

RESISTÊNCIA DE MAMOEIRO À PINTA-PRETA E VARIABILIDADE  
GENÉTICA DE *Asperisporium caricae* (SPEG.) MAUBL.

**CLÁUDIA ROBERTA RIBEIRO DE OLIVEIRA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
SETEMBRO – 2015

RESISTÊNCIA DE MAMOEIRO À PINTA-PRETA E VARIABILIDADE  
GENÉTICA DE *Asperisporium caricae* (SPEG.) MAUBL.

**CLÁUDIA ROBERTA RIBEIRO DE OLIVEIRA**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Doutora em Genética e Melhoramento  
de Plantas”

Orientador: Prof. Silvaldo Felipe da Silveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
SETEMBRO – 2015

RESISTÊNCIA DE MAMOEIRO À PINTA-PRETA E VARIABILIDADE  
GENÉTICA DE *Asperisporium caricae* (SPEG.) MAUBL.

**CLÁUDIA ROBERTA RIBEIRO DE OLIVEIRA**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Doutora em Genética e Melhoramento  
de Plantas”

Aprovada em 30 de setembro de 2015

Comissão Examinadora:

---

Hélcio Costa – (D.Sc., Agronomia/Fitopatologia) – Incaper

---

Marcelo Vivas (D.Sc., Genética e Melhoramento de Planta) – UENF

---

Prof. Messias Gonzaga Pereira – (Ph.D. em Melhoramento de Planta) - UENF

---

Prof. Silvaldo Felipe da Silveira – (D.Sc., Agronomia/Fitopatologia) - UENF  
(Orientador)

Aos meus avós Pedro Licínio e Expedita Francisca Ribeiro, pelo amor e carinho (*in memoriam*). Ao meu pai Benedito Pereira de Oliveira (*in memoriam*). À minha mãe, pelo amor e paciência, dedico e ofereço.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Soberano Deus que, sobretudo, durante esse quatro anos me deu várias oportunidades de aprendizado, guardou-me, fortaleceu-me na medida em que eu permiti e meu deu forças para ir até o fim. A Ti, seja dada toda glória!

À Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pelo apoio institucional e pela concessão da bolsa.

À minha família, na figura da minha mãe, Maria do Carmo Ribeiro de Oliveira, e minha tia, Carmem Maria Ribeiro, pela força e incentivo, por vocês eu fui até o final nessa empreitada.

Às meninas com quem eu convivi diretamente, Gislanne Brito Barros, Pakizza Sherma da Silva Leite, Cintia Machado de Oliveira Moulin Carias. Obrigada pela paciência comigo! Não poderia me esquecer da “chata” mais querida da Uenf, Claudia Lougon Paiva.

À Vivane Mirian Lanhellas Gonçalves, pelo auxílio, pela amizade e por embarcar comigo nessa jornada.

À “comunidade piauiense” residente em Campos ao longo desses quatro anos, a saber: Andrea Barros Silva Gomes, Artur Mendes Medeiros, Carlos Misael Bezerra de Sousa, Erina Vitória Rodrigues, Fábio Ribeiro Barros, Lígia Renata Almeida da Silva, Jardel Oliveira Santos, Raimundo Nonato Oliveira Silva, Verônica Brito Silva Obrigada por tudo! Com vocês por perto foi menos dolorido.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Silvaldo Felipe da Silveira, por acreditar que o trabalho fosse possível realizar, pela paciência, pela atenção, pelo apoio e incentivo.

Ao Dr. Jorge Luiz Loyola Dantas/Embrapa, Dr. Jardel Oliveira, Dr<sup>a</sup>. Geovana Cremonini Entringer, Janieli Maganha Silva Vivas e Dr<sup>a</sup>. Suzane Ariadina, pelas amostras foliares infectadas com *Asperisporium caricae*, possibilitando, assim, a efetividade desse trabalho.

Ao Dr. Vicente Dias Mussi/UENF/Clínica Fitossanitária, que, no momento de maior aflição, me estendeu a mão, por sempre me incentivar a olhar para meu alvo, pela disponibilidade e amizade!

Ao Dr. Marcelo Vivas, pelo grande auxílio na realização das análises estatísticas.

À Dr<sup>a</sup>. Roselaine Sanchez da Silva de Oliveira, muito obrigada pela preocupação e incentivo! Você se mostrou uma grande amiga!

Ao Dr. Fabio Ribeiro Barros e ao Renato Santa Catarina, por sempre nos levar a Linhares e nos trazer de lá em segurança! Obrigada, pelo comprometimento e responsabilidade na direção!

Às técnicas de laboratório do LMGV, Marcela Santana Bastos Boechat e Vitória Regia Melo de Almeida Miranda, pela paciência e dedicação nos ensinamentos prestados.

À Alinne Oliveira Nunes Azevedo, pelo auxílio na análise dos dados moleculares e paciência.

À Fernanda Abreu Santana Arêdes, pela disponibilidade, competência e ajuda na realização do trabalho molecular.

Ao Prof. Danilo Batista/UNB e Olinto Liparini/UFV, pela disponibilidade e ajuda no desenvolvimento de parte desse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LEF), Beatriz Murizini Carvalho, Pedro Henrique Dias dos Santos, Jackeline Araújo Mota Siqueira, Tathianne Pastana, pelo aprendizado e boa convivência.

Ao secretário da Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, José Daniel Valle de Almeida, pelo auxílio sempre que solicitado, exemplo de profissional, e, até mesmo, pelas reclamações sempre em prol do nosso crescimento.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de plantas, pela dedicação e ensinamentos prestados durante essa jornada.

Ao meu esposo, Maurício de Oliveira Atayde, pela paciência e carinho durante os períodos de aflição!!

Aos membros da banca, pelas valiosas contribuições no sentido de aprimorar o trabalho.

Ao Dr. Francisco Rodrigues Freire Filho, meu orientador do mestrado, exemplo de ser humano e profissional, principal incentivador dessa conquista.

A todos aqueles que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para a concretização dessa etapa importante na minha vida.

Meu muito obrigada!!!!

## SUMÁRIO

RESUMO .....	viii
ABSTRAT .....	xi
1.INTRODUÇÃO .....	1
2.OBJETIVOS .....	3
3.CAPÍTULOS.....	4
3.1. ESPORULAÇÃO <i>in vitro</i> E VARIABILIDADE GENÉTICA DE <i>Asperisporium caricae</i> (SPEG.) MAUBL .....	4
3.1.1.INTRODUÇÃO .....	4
3.1.2.REVISÃO .....	5
3.1.2.1. A cultura do mamoeiro .....	5
3.1.2.2.Pinta-preta do mamoeiro.....	7
3.1.3.MATERIAL E MÉTODOS .....	13
3.1.3.1.Obtenção e manutenção de culturas monospóricas de <i>Asperisporium caricae</i> .....	13
3.1.3.2.Indução do crescimento e esporulação de <i>A. caricae</i> .....	15
3.1.3.2.1.Ensaio 1.Seleção de meios de cultura no crescimento micelial de <i>A. caricae</i> .....	15
3.1.3.2.2.Ensaio 2.Determinação de temperatura ótima de incubação para esporulação de <i>A. caricae</i> .....	18
3.1.3.2.2.1. Meio sólido .....	18
3.1.3.2.2.2. Meio líquido.....	19



