

Anais



VI Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Amazônia Ocidental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Anais da VI Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental

*Regina Caetano Quisen
Ronaldo Ribeiro de Moraes
Luis Antonio Kioshi Aoki Inoue
Gilvan Ferreira da Silva
Editores Técnicos*

*Embrapa Amazônia Ocidental
Manaus, AM
2010*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Amazônia Ocidental

Rodovia AM-010, km 29, Estrada Manaus/Itacoatiara

Caixa Postal 319, 69010-970, Manaus, AM

Fone: (92) 3303-7800

Fax: (92) 3303-7820

www.cpa.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Celso Paulo de Azevedo*

Secretária: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

Membros: *Aparecida das Graças Claret de Souza*

José Ricardo Pupo Gonçalves

Lucinda Carneiro Garcia

Luis Antonio Kioshi Inoue

Maria Augusta Abtibol Brito

Maria Perpétua Beleza Pereira

Paulo César Teixeira

Raimundo Nonato Vieira da Cunha

Ricardo Lopes

Ronaldo Ribeiro de Moraes

Revisão de texto: *Maria Perpétua Beleza Pereira*

Normalização bibliográfica: *Maria Augusta Abtibol Brito*

Diagramação e arte: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

1ª edição

1ª gravação em CD-ROM (2010): 200

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Amazônia Ocidental.**

Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental (6. : 2010 :
Manaus).

Anais... / editores Regina Caetano Quisen, Ronaldo Ribeiro de Moraes, Luis
Antonio Kioshi Aoki Inoue e Gilvan Ferreira da Silva. – Manaus: Embrapa
Amazônia Ocidental, 2010.

1 CD-ROM; 4 ¼ pol.

ISBN 978-85-89111-10-2

1. Pesquisa. 2. Desenvolvimento. I. Quisen, Regina Caetano. II. Moraes,
Ronaldo Ribeiro de. III. Inoue, Luis Antonio Kioshi Aoki. IV. Silva, Gilvan Ferreira
da. V. Título.

CDD 501

Diversidade Genética de *Mycosphaerella fijiensis* no Estado do Amazonas

Álison Thiago Barbosa Pereira
Rodrigo Fernandes de Souza
Nelcimar Reis Sousa
Luadir Gasparotto
Rogerio E. Hanada
Gilvan Ferreira da Silva

Resumo

A banana constitui parte importante da alimentação e renda dos pequenos produtores rurais. No entanto, vários fatores limitam a produção, como o manejo inadequado e o ataque de doenças, entre as quais se destaca a sigatoka-negra, considerada a doença mais importante da bananeira, na maioria das regiões produtoras do mundo, causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis*. O presente estudo objetivou analisar a diversidade de 71 isolados, sendo 63 do Estado do Amazonas, por meio do marcador molecular *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR). Após triagem, foram selecionados nove *primers* da lista set#9 (*primers* 801-900) da *University of British Columbia*. Obtiveram-se 107 bandas, 103 polimórficas, resultando num percentual de polimorfismo de 96,2% e média de 11,8 bandas polimórficas por iniciador. O marcador molecular ISSR apresentou elevado nível de polimorfismo demonstrando que os *primers* foram informativos e eficazes para estudo da diversidade genética de *M. fijiensis*. As análises de relacionamento genético indicaram que não houve associação entre similaridade genética e região de coleta.

Termos para indexação: *Mycosphaerella fijiensis*, fitopatógeno, ISSR.

Introdução

A sigatoka-negra foi originalmente identificada em Fiji, em 1963, e ultimamente está presente na maioria das áreas onde a bananeira é plantada (ARZANLOU et al., 2007). *M. fijiensis* é um fungo ascomiceto, heterotálico, haploide durante a fase vegetativa do seu ciclo de vida. O ciclo sexual resulta em ascósporos que exercem papel importante na epidemiologia da doença. Após a deposição, tubos germinativos dos ascósporos ou conídios assexuados penetram os estômatos. Subseqüentemente, durante a fase biotrófica, a hifa filamentosa cresce lentamente entre o mesófilo. Essa etapa é seguida pela etapa necrotrófica, resultando em morte celular, que torna as folhas totalmente necróticas. Como resultado, *M. fijiensis* enfraquece a capacidade fotossintética, reduz o tamanho do fruto e induz o amadurecimento precoce em bananeiras suscetíveis.

