus	
F157	X	Fd-19	Manaus	
F170	X	Fd-19	Manaus	
F29	X	Fd-19	Maués	Galha
F205	X	Fd-13	Maués	Galha
F198	X	Fd-18	Maués	Galha
F206	X	Fd-19	Maués	Galha
F11	X	Fd-1	Maués	Hiperplasia da gema vegetativa
F12	X	Fd-1	Maués	Hiperplasia da gema vegetativa
F13	X	Fd-1	Maués	Hiperplasia da gema vegetativa
F173	X	Fd-1	Maués	Hiperplasia da gema vegetativa
F179	X	Fd-1	Maués	Hiperplasia da gema vegetativa
F194	X	Fd-9	Maués	Hiperplasia da gema vegetativa
F48	X	Fd-10	Maués	Hiperplasia da gema vegetativa
F187	X	Fd-11	Maués	Hiperplasia da gema vegetativa
F193	X	Fd-13	Maués	Hiperplasia da gema vegetativa
F25	X	Fd-14	Maués	Hiperplasia da gema vegetativa
F52	X	Fd-14	Maués	Hiperplasia da gema vegetativa
F20	X	Fd-18	Maués	Hiperplasia da gema vegetativa
F176	X	Fd-18	Maués	Hiperplasia da gema vegetativa
F190	X	Fd-18	Maués	Hiperplasia da gema vegetativa
F197	X	Fd-18	Maués	Hiperplasia da gema vegetativa
F200	X	Fd-18	Maués	Hiperplasia da gema vegetativa
F201	X	Fd-18	Maués	Hiperplasia da gema vegetativa
F202	X	Fd-18	Maués	Hiperplasia da gema vegetativa
F16	X	Fd-19	Maués	Hiperplasia da gema vegetativa
F17	X	Fd-19	Maués	Hiperplasia da gema vegetativa
F18	X	Fd-19	Maués	Hiperplasia da gema vegetativa
F21	X	Fd-19	Maués	Hiperplasia da gema vegetativa
F50	X	Fd-19	Maués	Hiperplasia da gema vegetativa
F51	X	Fd-19	Maués	Hiperplasia da gema vegetativa
F181	X	Fd-19	Maués	Hiperplasia da gema vegetativa
F192	X	Fd-19	Maués	Hiperplasia da gema vegetativa

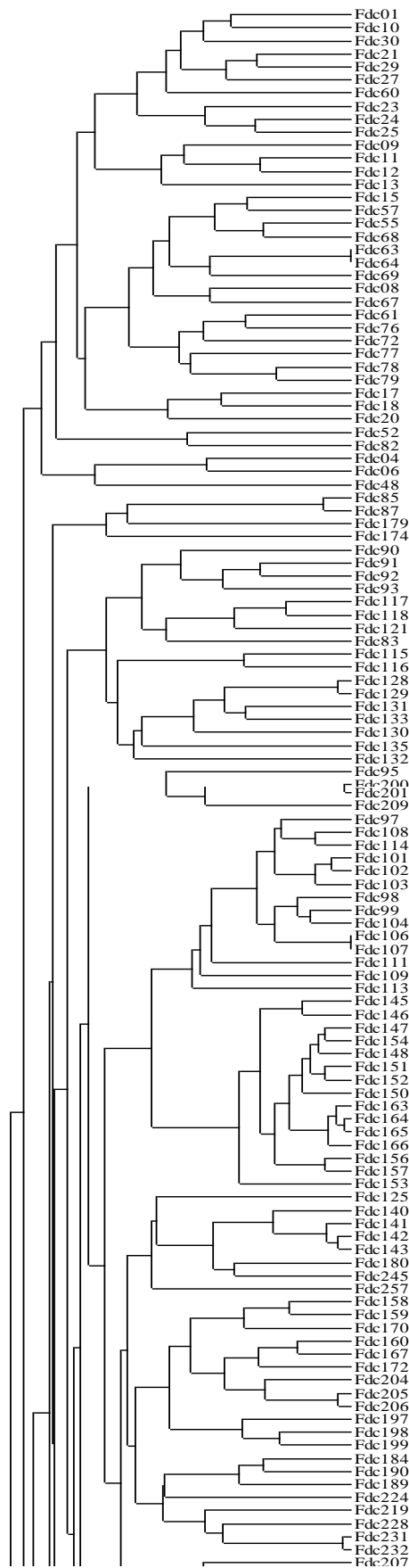
F195	X	Fd-19	Maués	Hiperplasia da gema vegetativa