3.1.3.2.3. Ensaio 3. Influência da temperatura na esporulação de <i>A. caricae</i>	19
3.1.3.3. Variabilidade genética de <i>A. caricae</i> por marcadores moleculares ISSR .....	19
3.1.3.3.1 Extração do DNA .....	19
3.1.3.3.2 Seleção dos iniciadores .....	21
3.1.3.4. Análises estatísticas .....	21
3.1.3.4.1. Produção de conídio por placa .....	21
3.1.3.4.2. Variabilidade genética de <i>A. caricae</i> por marcadores moleculares ISSR .....	21
3.1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	22
3.1.4.1. Indução do crescimento e esporulação de <i>A. caricae</i> .....	22
3.1.4.1.1. Ensaio 1. Seleção de meios de cultura no crescimento micelial de <i>A. caricae</i> .....	22
3.1.4.1.2. Ensaio 2. Determinação de temperatura ótima de incubação para esporulação de <i>A. caricae</i> .....	23
3.1.4.1.2.1. Meio sólido .....	23
3.1.4.1.2.2. Meio líquido .....	26
3.1.4.1.3. Ensaio 3. Influência da temperatura na esporulação de <i>A. caricae</i>	30
3.1.4.2. Variabilidade genética de <i>A. caricae</i> por marcadores moleculares ISSR .....	30
3.1.5. CONCLUSÕES .....	33
3.2. SELEÇÃO DE PROGÊNIES DE MEIOS-IRMÃOS DERIVADAS DE POPULAÇÕES CRIOULAS DE MAMOEIRO, VISANDO AO MELHORAMENTO PARA RESISTÊNCIA À PINTA-PRETA .....	34
3.2.1. INTRODUÇÃO .....	34
3.2.2. REVISÃO .....	36
3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS .....	39
3.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
3.2.5. CONCLUSÕES .....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	48

## RESUMO

OLIVEIRA, Cláudia Roberta Ribeiro de; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Setembro de 2015; RESISTÊNCIA DE MAMOEIRO A PINTA-PRETA E VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Asperisporium caricae* (SPEG.) MAUBL.. Orientador: Prof. Silvaldo Felipe da Silveira; Conselheiros: Prof. Messias Gonzaga Pereira e Prof. Gonçalo Apolinário de Souza Filho.

As doenças são um dos principais fatores limitantes à produção do mamoeiro destacando-se, no campo, a pinta-preta, causada pelo fungo *Asperisporium caricae*, principal doença fúngica foliar. No Brasil, a pinta-preta é comumente encontrada na maioria das lavouras de mamão, requerendo a aplicação frequente de fungicidas. Além de atacar severamente as folhas, incide nos frutos, predispondo-os a podridões em pós-colheita, inviabilizando sua comercialização. A resistência genética é a medida de controle mais indicada para a maioria das doenças de plantas, porém, no caso da pinta-preta, não existem variedades comerciais resistentes que viabilizem essa prática, sendo escassos estudos básicos, etiológicos e, também, genéticos, tanto por parte do hospedeiro, quanto do patógeno. Objetivou-se nesse trabalho: i) desenvolver protocolos de cultivo e multiplicação de inóculo conidial *in vitro* de *A. caricae*; ii) caracterizar a variabilidade genética de *A. caricae* por meio de marcadores moleculares (ISSR); iii) caracterizar e avaliar o potencial genético de genótipos crioulos de mamoeiro para fins de melhoramento visando à resistência à doença. Para atender ao primeiro objetivo, foram testados, inicialmente, 13 meios de

cultura sólidos e um isolados do fungo, UENF-AC20, incubando-se a temperatura de 25 °C e fotoperíodo 12 h. Os oito melhores meios para crescimento foram novamente testados para indução de esporulação *in vitro*. Para isto, os isolados UENF-AC6, UENF-AC20 e UENF-AC22 foram transferidos para os meios em placas de poliestireno de 60 mm de diâmetro e incubados a temperaturas de 17, 19, 21, 23°C, sob fotoperíodo 12h. A temperatura de 25 °C apenas favoreceu o crescimento das colônias, mas não a esporulação. A melhor temperatura para esporulação de *A. caricae* foi 19 °C, sob fotoperíodo 12h, nos meios Micophil, V8 e Milho, com avaliação feita aos 52 dias de incubação. Foi possível o cultivo *in vitro*, tendo sido obtidos conídios em quantidade suficiente para inoculação de *A. caricae* em mudas de mamoeiro para todos os isolados testados. Visando a atender ao segundo objetivo: foram testados 27 primers de ISSR, dos quais somente 2 foram polimórficos, o que não foi suficiente para discriminar a variabilidade genética de 30 isolados monospóricos de *A. caricae*, procedentes de 6 estados e de diferentes regiões do país. Não se observou relação entre região de origem dos isolados e grupos formados pelas análises de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean) com base no complemento do índice de Jaccard. Quanto à avaliação dos genótipos crioulos para resistência à pinta-preta, as plantas resultantes passaram por ciclo de avaliação quanto à resistência à doença, após serem submetidas à inoculação natural, em viveiro-telado (sob sombrite 50%). Como genótipo comparador resistente, utilizou-se o cv. Maradol. Foi utilizada uma planta por parcela e quatro plantas (repetições) por progênie (tratamentos), as quais foram arranjadas em delineamento em blocos casualizados. Foram avaliadas a incidência da pinta-preta em folhas, a severidade da doença na quinta e sétima folha, com auxílio de duas escalas diagramáticas, bem como a posição da folha, ao serem iniciados os primeiros sintomas, contada a partir do ápice das plantas. Foi feita análise de variância e as médias, comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Também foram estimados os parâmetros genéticos obtidos via distância de Mahalanobis dois agrupamentos: UPGMA e método de otimização de Tocher. Observou-se variabilidade genética entre os genótipos avaliados, com coeficiente de variação genotípico variando de 58,9 a 84,9. Observou-se também, pelo método UPGMA, que os acessos foram separados em seis grupos. As progênies PMI-1 e PMI-4 foram as mais resistentes, mas ficaram agrupadas

separadamente (grupos distintos) nos dois métodos de agrupamento. Isto indica que a expressão da resistência não foi constante para todas as variáveis consideradas no estudo e que ambas as progênies, PMI-1 e PMI-4, podem contribuir com diferentes mecanismos ou fenótipos de resistência, sendo consideradas promissoras para serem incluídas em programas de melhoramento genético, como fontes de resistência à pinta-preta. As duas progênies selecionadas obtiveram, numericamente, médias de doença inferiores ao cv. Maradol, comparador resistente.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Cláudia Roberta Ribeiro de; D.Sc.; State University of North Fluminense Darcy Ribeiro; 2015 September; PAPAYA RESISTANCE TO BLACK SPOT AND GENETIC VARIABILITY OF *Asperisporium caricae* (SPEG.) MAUBL. Adviser: Silvaldo Felipe da Silveira; Committee Members: Messias Gonzaga Pereira and Gonçalo Apolinário de Souza Filho.