O fitopatógeno *M. fijiensis* foi detectado primeiramente no Amazonas, em 1998, no Município de Tabatinga, fronteira do Brasil com a Colômbia e o Peru. Desde então, alastrou-se rapidamente por todos os municípios do estado e tem se expandido rapidamente pelo País. A alta capacidade destrutiva do patógeno faz com que a doença adquira grande importância econômica e social (GASPAROTTO et al., 2006).

Vários trabalhos têm descrito a diversidade genética de populações de *M. fijiensis* (CARLIER et al., 1996; PEREA et al., 2005; RIVAS et al., 2004; ZAPATER et al., 2004), uma vez que o conhecimento das variações genéticas de uma população permite a compreensão dos processos evolutivos ocorridos e suas perspectivas futuras (BURDON e

SILK, 1997; MCDONALD e LINDE, 2002; ANDERSON et al., 2004).

O estudo da diversidade por meio de marcadores moleculares tem como vantagem o fato de estes permitirem ampla amostragem do genoma. Várias ferramentas moleculares são disponibilizadas para o estudo de diversidade em fungos, entre as quais se destacam: *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs), *Simple Sequence Repeats* (SSR), *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR), *Internal Transcribed Spacer* (ITS) e mais recentemente a técnica chamada de *Diversity Arrays Technology* (DArT), entre várias outras ferramentas disponíveis.

Os microssatélites, também chamados de SSR, são regiões no genoma eucarioto que possuem repetições em *tandem* de mono-, tri-, tetra-, penta- ou até mesmo hexanucleotídeos, que se repetem por diversas vezes de maneira idêntica (motivos). As seqüências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, ou até mesmo entre espécies relacionadas, permitindo a confecção de *primers* específicos para amplificar essas regiões via PCR (POWELL et al., 1996; FISHER et al., 1996; HITE et al., 1996; PRIMMER et al., 1997; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; TÓTH et al., 2000; HAYDEN e SHARP, 2001). Os genomas cloroplástico e mitocondrial também possuem SSR, mas, em geral, trata-se de repetições mononucleotídicas (POWELL et al., 1996; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Os ISSRs (*Inter Simple Sequence Repeat*) são produtos de PCR obtidos usando *primers* com repetição de di-, tri-, tetra- ou pentanucleotídeos. Esse marcador é baseado na amplificação entre regiões de microssatélite e vem sendo extensivamente usado, nos últimos anos, em diferentes organismos, inclusive nos fungos *Acromyrmex* ssp. (ABRIL e BUCHER 2007), *Fusarium pseudograminearum* (MISHRA et al., 2006), *Beauveria bassiana* (ESTRADA et al., 2006), entre outros.

O marcador ISSR também vem sendo usado para separar as diferentes espécies de fungo. O trabalho realizado por Wang et al. (2005) mostrou que o marcador ISSR é capaz de separar diferentes espécies do gênero *Beauveria* spp., como *B. brongniartii*, *B. amorpha* e *B. velata*, e ainda conseguir diferenciar 100% dos indivíduos de *B. Bassiana*. Vale ressaltar que de 18 *primers* utilizados, quando aplicados somente em *B. Bassiana*, 8 apresentaram 100% de polimorfismo, demonstrando, assim, a eficácia do marcador em análise de diversidade genética intraespecífica.

Este trabalho objetivou analisar a diversidade de *M. fijiensis* por meio do marcador ISSR.

Material e Métodos

Microrganismo e condições de cultivo

Os isolados de *M. fijiensis* foram obtidos na coleção da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, e mantidos em Potato Dextrose Agar enriquecido. Para extração de DNA, os isolados foram crescidos em Potato Dextrose Broth líquido sob agitação de 120 rpm para

obtenção de massa micelial. O micélio foi recuperado por filtração, lavado com água autoclavada, seco com papel toalha e armazenado a -80 °C, para a extração.