F184			Maués	Hiperplasia da gema vegetativa
F08	X	Fd-1	Maués	Hipertrofia floral
F09	X	Fd-1	Maués	Hipertrofia floral
F174	X	Fd-1	Maués	Hipertrofia floral
F183	X	Fd-2	Maués	Hipertrofia floral
F191	X	Fd-8	Maués	Hipertrofia floral
F189	X	Fd-11	Maués	Hipertrofia floral
F10	X	Fd-18	Maués	Hipertrofia floral
F178	X	Fd-18	Maués	Hipertrofia floral
F199	X	Fd-18	Maués	Hipertrofia floral
F19	X	Fd-19	Maués	Hipertrofia floral
F23	X	Fd-19	Maués	Hipertrofia floral
F24	X	Fd-19	Maués	Hipertrofia floral
F27	X	Fd-19	Maués	Hipertrofia floral
F172	X	Fd-19	Maués	Hipertrofia floral
F175	X	Fd-19	Maués	Hipertrofia floral
F180	X	Fd-19	Maués	Hipertrofia floral
F203	X	Fd-19	Maués	Hipertrofia floral
F204	X	Fd-19	Maués	Hipertrofia floral
F182	X	Fd-2	Maués	
F67	X	Fd-1	Presidente Figueiredo	Hiperplasia da gema vegetativa
F68	X	Fd-1	Presidente Figueiredo	Hiperplasia da gema vegetativa
F64	X	Fd-13	Presidente Figueiredo	Hiperplasia da gema vegetativa
F69	X	Fd-13	Presidente Figueiredo	Hiperplasia da gema vegetativa
F72	X	Fd-13	Presidente Figueiredo	Hiperplasia da gema vegetativa
F63			Presidente Figueiredo	Hiperplasia da gema vegetativa
F57	X	Fd-19	Presidente Figueiredo	Hiperplasia da gema vegetativa
F62	X	Fd-19	Presidente Figueiredo	Hiperplasia da gema vegetativa
F61			Presidente Figueiredo	Hiperplasia da gema vegetativa
F78	X	Fd-13	Presidente Figueiredo	Hipertrofia floral
F82	X	Fd-14	Presidente Figueiredo	Hipertrofia floral
F84	X	Fd-16	Presidente Figueiredo	Hipertrofia floral
F76	X	Fd-18	Presidente Figueiredo	Hipertrofia floral