The papaya crops in Brazil are strongly attacked by diseases, standing out in the field black spot (BS), caused by the fungus *Asperisporium caricae*, main foliar fungal disease. The BS attack is generalized in most of papaya crops in Brazil, forcing frequent application of fungicides. The BS attack results on necrotic lesion on leaves, and on fruits, favoring to rotting during post-harvest phase, making unfeasible its commercialization. Genetic resistance is the most appropriate BS control measure, but hindered by a lack of resistant commercial varieties, once there are few basic etiological and genetic studies on the host and on the pathogen. This paper aims to i) development of cultivation protocols and for *in vitro* conidial inoculum production of *A. caricae*; ii) characterize the genetic variability of *A. caricae* by molecular markers (ISSR); iii) characterize and evaluate the genetic potential of papaya landraces for breeding purposes to improve the genetic resistance to BS disease. To meet the first objective, 13 culture media and one isolates, UENF-AC20, were tested under temperature of 25°C and 12 h photoperiod for incubation. The eight best media for growth were selected after for *in vitro* sporulation induction. For this, the isolated UENF-AC6, UENF-AC20 and

UENF-AC22 were transferred to media in polystyrene plates of 60 mm diameter and incubated at temperatures of 17, 19, 21, 23°C, under 12h photoperiod. The temperature of 25 ° C only favored the growth of the colonies, but not the sporulation. The best temperature for sporulation of *A. caricae* was 19°C/12 h, photoperiod in Micophyl, V8 and corn meal medias, with evaluation performed after 52 d of incubation. It was possible *in vitro* culture and quantity sufficient of conidia for inoculation. There was no relationship between the source region of the isolated and groups based on the UPGMA cluster analysis (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean) with basis on dissimilarity Jaccard index. The cv. Maradol was used as comparator resistant genotype. One plant per plot and four plants (repetitions) per progeny (treatments) were arranged in a randomized block design. The next diseases variable were evaluated: incidence of BS on leaves, BS severity on the fifth and on the seventh leaves with the aid of two diagrammatic scales, and the leaf position to show BS initial symptoms, counted from the plant apex. Analysis of variance and mean comparison test by Scott-Knott grouping ( $\alpha = 5\%$ ) were proceeded. Genetic parameters were estimated and obtained via Mahalanobis distance two groupings: UPGMA and Tocher optimization method. There was detected genetic variability among the progenies for BS resistance, genotypic coefficient of variation ranging from 58.9 to 84.9. It also observed by the UPGMA method six groups of progenies according values of BS resistance. PMI-1 and PMI-4 progenies were the most resistant and have been grouped into different distinct and isolated groups, by both clustering method. This fact indicates that the strength of the expression is not equal for all variables considered in the study and that both progenies can contribute with different mechanisms or resistance phenotypes, being both considered promising for inclusion in an breeding program for improve BS resistance. The two selected progenies present averages below the standard BS resistant genotype (CV. Maradol) for most of the variables studied.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de mamão (FAO, 2013), sendo os estados da Bahia, Espírito Santo, Ceará e Rio Grande do Norte os principais produtores nacionais (IBGE, 2013). Notadamente, nas regiões produtoras de mamão, a ocorrência de doenças constitui fator limitante à produção (Martins et al., 2012). E a pinta-preta, causada pelo fungo *Asperisporium caricae* (Speg.) Maubl. do mamoeiro, destaca-se como a principal doença fúngica foliar (Rezende e Francelli, 1997).

A agressividade do patógeno exige controle constante desde o início da epidemia, pois, quando não controlada adequadamente, ela pode causar danos à lavoura e perdas na comercialização (Ventura et al., 2003). Perdas na comercialização, decorrentes de frutos contaminados, podem chegar a cerca de 30% (Santos e Barreto, 2003). O controle se baseia, sobretudo, na eliminação das folhas mais velhas infectadas pelo fungo e nas pulverizações com fungicidas nas épocas mais favoráveis à ocorrência da doença (Santana, 2004; Nogueira et al., 2011).

O controle de doenças por meio da resistência genética é a forma mais sustentável, porém ainda não existem variedades comerciais que possam ser recomendadas para esse fim. Vários estudos têm sido desenvolvidos na tentativa de identificar genótipos resistentes às principais doenças fúngicas foliares (Vivas et al., 2012; Vivas et al., 2013; Vivas et al., 2014; Vivas et al., 2015). No que se refere à pinta-preta, Dianese et al. (2007) relatam a existência de variabilidade

genética tanto nas folhas quanto nos frutos. Vivas et al. (2012; 2015) avaliaram progênies crioulas e também detectaram existência de variabilidade genética para a referida doença. Apesar dos avanços no estudo da resistência genética pela seleção de híbridos e genótipos resistente à pinta-preta, estudos voltados para o patógeno ainda são escassos.

O conhecimento da variabilidade genética do patógeno e da sua virulência bem como das reações dos genótipos de mamoeiro frente à inoculação por diferentes isolados do patógeno é de grande relevância para definir a melhor estratégia de melhoramento, visando a obter variedades com resistência durável.

Estudos genéticos da interação patógeno-hospedeiro requerem cultivo e produção de inóculo *in vitro*, para que possam ser conduzidas inoculações sob condições controladas de ambiente, para embasar o melhoramento visando à resistência à doença (Brunelli et al., 2006). Porém não existem trabalhos precedentes com o objetivo de estabelecer metodologias para produção de inóculo *in vitro* de *A. caricae* para selecionar ou identificar genótipos resistentes.

Dessa forma, nesse trabalho, buscou-se desenvolver metodologias de cultivo e produção de inóculo conidial para inoculação artificial de *A. caricae* em mamoeiro, avaliar a variabilidade genética de *A. caricae* pelo uso de marcadores moleculares e identificar fontes de resistência genética em germoplasma crioulo.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral:

a) Desenvolver estudos básicos para embasar o melhoramento do mamoeiro visando ao desenvolvimento de cultivares resistente à pinta-preta.

### 2.2. Objetivos específicos :

- a) Desenvolver protocolos de cultivo e de multiplicação de inóculo conidial *in vitro* de *A. caricae*;
- b) Estudar a variabilidade genética de *A. caricae* por marcadores moleculares ISSR;
- c) Caracterizar e avaliar o potencial genético de genótipos crioulos de mamoeiro para fins de melhoramento visando à resistência à pinta-preta.

### 3. CAPÍTULOS

#### 3.1. ESPORULAÇÃO *in vitro* E VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Asperisporium caricae* (SPEG.) MAUBL.

##### 3.1.1. INTRODUÇÃO

O mamoeiro, (*Carica papaya* L.), é uma das principais fruteiras tropicais mais consumidas no mundo, sendo seu cultivo predominante em regiões tropicais e subtropicais. Originário das Américas, sua distribuição se concentra principalmente na América Central e bacia Amazônica superior, onde ocorre a maior diversidade genética (Badillo, 2002).

O mamão ocupa posição de destaque no cenário da fruticultura nacional, sendo a sétima fruta *in natura* mais exportada no país (Agriannual, 2011). Entretanto, as doenças têm sido fator limitante à sua produção. Entre os principais fatores responsáveis pela redução da produção do mamão, pode-se destacar a pinta-preta do mamoeiro, causada pelo fungo *Asperisporium. Caricae* (Speg.) Maubl. (Dantas et al., 2002; Santos Filho et al., 2007; Rezende e Francelli, 1997).