Extração do DNA genômico

As extrações de DNA foram realizadas conforme o protocolo de Doyle e Doyle (1987). A quantificação foi efetuada com o auxílio do espectrofotômetro (NanoDrop-Thermo) e em gel de agarose 0,8% para análise da qualidade. Para a análise da diversidade, extraiu-se o DNA de 71 amostras de várias localidades (Tabela 1). Para fins de efeito comparativo foram incluídos, na análise, isolados de Roraima, Mato Grosso, São Paulo e um isolado causador da sigatoka-amarela (*Mycosphaerella musicola*).

Reação em Cadeia da Polimerase

As reações de PCR foram previamente padronizadas para *M. fijiensis* por Pereira et al. (2008). As reações foram realizadas em volume total de 15 μ L com 0,3 μ M de iniciador, 50 ng de DNA, 2 mM de MgCl₂ e 0,5 mM de dNTP e 1 U de *Taq* DNA *polimerase* (Phonetría). As condições de amplificação foram: um ciclo a 94 °C por 3 minutos, 40 ciclos a 94 °C por 30 s, e anelamento de acordo com cada *primer* por 1 minuto, e 72 °C por 2 minutos, extensão final a 72 °C por 7 minutos, as reações foram realizadas utilizando o termociclador Veriti™ (*Applied Biosystems*).

Tabela 1. Relação dos isolados de *M. fijiensis* oriundos dos municípios do Amazonas, de Roraima, de São Paulo e do Mato Grosso, provenientes do banco de isolados da Embrapa Amazônia Ocidental.

Identificação	Município	Coordenadas em GPS	
1	Presidente Figueiredo, AM	S 02° 03 324	W 59° 38 650
2	Presidente Figueiredo, AM	S 02° 03 346	W 59° 40 047
4	Manaus, AM	-	-
5	Presidente Figueiredo, AM	S 02° 03 329	W 59° 34 650
6	Manacapuru, AM	S 03° 17 338	W 60° 37 236
7	Manacapuru, AM	S 03° 16 252	W 60° 30 539
8	Manacapuru, AM	-	-
9	Manacapuru, AM	-	-
10	Manacapuru, AM	-	-
13	Manacapuru, AM	-	-
16	Manacapuru, AM	-	-
17	Rio Preto da Eva, AM	S 02° 40 510	W 59° 33 602
18	Rio Preto da Eva, AM	S 02° 44 069	W 59° 46 152
19	Rio Preto da Eva, AM	S 02° 39 260	W 59° 34 051
20	Rio Preto da Eva, AM	S 02° 43 599	W 59° 53 292
22	Itacoatiara, AM	S 03° 06 051	W 58° 43 214
23	Manacapuru, AM	S 03° 15 419	W 60° 39 152
24	Rio Preto da Eva, AM	S 02° 43 040	W 59° 4 515
25	Rio Preto da Eva, AM	S 02° 39 249	W 59° 34 087
27	Cajoti, SP	S 24° 43 325	W 48° 84 214
29	Rio Preto da Eva, AM	-	-
30	Rio Preto da Eva, AM	S 02° 43 999	W 59° 53 485
31	Rio Preto da Eva, AM	S 02° 41 535	W 59° 42 374
33	Rio Preto da Eva, AM	S 02° 44 371	W 59° 29 399
37	Rio Preto da Eva, AM	S 02° 42 956	W 59° 41 802
38	Rio Preto da Eva, AM	S 02° 43 074	W 59° 41 859
40	Rio Preto da Eva, AM	S 02° 42 996	W 59° 41 803
41	Rio Preto da Eva, AM	S 02° 51 594	W 59° 24 414
42	Rio Preto da Eva, AM	-	-
43	Itacoatiara, AM	S 03° 03 244	W 58° 46 100
45	Manaus, AM	S 02° 52 960	W 60° 02 091
46	Manaus, AM	S 02° 56 857	W 60° 01 664
47	Manaus, AM	S 02° 54 027	W 59° 54 520
49	Manaus, AM	S 02° 54 027	W 59° 54 520
51	Manaus, AM	S 02° 43 381	W 59° 55 413
52	Manaus, AM	S 02° 59 693	W 60° 04 472
54	Manaus, AM	S 02° 54 163	W 59° 54 150
58	Manaus, AM	S 02° 48 377	W 59° 55 400
59	Manaus, AM	S 02° 48 380	W 54° 55 407
60	Manaus, AM	S 03° 16 340	W 60° 38 493
61	Manacapuru, AM	S 03° 15 291	W 60° 38 062
62	Manacapuru, AM	S 03° 16 511	W 60° 38 280
64	Manacapuru, AM	S 03° 07 404	W 60° 22 043
66	Manacapuru, AM	S 03° 13 588	W 60° 07 317
67	Cáceres, MT	S 16° 10 980	W 57° 38 345
68	Manacapuru, AM	S 03° 16 509	W 60° 38 284
69	Manacapuru, AM	S 03° 15 397	W 60° 39 143