F77	X	Fd-18	Presidente Figueiredo	Hipertrofia floral
F83	X	Fd-19	Presidente Figueiredo	Hipertrofia floral
F54	X	Fd-19	Presidente Figueiredo	Hipertrofia floral
F60	X	Fd-18	Presidente Figueiredo	Hiperplasia da gema vegetativa
F79	X	Fd-13	Presidente Figueiredo	
F55	X	Fd-19	Presidente Figueiredo	
F334	X	Fd-7	Rio Preto da Eva	Hiperplasia da gema vegetativa
F356	X	Fd-14	Rio Preto da Eva	Hiperplasia da gema vegetativa
F369	X	Fd-18	Rio Preto da Eva	Hiperplasia da gema vegetativa
F371	X	Fd-18	Rio Preto da Eva	Hiperplasia da gema vegetativa
F335	X	Fd-19	Rio Preto da Eva	Hiperplasia da gema vegetativa
F337	X	Fd-19	Rio Preto da Eva	Hiperplasia da gema vegetativa
F345	X	Fd-19	Rio Preto da Eva	Hiperplasia da gema vegetativa

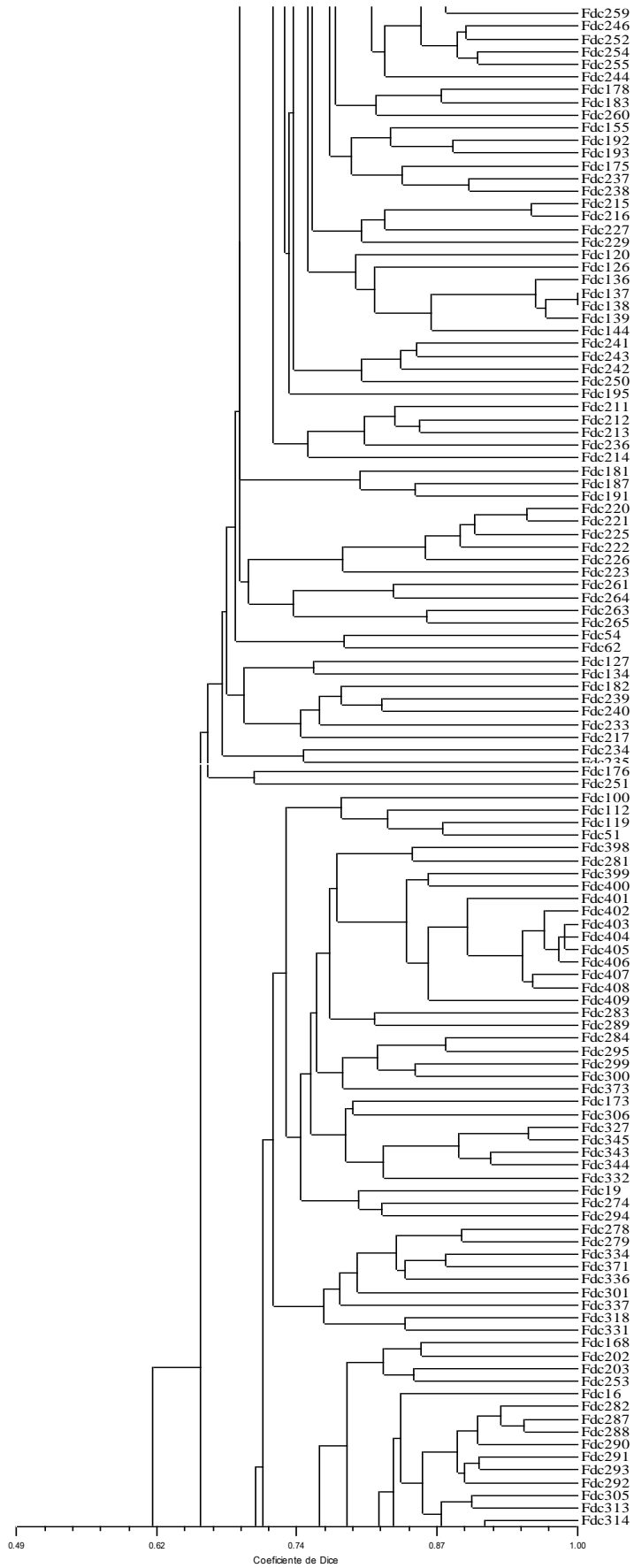
F352	X	Fd-19	Rio Preto da Eva	Hiperplasia da gema vegetativa
F353	X	Fd-19	Rio Preto da Eva	Hiperplasia da gema vegetativa
F366	X	Fd-19	Rio Preto da Eva	Hiperplasia da gema vegetativa
F365			Rio Preto da Eva	Hiperplasia da gema vegetativa
F372	X	Fd-16	Rio Preto da Eva	Hipertrofia floral
F336	X	Fd-19	Rio Preto da Eva	Hipertrofia floral
F350	X	Fd-19	Rio Preto da Eva	Hipertrofia floral
F354	X	Fd-19	Rio Preto da Eva	Hipertrofia floral
F373	X	Fd-19	Rio Preto da Eva	Hipertrofia floral
F363			Rio Preto da Eva	Hipertrofia floral
F332	X	Fd-10	São Sebastião do Uatumã	Hiperplasia da gema vegetativa
F316	X	Fd-18	São Sebastião do Uatumã	Hiperplasia da gema vegetativa
F311	X	Fd-19	São Sebastião do Uatumã	Hiperplasia da gema vegetativa
F312	X	Fd-19	São Sebastião do Uatumã	Hiperplasia da gema vegetativa