A infecção causada pelo *A. caricae* tem como principal problema a redução da área fotossintética, podendo ter efeito direto na produção, além de depreciar o valor comercial do fruto (Adikaram e Wijepala, 1995). A doença

apresenta expressiva importância econômica, provocando danos no desenvolvimento da planta, por reduzir a superfície fotossintética da folha, em razão do grande número de lesões necróticas de coloração escura. Nos frutos, embora os sintomas sejam superficiais, as lesões os tornam inadequados à comercialização, predispondo-os a podridões na pós-colheita (Rezende e Martins, 2005).

A pinta-preta está disseminada em várias regiões do Brasil e do mundo (Cumagun e Padilla, 2007; Meeboon et al., 2007; Silva, 2010; Souza et al., 2014).

O mamoeiro é caracterizado por apresentar baixa variabilidade genética. As variedades crioulas podem ser usadas em programas de melhoramento para ampliar a base genética (Neitzke et al., 2009). O controle de doenças feito por meio de genótipos resistentes é o mais indicado para a grande maioria das espécies de plantas (Brunelli et al., 2006). O conhecimento da variabilidade genética do patógeno é muito importante para adotar estratégias de controle da doença. Entretanto, a variabilidade de *A. caricae* não é conhecida.

Os programas de melhoramento visando à resistência à pinta-preta têm enfrentando problemas na tentativa de selecionar/identificar materiais resistentes, uma vez que não existem metodologias para produção de inóculo *in vitro* de *A. caricae*. Dessa forma, estudos sobre a influência do meio de cultura, temperatura e luz entre outros fatores sobre o crescimento micelial e a esporulação de *A. caricae* fazem-se necessários. Diante do exposto, objetivou-se, com esse trabalho: a) desenvolver protocolo de cultivo e de multiplicação de inóculo conidial *in vitro* de *A. caricae*, agente causal da pinta-preta; b) estudar a variabilidade genética do fungo *A. caricae*, isolado de folha de mamoeiro, coletado em várias regiões do país, por meio de marcadores moleculares.

### 3.1.2 REVISÃO

#### 3.1.2.1. A cultura do mamoeiro

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é originário da América tropical, de onde foi disseminado para várias regiões do mundo. Ele pertence à classe das

Dicotyledoneae, ordem Violales, família Caricaceae, gênero *Carica*, espécie *Carica papaya* L., a única que tem valor comercial (Dantas et al., 2002).

Segundo Badillo (2001), a família *Caricaceae* compreende seis gêneros e 35 espécies, assim distribuídas: Gênero *Cylicomorpha*, com duas espécies; *Jacaratia*, com sete espécies; *Horovitzia*, com uma espécie; *Jarilla*, com três espécies; *Vasconcellea*, com 21 espécies; e *Carica*, com uma espécie.

O mamoeiro, quando cultivado sob regime de sombra, apresenta, entre outros problemas, redução do tamanho da planta, da área foliar e da produção. Sua produtividade pode ser ainda bastante comprometida quando cultivado em temperaturas acima de 30°C. Dessa forma, a planta apresenta para seu bom crescimento preferência por regiões de temperaturas amenas, sendo a faixa ótima entre 22°C e 26°C (Dantas e Castro Neto, 2000).

O número de genótipos cultivados nas principais regiões produtoras é limitado a 4 cultivares, pertencendo a dois grupos: Solo e Formosa. No grupo Solo, as cultivares Golden e Sunrise solo, e no grupo Formosa, Calimosa e Tainung 01 são as mais cultivadas. As cultivares do grupo Solo têm maior endogamia, seus frutos são pequenos, com aproximadamente 0,35 a 0,70 kg, sendo destinados parte para o mercado interno, mas, principalmente, para o mercado externo. As principais cultivares do grupo 'Formosa' são genótipos híbridos. Suas sementes são importadas e produzem frutos de maior tamanho, normalmente, apresentado mais de 1,0 kg, sendo destinados, sobretudo, ao mercado interno (Serrano e Cattaneo, 2010). Os municípios de Pinheiros - ES, Prado - BA e Porto Seguro - BA são os maiores produtores de mamão do grupo 'Formosa' (principalmente o híbrido importado 'Tainung 01'). Linhares - ES e Sooretama - ES são os maiores produtores de mamão do grupo 'Solo' (principalmente 'Golden' e 'Golden THB' para exportação e 'Sunrise Solo' para o mercado nacional) (Serrano e Cattaneo, 2010).

No cultivo de mamoeiros híbridos do grupo 'Formosa', em cada plantio, o produtor necessita adquirir novas sementes, fato que eleva o custo de produção (Serrano e Cattaneo, 2010). Entretanto, esse cenário foi mudado com o lançamento do híbrido Uenf/Calima 01. E Em 2010, O Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER) lançou a cultivar 'Rubi INCAPER 511', pertencente ao grupo 'Formosa', de polinização aberta, possibilitando aos produtores produzir suas próprias sementes. Em diversas

avaliações, a cultivar 'Rubi INCAPER 511' apresentou produtividade e qualidade de frutos semelhantes ao principal genótipo de mamoeiro 'Formosa' cultivado no Estado, o híbrido 'Tainung 01', frutos com casca de coloração verde-escura, polpa vermelho-alaranjada, peso médio de 1,47 kg, polpa suave e sólidos solúveis totais de 10,2°Brix

A produção do mamão no mundo representa 10% da produção mundial de frutas tropicais, o que equivale a 8 milhões de toneladas, das quais 39% são produzidas na América Latina e Caribe (FAO, 2013). No Brasil, em 2008, foram produzidas 1,9 milhão de toneladas em 36,5 mil hectares, com valor da produção estimado em R\$ 1 bilhão (IBGE, 2011). Brasil, México, Índia e Nigéria destacam-se como os maiores produtores mundiais. Juntamente com México, Malásia e Estados Unidos, o Brasil se situa entre os principais países exportadores de mamão, principalmente para o mercado europeu (Souza, 2007). No Brasil, os principais produtores são os Estados da Bahia (902 mil toneladas), Espírito Santo (630 mil toneladas), Rio Grande do Norte (106 mil toneladas) e Ceará (100 mil toneladas). A Bahia e o Espírito Santo somam 70,3% dos cultivos nacionais de mamão (Agrarianual, 2011). No quesito exportações, o Estado do Espírito Santo responde por 50% do total (Serrano e Cattaneo, 2010).

A fruta é bastante cultivada e consumida, tanto pelo seu sabor agradável quanto pelo seu valor nutritivo e pelas suas várias propriedades farmacológicas (Oliveira e Vitória, 2011). A fruta madura é fonte de cálcio, excelente fonte de vitaminas A e C e auxilia no processo digestivo. Embora seu consumo seja quase completamente na forma *in natura* (Souza et al., 2005), a fruta do mamoeiro pode ser consumida cristalizada, seca ou em sucos. O fruto verde é usado na produção de papaína, uma enzima proteolítica utilizada nas indústrias têxteis, farmacêutica e de alimento (Dantas, 2000).