Tabela 1. Continuação

Identificação	Município	Coordenadas em GPS
72	Manacapuru, AM	S 03° 09 4508 W60° 24 153
75	Manacapuru, AM	S 03° 16 349 W 60° 38 486
79	Cáceres, MT	S 16° 09 484 W 57° 35 555
82	Cáceres, MT	S 16° 09 147 W 57° 37 914
84	Nossa Senhora do Livramento, MT	S 15° 46 338 W 56° 20 234
86	Cáceres, MT	S 16° 10 050 W 57° 36 202
92	Nossa Senhora do Livramento, MT (sigatoka-amarela)	S 15° 46 339 W 58° 20 526
97	Irاندuba, AM	S 03° 13 483 W 60° 07 505
99	Irاندuba, AM	S 03° 11 633 W 60° 08 392
100	Irاندuba, AM	S 03° 10 035 W 60° 06 341
101	Irاندuba, AM	S 03° 14 944 W 60° 08 838
102	Irاندuba, AM	S 03° 08 372 W 60° 14 286
103	Irاندuba, AM	S 03° 06 364 W 60° 09 377
105	Presidente Figueiredo, AM	S 01° 52 972 W 60° 04 326
112	Benjamin Constant, AM	S 04° 25 125 W 70° 03 420
119	Caroebe, RR	S 00° 47 820 W 59° 25 749
121	Caroebe, RR	S 00° 47 823 W 59° 25 722
123	Presidente Figueiredo, AM	S 02° 02 554 W 59° 37 295
127	Presidente Figueiredo, AM	S 02° 03 335 W 59° 38 652
134	Atalaia do Norte, AM	S 04° 22 598 W 70° 10 356
146	Atalaia do Norte, AM	S 04° 22 570 W 70° 10 490
149	São Gabriel da Cachoeira, AM	S 00° 09 074 W 67° 00 972
150	Itacoatiara, AM	S 03° 03 520 W 58° 50 140
153	São Gabriel da Cachoeira, AM	S 00° 05 683 W 67° 04 747

Seleção de *Primers*

A sequência dos *primers* usados para amplificação das regiões ISSR foi baseada na lista set#9 (*primers* 801-900) da *University of British Columbia* (UBC). Para triagem dos *primers* que amplificam bandas com perfil polimórfico em *M. fijiensis*, utilizou-se uma amostra de DNA. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo 0,3 μg de brometo de etídio por mL.

Análise de dados

Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,5% e utilizados na elaboração de uma matriz de similaridade genética, por meio do registro da presença (1) e da ausência (0) de bandas no perfil eletroforético de cada isolado. A similaridade genética foi estimada por meio do coeficiente de Jaccard, e, para visualizar a forma de agrupamento dos isolados, foi elaborado o dendograma empregando-se o método de agrupamento da distância média (UPGMA- *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), utilizando o programa *NTSYSpc*, versão 2.10 (ROHLF, 2000).