F314	X	Fd-19	São Sebastião do Uatumã	Hiperplasia da gema vegetativa
F315	X	Fd-19	São Sebastião do Uatumã	Hiperplasia da gema vegetativa
F319	X	Fd-19	São Sebastião do Uatumã	Hiperplasia da gema vegetativa
F320	X	Fd-19	São Sebastião do Uatumã	Hiperplasia da gema vegetativa
F344	X	Fd-19	São Sebastião do Uatumã	Hiperplasia da gema vegetativa
F313			São Sebastião do Uatumã	Hiperplasia da gema vegetativa
F318			São Sebastião do Uatumã	Hiperplasia da gema vegetativa
F333	X	Fd-4	São Sebastião do Uatumã	Hipertrofia floral
F310	X	Fd-18	São Sebastião do Uatumã	Hipertrofia floral
F317	X	Fd-18	São Sebastião do Uatumã	Hipertrofia floral
F331	X	Fd-19	São Sebastião do Uatumã	Hipertrofia floral
F293	X	Fd-18	Urucará	Galha
F307	X	Fd-18	Urucará	Galha
F30	X	Fd-13	Urucará	Galha
F306	X	Fd-1	Urucará	Hiperplasia da gema vegetativa
F308	X	Fd-3	Urucará	Hiperplasia da gema vegetativa
F281	X	Fd-6	Urucará	Hiperplasia da gema vegetativa
F298	X	Fd-12	Urucará	Hiperplasia da gema vegetativa
F297	X	Fd-14	Urucará	Hiperplasia da gema vegetativa
F296	X	Fd-16	Urucará	Hiperplasia da gema vegetativa
F294	X	Fd-18	Urucará	Hiperplasia da gema vegetativa
F301	X	Fd-18	Urucará	Hiperplasia da gema vegetativa
F302	X	Fd-18	Urucará	Hiperplasia da gema vegetativa
F282	X	Fd-19	Urucará	Hiperplasia da gema vegetativa
F283	X	Fd-19	Urucará	Hiperplasia da gema vegetativa
F284	X	Fd-19	Urucará	Hiperplasia da gema vegetativa
F289	X	Fd-19	Urucará	Hiperplasia da gema vegetativa
F292	X	Fd-19	Urucará	Hiperplasia da gema vegetativa