### **3.1.2.2. Pinta-preta do mamoeiro**

Entre as principais doenças fúngicas foliares que atacam o mamoeiro, pode-se destacar a pinta-preta, causada pelo fungo *A. caricae*.

A pinta-preta do mamoeiro é uma das doenças fúngicas mais importantes da cultura, ocasionando perdas consideráveis na produção. Apesar da

importância da doença, estudos etiológicos básicos são escassos. É causada pelo fungo *A. caricae* e se caracteriza por apresentar estroma subepidérmico com 60 x 200 µm; conidióforos fasciculados, eretos e septados; conídios piriformes ou oblongos, escuros, quinulados e bicelulares (Rezende e Francelli, 1997).

Os sintomas ocasionados pelo fungo podem ser observados tanto nas folhas quanto nos frutos. As folhas do mamoeiro, quando infectadas por este fungo, apresentam sintomas característicos na face superior como manchas normalmente circulares, pequenas, de coloração pardo-clara, circundadas por um halo amarelo, tornando-se, posteriormente, necróticas. Na face inferior, na região correspondente à lesão, há formação da frutificação escura e pulverulenta do fungo. Nos frutos, os sintomas podem se manifestar quando ainda pequenos e verdes (Rezende e Martins, 2005). Além disso, a doença pode depreciar o valor comercial do fruto e favorecer a infecção por patógenos pós-colheita (Ventura et al., 2003).

Em 2000, no Estado da Bahia, em uma única propriedade, a pinta-preta do mamoeiro tornou imprópria para comercialização cerca de 1000 t de frutos (Liberato e Zambolim, 2002). Já em São Paulo, em decorrência de frutos contaminados, as perdas na comercialização atingiram cerca de 30% da produção (Santos e Barreto 2003). Como consequência da doença, pode haver diminuição da área fotossintética, reduzindo a produção, e também pode resultar na queda prematura dos frutos quando infectados ainda jovens (Adikaram e Wijepala, 1995). Folhas muito atacadas pela doença tendem a senescer mais rapidamente e caem no chão, constituindo fonte de inóculo para novas infecções (Adikaram e Wijepala, 1995).

A ocorrência do fungo *A. caricae* infectando plantas de mamoeiro (*C. papaya* L.) é relatada em diferentes regiões do Brasil e do mundo. A ocorrência desse fungo em mamoeiro foi descrita pela primeira vez nas Filipinas (Cumagum e Padila, 2007), Tailândia (Meeboon et al., 2007) e Sri Lanka (Adikaram e Wijepala, 1995). No Brasil, a doença foi descrita pela primeira vez por Maublan em 1913, no Rio de Janeiro. E desde então, sua ocorrência vem sendo descrita em vários Estados do país, como Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Santa Catarina, Bahia (Silva, 2010), Rio Grande do Norte e, mais recentemente, no Estado do Amazonas (Souza et al., 2014). Acredita-se que este fungo ocorra praticamente em todas as regiões do Brasil onde se produz mamão

(*C. papaya* L.), causando perdas qualitativas e quantitativas à produção e sérios prejuízos aos produtores.

Suzuki et al. (2007), estudando o progresso de doenças fúngicas e variáveis climáticas em mamoeiro, observaram que o desenvolvimento da pinta-preta é favorecido por temperaturas variando entre 25° C e 30° C e umidade relativa variando de 80% a 100%. Além disso, o ponto máximo da intensidade da doença ocorreu de novembro a março. Segundo Adikaram e Wijepala (1995), a doença é mais severa nos períodos úmidos. Além da pluviosidade, existe alta correlação entre incidência da doença e umidade relativa do ar (Martelleto et al., 2009). Na época das chuvas, quando os sintomas da doença tendem a se intensificar, recomenda-se o controle imediato por meio de pulverização com fungicidas (Zambolim et al., 2006).

Dependendo da região e das condições climáticas, são exigidas, normalmente, pulverizações semanais de fungicidas para um controle eficiente da pinta-preta. Porém, as pulverizações podem ser reduzidas se forem feitos o monitoramento e as aplicações em épocas favoráveis, com base nos dados de clima (Santos Filho et al., 2007; Oliveira et al., 2009).

Na literatura, não há relatos de genótipos de mamoeiro (*C. papaya* L.) imunes à pinta-preta. Dessa forma, as principais medidas de controle da doença são: eliminação de fontes de inóculo e aplicação de fungicidas. Trabalhos têm sido desenvolvidos para investigar a eficiência de diferentes fungicidas no controle da pinta-preta (Barreto et al., 2011; Nogueira et al., 2011). Entretanto, além de a aplicação de fungicida ser uma prática onerosa, causa danos ao meio ambiente e ao ser humano e, dependendo da quantidade encontrada no fruto, poderá inviabilizar sua comercialização no país e sua exportação, uma vez que tem sido exigida comprovação da qualidade das frutas por meio de certificação mediante controle e fiscalização permanente de toda cadeia produtiva no país produtor e exportador. Por outro lado, estudos têm sido desenvolvidos como alternativa para o controle dessa doença, como, por exemplo, o uso de indutores de resistência (Dianese et al., 2008).

A utilização de genótipos resistente é a forma mais eficiente e desejada para o controle dessa doença. Embora não haja relatos de genótipos de mamoeiro imunes à pinta-preta, alguns trabalhos comprovam a existência de

variabilidade genética quanto à resistência para esta doença (Vivas et al., 2011; Vivas et al., 2012).

Dianese et al. (2007), avaliando a reação, em condições de telado, dos genótipos 'NT Red', 'Golden', 'Baixinho de St. Amália', 'Sunrise Solo', 'Cross Paris', 'Tailândia Verde', 'Tailândia Roxo', 'Tailândia Roxão', 'Sekati' e 'Tainung-1' à pinta-preta, observaram que o genótipo 'Sekati' foi o que apresentou menor valor médio final para severidade da pinta-preta nas folhas, enquanto 'Golden' e 'NT Red' apresentaram os maiores valores. Já nos frutos, além do 'Sekati', os melhores valores foram apresentados pelos genótipos 'Tailândia Roxão' e 'Tailândia Verde' e, os piores valores, pelos genótipos 'Tailândia Roxo', 'Cross Paris' e 'Sunrise Solo'.

Vivas et al. (2011), em estudos voltados para orientação de futuros cruzamentos visando à resistência à doença, inclusive para pinta-preta, empregando o uso de testadores, identificaram que os melhores cruzamentos derivaram do cruzamento do testador 'JS 12' com 'Sunrise Solo' e 'Kapoho Solo PV', do testador 'Americano' com 'Caliman M5', 'Sunrise Solo', 'Baixinho de Santa Amália' e 'Waimanalo', e do testador 'Maradol' com 'Caliman G', 'Caliman AM' e

Vivas et al. (2010) elaboraram e validaram uma escala diagramática com o objetivo de avaliar a severidade de pinta-preta em frutos de mamoeiro. Segundo os autores, a escala permite a análise de levantamento de campo, estudos de progresso e disseminação da doença e a realização de controle da doença nos frutos em pré e pós-colheita.

Segundo Moraes et al. (2011), a vulnerabilidade de genótipos de mamoeiro à doença ocorre em razão da baixa variabilidade genética dos materiais e da continuidade temporal e espacial dos cultivos. Dessa forma, têm sido buscadas alternativas para ampliar e estudar a variabilidade da espécie resistente à pinta-preta do mamoeiro (Vivas et al., 2012).