Resultados e Discussão

Seleção dos *Primers* ISSR

Após a padronização das condições de amplificação do marcador ISSR em *M. fijiensis*, realizou-se a seleção dos *primers*. Dos 100 *primers* testados, 53 amplificaram de 1 a 15 bandas e destes, 25 produziram mais de 5 bandas e foram selecionados. Na análise de polimorfismo com uma amostra de 10 isolados, apenas 16 *primers* apresentaram polimorfismo: 807, 829, 834, 836, 841, 856, 857, 861, 864, 881, 884, 885, 886, 889, 891 e 895. Nove *primers* foram selecionados para serem aplicados em todos os isolados (Tabela 2).

Os *primers* com blocos de repetição (AT e TA) com diferentes âncoras no sentido 3' (AT)₈T, (AT)₈G, (AT)₈C, (TA)₈A, (TA)₈C, (TA)₈G, (AT)₈YA, (AT)₈YC, (AT)₈YG, (TA)₈RT, (TA)₈RC e (TA)₈RG não amplificaram nos testes iniciais, provavelmente em razão de a triagem inicial

desses *primers* ter sido realizada em temperatura de anelamento mais alta (45 °C) do que a indicada, que é de 25 °C. Outra possibilidade seria a sequência de nucleotídeos que separa os dois *loci* de SSR estar além da capacidade de amplificação da enzima.

Análise da diversidade de *M. fijiensis* por meio do marcador ISSR

Os *primers* selecionados foram seis dinucleotídeos, dois trinucleotídeos e um pentanucleotídeo (Tabela 2). O iniciador 885 apresentou 15 bandas no total, sendo 86,6% polimórficas. Os *primers* 807, 841, 856, 861, 864 e 881 apresentaram 100% de polimorfismo. Com 13 bandas amplificadas e polimorfismo de 92,3% ficaram os *primers* 886 e 889, confirmando que o marcador ISSR é capaz de detectar diferenças entre isolados de *M. fijiensis*.

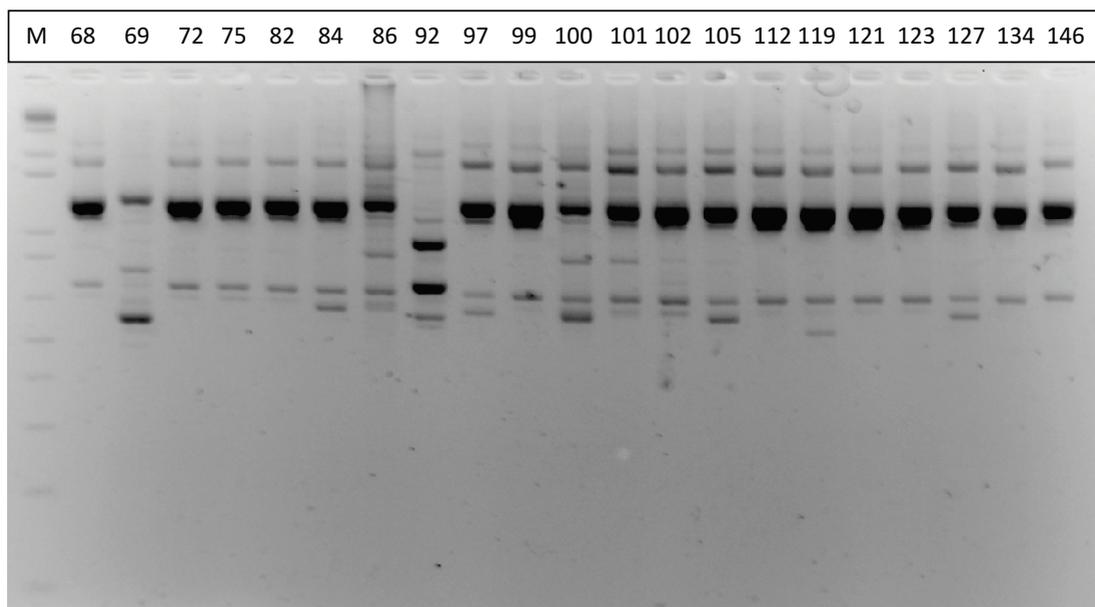
Tabela 2. Resultados dos nove *primers* selecionados para a análise da diversidade de *M. fijiensis*.