F300	X	Fd-19	Urucará	Hiperplasia da gema vegetativa
F304	X	Fd-19	Urucará	Hiperplasia da gema vegetativa
F321	X	Fd-19	Urucará	Hiperplasia da gema vegetativa
F322	X	Fd-19	Urucará	Hiperplasia da gema vegetativa
F323	X	Fd-19	Urucará	Hiperplasia da gema vegetativa

F325	X	Fd-19	Urucará	Hiperplasia da gema vegetativa
F286			Urucará	Hiperplasia da gema vegetativa
F273	X	Fd-19	Urucará	Hipertrofia floral
F309	X	Fd-1	Urucará	Hipertrofia floral
F278	X	Fd-6	Urucará	Hipertrofia floral
F280	X	Fd-7	Urucará	Hipertrofia floral
F274	X	Fd-15	Urucará	Hipertrofia floral
F275	X	Fd-16	Urucará	Hipertrofia floral
F291	X	Fd-16	Urucará	Hipertrofia floral
F277	X	Fd-18	Urucará	Hipertrofia floral
F279	X	Fd-18	Urucará	Hipertrofia floral
F287	X	Fd-18	Urucará	Hipertrofia floral
F299	X	Fd-18	Urucará	Hipertrofia floral
F303	X	Fd-18	Urucará	Hipertrofia floral
F330	X	Fd-18	Urucará	Hipertrofia floral
F340	X	Fd-18	Urucará	Hipertrofia floral
F285	X	Fd-19	Urucará	Hipertrofia floral
F288	X	Fd-19	Urucará	Hipertrofia floral
F290	X	Fd-19	Urucará	Hipertrofia floral
F305	X	Fd-19	Urucará	Hipertrofia floral
F324	X	Fd-19	Urucará	Hipertrofia floral
F329	X	Fd-19	Urucará	Hipertrofia floral
F327			Urucará	Hipertrofia floral
F341	X	Fd-19	Urucará	Hipertrofia floral

APÊNDICE B – Dendrograma obtido pelo agrupamento UPGMA dos isolados de *F.*

decemcellulare





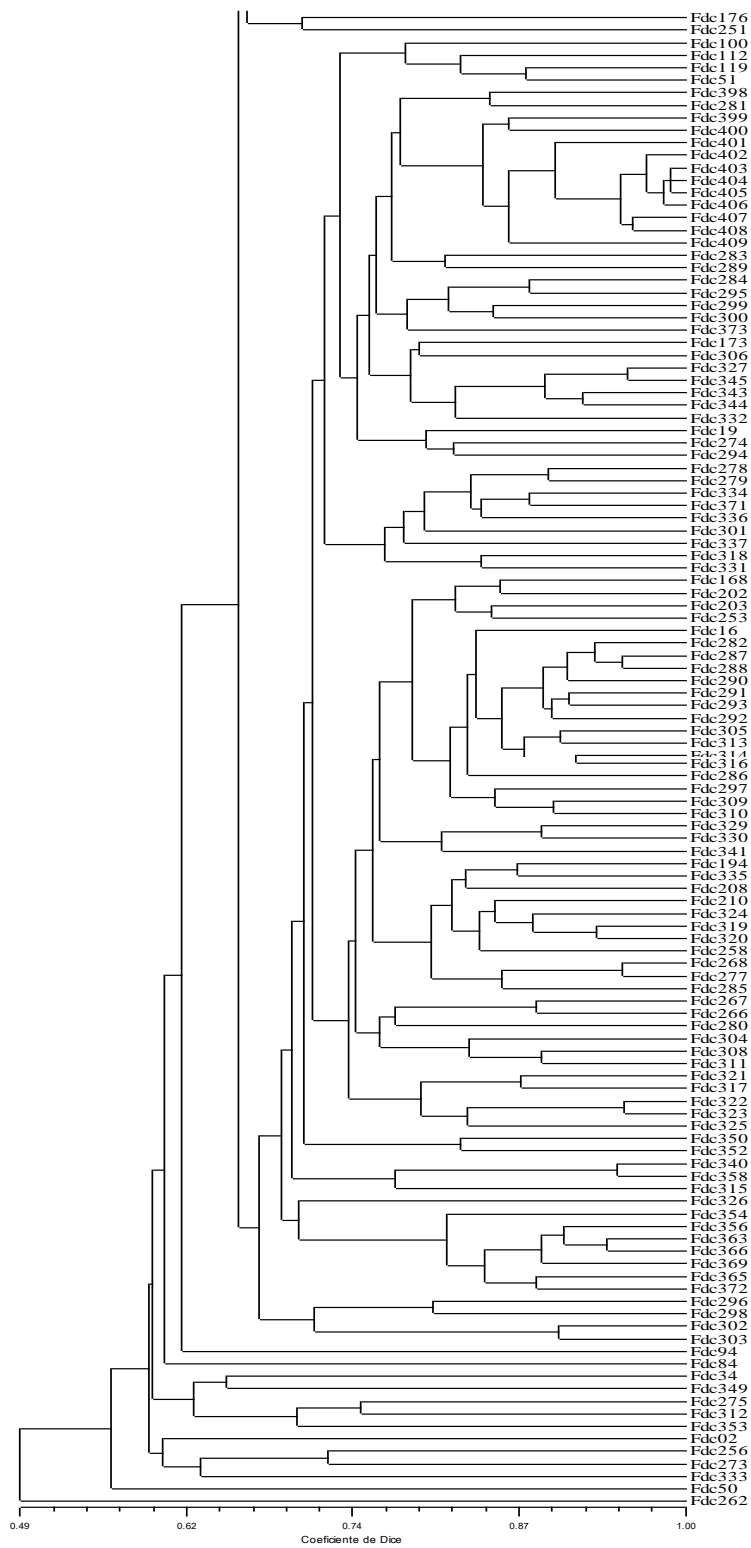


Figura 12 - Dendrograma obtido pelo agrupamento UPGMA dos isolados de *Fusarium decemcellulare* pelo coeficiente de Dice, utilizando o programa NTSYS