A obtenção do patógeno em cultura pura é essencial em estudos de morfologia, taxonomia, reprodução e fisiologia, bem como em testes de patogenicidade, resistência genética de plantas e sensibilidade a fungicidas.

A metodologia de isolamento do patógeno é uma etapa de extrema importância para o estudo e cultivo do patógeno. Wolcam et al. (2006) usaram algumas metodologias para isolar *Asperisporium alstroemeriae*, entretanto, apenas uma delas deu certo, e o fungo assim como *A. caricae* se



desenvolveram lentamente. Porém, para obter esporulação de *A. alstroemeriae*, cultivado *in vitro*, o tempo é bem mais reduzido, entre 20 a 25 dias. As colônias com 35 dias de incubação apresentaram apenas 3 mm de diâmetro e com 4 meses apresentam 8 mm de diâmetro. Este fungo, em condições de casa de vegetação, consegue esporular com temperaturas entre 17 e 23 °C.

A grande maioria dos estudos fitopatológicos requer o cultivo do patógeno, sobretudo, para produção de propágulos infectivos, necessários ao estudo de taxonomia e genética. Dessa forma, condições ambientais como meio de cultura, temperatura, luz, aeração e idade das colônias utilizadas são fatores determinantes para crescimento e esporulação desses microrganismos. Diferentes combinações de meio de cultura e temperatura são usadas para esporulação de diferentes espécies de fungos fitopatogênicos (Carnaúba et al., 2007; Pulz e Massola, 2009). Segundo Brunelli et al. (2006), a temperatura e a luminosidade estão entre os principais agentes físicos capazes de induzir ou inibir o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo da maioria dos fungos.

Grande parte dos fungos hifomicetos, patógenos foliares cultiváveis, esporulam *in vitro* em meios de decocção de vegetais e em meio V8 ou BDA, no período de 1 a 2 semanas, entre eles *Cercospora* spp (Brunelli et al., 2006; Koshikumo, 2011;), *Alternaria dauci* e *Alternaria solani* (Pulz e Massola, 2009). Entretanto, no caso de fungos do gênero *Asperisporium*, os únicos trabalhos que mencionam esporulação relatam que esse período pode variar de 3 semanas a 4 meses e meio (Wolcam et al., 2006; Minnis et al., 2011 e Silva, 2010)

Para a maioria das culturas e espécies de plantas cultivadas, recomenda-se que o controle de doenças seja feito por genótipos resistentes (Brunelli et al., 2006). Porém, no caso de doenças causadas por fungos foliares, a dificuldade de cultivo e a produção de inóculo *in vitro* do patógeno limitam os estudos básicos na identificação de genótipos resistentes (Camera et al., 2014). Por isso, o entendimento dos requerimentos nutricionais e ambientais que influenciam o crescimento e a esporulação destas espécies é de grande importância (Griffin, 1994; Brunelli et al., 2006).

Os programas de melhoramento visando à resistência à pinta-preta na cultura do mamoeiro têm enfrentado grandes dificuldades na tentativa de selecionar/identificar materiais resistentes, uma vez que ainda não estão estabelecidas metodologias para produção de inóculo *in vitro* de *A. caricae*. A

literatura disponível sobre a biologia do fungo *A. caricae* é escassa, a maioria dos trabalhos se limitando à aplicação de fungicida e à avaliação de genótipos em condições de campo, sob inoculação natural (Dianese et al., 2008; Vivas, 2009; Vivas et al., 2012). A limitação de trabalhos em condições de laboratório com esse patossistema se deve a dificuldades do isolamento, manutenção e esporulação dos isolados (Silva, 2010; Minnis et al. 2011). Estudos sobre a influência do meio de cultura, temperatura, comprimento de onda da luz utilizada entre outros fatores sobre o crescimento micelial e a esporulação de *A. caricae* fazem-se necessários. Ademais, fungos são pleomórficos, e as exigências de cultivo variam em função das fases, se vegetativa (crescimento micelial) ou se reprodutiva (esporulação). O conhecimento das exigências do microorganismo quanto à temperatura ótima de crescimento é fundamental para otimização do seu cultivo *in vitro*. (Zauza et al., 2007). Entretanto, a esporulação, muitas vezes, é produzida sob condições adversas ao crescimento vegetativo (Dhingra e Sinclair, 1994).

Apesar da ampla distribuição da pinta-preta do mamoeiro, a variabilidade genética do patógeno não é conhecida. O conhecimento da variabilidade genética da população do patógeno é um importante elemento para os programas de melhoramento genético de plantas que visam à resistência à doença, pois gera informação sobre o nível e a distribuição da variabilidade genética dos isolados existentes em uma população ou região. Populações de fungos com alto nível de diversidade genética são difíceis de ser controladas via resistência genética, uma vez que podem rapidamente produzir novas raças fisiológicas virulentas na planta dita resistente. A quantificação da diversidade genética de fungos patogênicos auxilia no planejamento de estratégias de seleção e de melhoramento mais eficazes que venham a maximizar a vida útil da resistência genética (Carlier et al., 2003).

As ferramentas moleculares têm auxiliado no estudo de diversidade genética em nível de DNA. Diferentes marcadores moleculares têm sido utilizados para detectar variabilidade genética em diferentes espécies de fungos (Rivas et al., 2004; Groenewald et al., 2007; Cardoso e Wilkinson, 2008; Halkett et al., 2010; Roberts et al., 2010; Bentes e Costa Neto, 2011, Silva et al., 2010). Os marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) amplificam a sequência de DNA, delimitada por duas regiões microssatélites, orientadas em direções opostas

(Reddy et al., 2002). Comportam-se como marcadores dominantes, seguindo o padrão de herança mendeliana simples (Gupta et al., 1994). Tem como vantagem não requerer informação prévia da sequência de DNA do organismo em estudo. Variabilidade genética em algumas espécies do gênero de *Mycosphaerella* tem sido detectada por marcadores ISSR (Pereira et al., 2010; Simón et al., 2012). Entretanto, o emprego de marcador molecular no estudo da variabilidade genética de *A. caricae* até o presente não foi encontrado na literatura

### 3.1.3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1.3.1. Obtenção e manutenção de culturas monospóricas de *A. caricae*

Os isolados monospóricos de *A. caricae* foram obtidos por meio de isolamento direto a partir da germinação de um único conídio. Para tanto, folhas de mamoeiro, verdes e dessecadas, apresentando sintomas de pinta-preta e com ausência de hiperparasitas, foram coletadas em diferentes regiões do país, a saber: Bahia, Rio Grande do Norte, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais e São Paulo, totalizando 30 coletas, que resultaram nas culturas puras (Tabela 1). As coletas foram feitas entre agosto de 2012 e dezembro de 2013.