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	Âncoras	Temperatura de Anelamento (°C)	Número de bandas amplificadas	Número de bandas polimórficas	Percentual de polimorfismo (%)
UBC 807	(AG) ₈	T	47,0	13	13	100%
UBC 841	(GA) ₈	YC	48,5	15	15	100%
UBC 856	(AC) ₈	YA	52,8	11	11	100%
UBC 861	(ACC) ₆	-	60,6	9	9	100%
UBC 864	(ATG) ₆	-	43,6	9	9	100%
UBC 881	(TGGGG) ₂	GGG- TG	59,3	9	9	100%
UBC 885	(GA) ₇	BHB-	48,3	15	13	86,6%
UBC 886	(CT) ₇	VDV-	48,4	13	12	92,3%
UBC 889	(AC) ₇	DBD-	50,1	13	12	92,3%
Total	-	-	-	107	103	

No total foram obtidas 107 bandas, destas 103 polimórficas, resultando em um percentual de polimorfismo de 96,2%, com média de 11,8 bandas polimórficas por *primer*. Somente três iniciadores não apresentaram 100% de polimorfismo (885, 886 e 889), com média de 1,33 fragmentos monomórficos por *primer*. Todos os *primers* testados apresentaram elevado número de bandas polimórficas, o que demonstra alta variabilidade genética entre os isolados. Os resultados aqui encontrados foram mais eficientes do que os obtidos por Meng e Chen (2001) por meio de 13

primers de ISSR em isolados de *Phialophora gregata*. Nossos dados também foram superiores aos encontrados por Qian et al. (2001), ao analisarem, com o marcador ISSR, a variação genética de *Oryza granulata* da China. Tal diferença pode ser justificada pela baixa diversidade genética existente na população chinesa de *O. granulata*.

Detectou-se um perfil de bandas diferenciado no isolado 92, o que era esperado por se tratar de outra espécie, *M. musicola* (Figura 1).



*A letra M representa o marcador 1 kb DNA ladder.

Figura 1. Gel de agarose a 1,5% mostrando o produto da amplificação do *primer* 807. Os números representam os isolados e a letra (M) representa o marcador 1kb DNA ladder.

O dendrograma construído a partir da matriz de similaridade de Jaccard mostra o relacionamento genético entre os 71 isolados (Figura 2). No geral, observou-se que não houve formação de grupos homogêneos por região. Notou-se que os isolados de municípios muito

próximos, como Manaus e Iranduba, não apresentaram alto grau de similaridade que resultasse na formação de um agrupamento. Porém, o dendrograma apresenta um grupo com 26 isolados com a predominância dos municípios de Manacapuru (8) e Rio Preto da Eva (13).