Para o isolamento monospórico, foi adicionada, com auxílio de uma pipeta, uma gota de água destilada estéril na lesão presente na folha a fim de diluir a concentração de esporos. Essa gota contendo os esporos foi ressuspensa e transferida para um frasco de injeção contendo mais água destilada estéril. A diluição prosseguiu até o ponto em que foi possível verificar o isolamento de um único conídio. Após a diluição, algumas gotas da solução foram transferidas para lâminas de microscopia revestida por uma fina camada de ágar a 2% e, em seguida, espalhadas com auxílio de uma espátula de Drigalsky. As lâminas foram colocadas dentro de placas de Petri e levadas para BOD com temperatura  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , por um intervalo de 24 a 48 horas, para germinação dos conídios. Posteriormente, com auxílio da microscopia óptica, transferiu-se um único conídio germinado para tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA.

As culturas foram mantidas em tubos de ensaio, incubadas em câmara de crescimento (BOD) a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , com regime de 12h/luz/escuro, com réplicas mantidas a temperatura ambiente entre 23 a  $27^{\circ}\text{C}$ . Com aproximadamente 45 dias após os isolamentos, foram feitas as repicagens dos fungos, dos tubos para placas de Petri contendo BDA. Para preservação das culturas monospóricas obtidas, as colônias foram mantidas em tubos de ensaio contendo BDA e, sempre que necessário, repicadas, periodicamente, para placas de Petri e para novos tubos contendo o mesmo tipo de meio de cultura.

**Tabela 1.** Relação dos isolados monospóricos de *A. caricae* e procedência das amostras foliares utilizadas na obtenção das culturas puras. Campos dos Goytacazes, UENF, 2015.

<b>Isolados</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Procedência/Ano</b>
<b>Nordeste</b>		
UENF-AC1	H26-60	Cruz das Almas/BA/2013
UENF-AC2	H33-45	Cruz das Almas/BA/2013
UENF-AC3	H36-56	Cruz das Almas/BA/2013
UENF-AC4	L10	Cruz das Almas/BA/2013
UENF-AC5	L26	Cruz das Almas/BA/2013
UENF-AC6	Tainnung	Mossoró/RN/2013
UENF-AC7	Golden	Mossoró/RN/2013
<b>Sudeste</b>		
UENF-AC8	Não identificado	Alegre/ES/2012
UENF-AC9	Não identificado	Búzios/RJ/2013
UENF-AC10	Não identificado	Cachoeiro de Macacu/RJ/2012
UENF-AC11	Não identificado	Colatina/ES/2012
UENF-AC12	Não identificado	Duque de Caxias/RJ/2013
UENF-AC13	Golden	Linhares/ES/2012
UENF-AC14	Não identificado	Ibiraçu/ES/2013
UENF-AC15	Não identificado	Itaocara/RJ/2012
UENF-AC16	Não identificado	Ituverava/SP/2013
UENF-AC17	Não identificado	Janaúba/MG/2013
UENF-AC18	JS 12	Linhares/ES/2013

Tabela 1, Cont.

<b>Isolados</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Procedência/Ano</b>
UENF-AC19	Não identificado	Mimoso/ES/2012
UENF-AC20	Não identificado	Rincão/SP/2013
UENF-AC21	Não identificado	Alegre/ES/2012
UENF-AC22	Não identificado	Rio Bonito/RJ/2013
UENF-AC23	Não identificado	Mimoso/ES/2012
UENF-AC24	Não identificado	Roseira da Limeira/MG/2013
UENF-AC25	Não identificado	Campos dos Goytacazes/RJ/2013
UENF-AC26	Não identificado	Mimoso/ES/2012
<b>Sudeste</b>		
UENF-AC27	Tainnung	Linhares/ES/2013
UENF-AC28	19	Linhares/ES/2013
UENF-AC29	SS 72/12	Linhares/ES/2013
UENF-AC30	Golden	Campos dos Goytacazes/RJ/2013

### 3.1.3.2. Indução do crescimento e esporulação de *A. caricae*

#### 3.1.3.2.1. Ensaio 1. Seleção de meios de cultura para o crescimento micelial de *A. caricae*

Foram testados 13 meios de cultura para promover o crescimento micelial de *A. caricae*: água de coco (AC); aveia + folha de mamão (AFM); beterraba; batata + dextrose + ágar (BDA); cenoura; batata + cenoura + ágar (BCA); extrato de tomate (ET); extrato de tomate + folha de mamão (ETFM); folha de mamão + casca de mamão (FMCM); micophil; milho; cenoura + batata + beterraba (CBB) e V-8; (Tabela 2). O isolado utilizado foi UENF-AC20. O delineamento utilizado foi em blocos inteiramente casualizados com 4 repetições.

Fragmentos miceliais do isolado UENF-AC20 foram transferidos para tubos de microcentrifuga (1,5 mL) esterilizados, contendo água destilada estéril e estreptomicina (Johnston e Booth, 1983) e, em seguida, macerados com auxílio de pistilo. Os fragmentos miceliais macerados foram espalhados nas placas de Petri de plástico (90 mm) nos diferentes meios de cultura citados acima.

Observou-se, após 40 dias de incubação, o crescimento das colônias, nos diferentes meios de cultura.

**Tabela 2.** Meios de cultura e suas composições para promoção do crescimento de *A. caricae*. Campos dos Goytacazes, UENF, 2015.

<b>Meio de cultura</b>	<b>Composição</b>
1-Água de coco (AC)	1000 ml de água de coco natural 20 g de dextrose 17 de ágar
2-Aveia + folha de mamão (AFM)	60 g de aveia 45 g de folha de mamão 20 g de dextrose 17 de ágar 1000 ml de água destilada*
3-Beterraba	200 g de beterraba 20 g de dextrose 17 g de ágar 1000 ml de água destilada*
4- Cenoura + batata + beterraba (CBB)	100 g de batata 100 g de cenoura 100 g beterraba 20 g de dextrose 17 de ágar 1000 ml de água destilada*
5-BDA	200 g de batata 20 g de dextrose 17 g de ágar 1000 ml de água destilada*
6-Cenoura	200 g de cenoura 20 g de dextrose 17 g de ágar 1000 ml de água destilada*
7-Batata +Cenoura+ Agar (BCA)	100 g de cenoura

Tabela 2, Cont.

<b>Meio de cultura</b>	<b>Composição</b>
	100 g de batata
	20 g de dextrose
	17 g de ágar
	1000 ml de água destilada*
8-Extrato de tomate (ET)	200 ml de extrato de tomate
	3 g de CaCO <sub>3</sub>
	1000 ml de água destilada*
9-Extrato de tomate + folha de mamão (ETFM)	200 ml de extrato de tomate
	40 g de folha
	3 g de CaCO <sub>3</sub>
	20 g de dextrose
	17 g de ágar
	1000 ml de água destilada*
10-Folha de mamão + casca de mamão (FMCM)	40 g de folha de mamão
	130 g casca de mamão
	20 g de dextrose
	17 g de ágar
	1000 ml de água destilada*
11- Milho	30 g de fubá
	20 g de dextrose
	17 g de ágar
	1000 ml de água destilada*
12-Micophil	30 g de extrato farelo de soja
	20 g de dextrose
	17 g de ágar
	1000 ml de água destilada*
13-Suco de vegetais V8 Campbell's (V-8)	200 ml de suco V8
	3 g de CaCO <sub>3</sub>
	17 g de ágar
	1000 ml de água destilada*

\* = Quantidade suficiente para completar 1000 ml de água destilada

As culturas em placas foram mantidas em câmara de crescimento a  $25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ , com fotoperíodo 12 h luz/12 h escuro, por um período de 40 dias. Após a identificação dos melhores meios para promoção do crescimento micelial, ou seja, os meios em que o fungo conseguiu crescer, foram feitos novos ensaios na tentativa de promover a esporulação, já que, inicialmente, nas condições testadas, não houve conidiogênese.