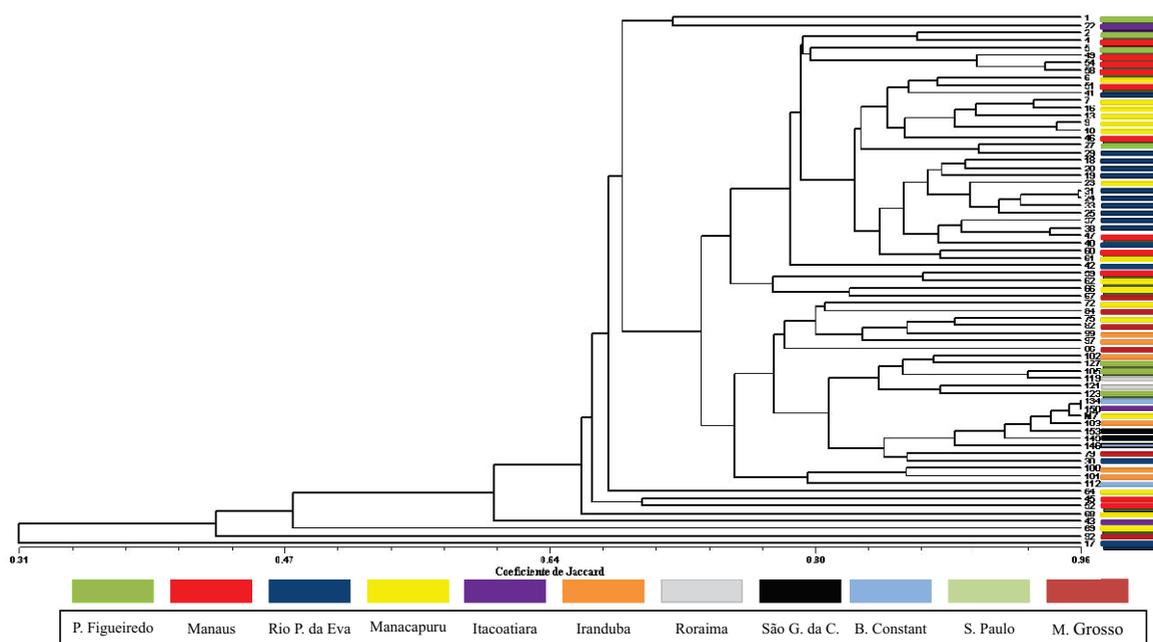


Figura 2. Dendrograma de similaridade genética de isolados de *M. fijiensis* provenientes de municípios do Amazonas e de outras localidades do Brasil.

Nossos dados indicam que não houve associação entre similaridade e região de coleta. Os isolados de Benjamin Constant e Itacoatiara (134 e 150) foram os mais relacionados (coeficiente similaridade igual a 0,96). Em contrapartida, alguns isolados provenientes da mesma localidade apresentaram grau de similaridade genética superior a 0,80, tais como o 9 e o 10. A divergência, aqui detectada, entre similaridade genética e região de coleta, pode ser atribuída à recente introdução desse fitopatógeno no Estado do Amazonas (PEREIRA et al., 1998a).

Conclusões

- O marcador ISSR é eficaz na discriminação de isolados de *M. fijiensis* do Estado do Amazonas.

- Os dados preliminares mostram que não houve relação direta entre similaridade e local da coleta.

Agradecimentos

A Deus, pela vida e por tudo.

Ao pesquisador Gilvan Ferreira, pela extrema paciência e orientação.

À pesquisadora Nelcimar Reis, pela ajuda e cooperação.

Ao Técnico Jeferson Cruz, pelos ensinamentos.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Fitopatologia, pelo apoio.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa.

À Embrapa, pelo espaço físico e pela oportunidade.

Referências

- ABRIL, A.B., BUCHER, E.H. Genetic Diversity of Fungi Occurring in Nests of Three Acromyrmex Leaf-cutting Ant Species from Cordoba, Argentina. *Microb Ecol.* Apr 29, 2007.
- ANDERSON, P.K., CUNNINGHAM, A.A., PATEL, N.G., MORALES, F.J., EPSTEIN, P.R., DASZAK, P. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology & Evolution.* 19(10):535-544, 2004.
- ARZANLOU, M., ABELN, E.C.A., KEMA, G. H. J., WAALWIJK, C., CARLIER, J., CROUS, P.W. Molecular diagnostics in the Sigatoka disease complex of banana. *Phytopatology*, v. 97, p.1112-1118, 2007.
- BURDON, J.J., SILK, J. Sources and patterns of diversity in plant-pathogenic fungi. *Phytopathology* 87:664-669,1997.
- CARLIER, J., LEBRUN, M.H., ZAPATER, M.F., DUBOIS, C., MOURICHON, X. Genetic structure of the global population of banana black leaf streak fungus, *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology*, 5, 499–510, 1996.
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19:11-15. 1987.
- ESTRADA, M.E., CAMACHO, M.V., BENITO, C. The molecular diversity of different isolates of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. as assessed using intermicrosatellites (ISSRs). *Cell Mol Biol Lett.* 2007;12(2):240-52, 2006
- FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3ª ed. Brasília: EMBRAPA-CERNAGEN, 220p, 1998.
- FISHER, P.J., GARDNER, R.C., RICHARDSON, T.E. Single locus microsatellites isolated using 5'anchored PCR. *Nucleic acids Research*, v.24, n. 21, p.4369-4371, 1996.
- GASPAROTTO, L., PEREIRA, J.C., R., HANADA, R.E., MONTORROYOS, A.V.V. **Sigatoka-negra da bananeira.** Manaus, 177p. 2006.
- HAYDEN M.J., SHARP, P.J. Targeted Development Of Informative Microsatellite (SSR) Markers. *Nucleic Acids Research*, V.29, N.8, 2001.
- HITE, J. M. et al. Factors Affecting Fidelity Of DNA Synthesis During PCR Amplification Of D(C-A)N D(G-T)N Mocosatellite Repeats. *Nucleic Acids Research*, V.24, N.12, P.2429-2434, 1996
- MENG, X., CHEN, W. Applications of AFLP and ISSR techniques in detecting genetic diversity in the soybean brown stem rot pathogen *Phialophora gregata*. *Mycol. Res.* 105 (8): 936 ± 940, 2001.
- MISHRA, P.K., TEWARI J.P., CLEAR, R.M., TURKINGTON, T.K. Genetic diversity and recombination within populations of *Fusarium pseudograminearum* from western. Canada. *Int Microbiol*, v. 9, n.1, p.65-8, 2006.
- MCDONALD, B.A., LINDE, C. Pathogen population genetics, Evolutionary Potential, and durable resistance, *Ann. Rev*, v. 40, p. 349-379, 2002.

- PEREA, I., ARANGO, E. R., E. MÁRQUEZ, E., ARANGO, R. Genetic diversity of Colombian isolates of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet based on microsatellite markers. **InfoMusa** - Vol. 14 No. 2, 2005.
- PEREIRA, J.C.R., GASPAROTTO, L., COELHO, A.F. da S. et. al. Ocorrência da Sigatoka negra no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23 (suplemento), p.295, 1998.
- PEREIRA, Á.T.B., SILVA .G.F., GASPAROTTO, L., HANADA R. E. INTER-SINGLE -SEQUENCE-REPEAT (ISSR) EM *Mycosphaerella fijiensis*, SELEÇÃO DE LOCOS E PADRONIZAÇÃO DA PCR. In: Simpósio Brasileiro de Recursos Genéticos, 2008, 2. Brasília. **Anais do Simpósio Brasileiro de Recursos Genéticos**, 2008. v. 1.
- PRIMMER, C.R., RAUDSEPP, T., CHOWDHARRY, B.P., MOLLER, A.P., ELLEGREN H. Low Frequency of Microsatellites In The Avian Genome. **Genome Research**, v. 7, p.471-482, 1997.
- POWELL, W., MACHRAY, G.C., PROVAN, J. Polymorphism Revealed By Simple Sequence Repeats. **Trends In Plant Science**, v.1, n.7, p. 215-222, 1996.
- QIAN, W., GE, S., HONG, D-Y. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. **Theor Appl Genet**, 102:440–449, 2001.
- RIVAS, G. G., ZAPATER, M. F., ABADIE, C., CARLIER, J. Founder effects and stochastic dispersal at the continental scale Of the fungal pathogen of bananas *Mycosphaerella fijiensis*. **Molecular Ecology**, Oxford, GB, v. 13, p. 471-482, 2004.
- ROHLF, F. J. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.1. Exeter Software: Setauket, NY, 2000.
- TÓTH, G., GÁSPÁRI, Z., JURKA, J. Microsatellite In Different Eukaryotic Genome Survey And Analysis. **Genome Research**, V. 10, P.967-981, 2000.
- WANG, S., MIAO, X., ZHAO, W., HUANG, B., FAN, M., LI, Z., HUANG, Y. Genetic diversity and population struture among strains of the entomopathonic fungus, *Beuveria bassiana*, as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR). **The British Mycological Society**. 109 (12): 1364-1372, 2005.
- Z A P A T E R , M . F . , RAKOTONANTOANDRO, A., COHEN, S., CARLIER, J. Polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism markers for the fungal banana pathogen *Mycosphaerella fijiensis*. **Molecular Ecology Notes** 4, 80–82, 2004.