### **3.1.3.2.2. Ensaio 2. Determinação da temperatura ótima de incubação para esporulação de *A. caricae***

#### **3.1.3.2.2.1. Meios sólidos**

Identificados os melhores meio de cultura para o crescimento micelial de *A. caricae*, foram testadas as seguintes temperaturas de incubação: 17, 19, 21 e 23 °C. Nesta etapa, foram avaliados os seguintes meios de cultura sólidos: água de coco (AC); aveia + folha de mamão (AVFM); batata + dextrose + ágar (BDA), V-8; micophil; milho; cenoura + batata + beterraba (CBB); folha de mamão + casca de mamão (FMCM) e os isolados UENF-AC6, UENF-AC20 e UENF-AC22 do patógeno.

Os isolados utilizados foram provenientes de diferentes regiões a fim de se detectar variação quanto às exigências térmicas para seu crescimento e esporulação. Foram utilizadas culturas velhas, com cerca de aproximadamente dois meses, mantidas em placas de Petri com BDA. Fragmentos miceliais dos diferentes isolados foram transferidos separadamente para dentro de tubos de microcentrífuga esterilizados, contendo água destilada estéril e estreptomicina (Johnston e Booth, 1983), em seguida, macerados com auxílio de um pistilo. O macerado (400 µl) foi espalhado com auxílio de alça de Drigalsky em placas de Petri de poliestireno (60 mm de diâmetro), contendo os meios de cultura citados acima. O experimento foi delineado em blocos casualizados e analisado em esquema fatorial (8 meios x 4 temperaturas x 3 isolados), com 4 repetições, cada repetição formada por quatro placas

Avaliaram-se, após 52 dias de incubação, a coloração das colônias e a quantidade de esporos produzidos em cada placa. Para isso, adicionaram-se 2



mL de água destilada estéril, acrescidos de 1 gota (20µl) de Tween 20 às placas de Petri. As placas foram mantidas em repouso por 15 min e, em seguida, foi feita a raspagem com o auxílio de um pincel de cerdas macias para desprendimento dos esporos. Procedeu-se à contagem de esporos no hemacitômetro.

#### **3.1.3.2.2. Meios líquidos**

Os meios 2, 4, 5, 10, 11, 12 e 13 da Tabela 2, além dos meios com extrato de folha seca de mamão – (EFS) e Czapek, todos sem a adição do ágar, foram utilizados na tentativa de induzir a esporulação de *A. caricae* em meio na forma líquida. O meio EFS foi composto por 10 g de folha seca de mamão triturada, 10 g de dextrose e 500 ml de água destilada. E o meio Czapek foi composto por: 30 g de sacarose; 2 g de NaNO<sub>3</sub>; um 1 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,5 g de kCL; 0,01 g de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 15 g de ágar; e 1000 ml de água. Neste ensaio, foi utilizado o isolado UENF-AC23..

#### **3.1.3.2.3. Ensaio 3. Influência da temperatura na esporulação de *A. caricae***

Os isolados UENF-AC1, UENF-AC2, UENF-AC11, UENF-AC12, UENF-AC15, UENF-AC20 e UENF-AC30 foram cultivados por cerca de dois meses em duas condições de incubação: (1) em BOD, a 19°C, com fotoperíodo 12 h; (2) sob bancada, com temperatura variando de 30 a 32°C, sob iluminação do laboratório (luz branca-fria fluorescente). Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado, com 2 placas para cada isolado e tratamento. Avaliou-se, além da produção de conídios, o efeito da incubação na morfologia, coloração das colônias em meio BDA..

#### **3.1.3.3. Variabilidade genética de *A. caricae* por marcadores moleculares ISSR**

##### **3.1.3.3.1. Extração do DNA**

Os 30 isolados monospóricos utilizados na extração foram cultivados em meio BDA a 25°C por 20 dias. O DNA genômico de cada isolado foi extraído

usando o kit *Wizard Genomic DNA Purification*, segundo Pinho et al. (2012; 2013). O DNA foi quantificado no espectrofotômetro *Nano Drop® 2000c* (*Thermo Scientific®*). Foram avaliadas a concentração e a qualidade do DNA em gel de agarose a 1%, utilizando o marcador *High DNA Mass Ladder* da *Invitrogen*, corada com a mistura de *Blue Juice 6X* com *GelRed™*, na proporção de 1:1. As imagens foram visualizadas pelo sistema de fotodocumentação *MiniBis Pro* (*Bio-Imaging Systems*). Padronizou-se a concentração do DNA para 5ng/μl em todas as amostras, que foram armazenadas a -20 °C.

As reações de amplificação de DNA foram feitas em um volume final de 13 μL por reação, contendo 6,58 μL de água ultrapura, 1,3 μL de tampão de reação 10X, 0,5 μL de MgCl<sub>2</sub> a 50mM, 1,5 μL de dNTP a 2mM, 1 μL de primer a 5 μM, 0,12 μL de Taq DNA polimerase (5U/μL) e 2 μL de DNA (5 ng/μL). Foi utilizado um programa de 40 ciclos, segundo as condições de temperaturas e tempo que seguem: 94°C durante 4 min (desnaturação inicial do DNA); 94°C por 1 min (desnaturação cíclica), temperatura específica de anelamento de cada iniciador em °C, por 1 min (anelamento); 72°C por 3 min (extensão cíclica) e, posteriormente, 72°C por 7 min (extensão final). Os primers foram submetidos a um gradiente de temperatura para identificar a melhor temperatura de amplificação (Tabela 3)

**Tabela 3.** Temperaturas de anelamento usadas para cada primer de ISSR. Campos do Goytacazes, UENF, 2015.

Temperatura de anelamento	Primers
42°C	(CT) <sub>8</sub> RG; (GA) <sub>8</sub> C; (AG) <sub>8</sub> YA; (GACA) <sub>4</sub> ; (GGAT) <sub>4</sub> ; (AG) <sub>8</sub> T; (CAC) <sub>3</sub> ; (GGAT) <sub>3</sub> ; (ATG) <sub>6</sub> G; (AG) <sub>7</sub> GC; (GAA) <sub>6</sub> ;
44°C	(GAGA) <sub>6</sub> CC; (CAC) <sub>3</sub> GC
46°C	(GT) <sub>6</sub> CC; (GGAT) <sub>3</sub> GA; (ATC) <sub>6</sub> C; (CT) <sub>8</sub> A; (GA) <sub>8</sub> YC
48°C	(AC) <sub>8</sub> CT; (AG) <sub>8</sub> YC
50°C	(AG) <sub>8</sub> YT; (GAA) <sub>6</sub> AA; (ATC) <sub>6</sub> ; (GGGGT) <sub>3</sub> G
52°C	(AC) <sub>8</sub> CG; (AG) <sub>8</sub> C; (GA) <sub>8</sub> YG.

### 3.1.3.3.2. Seleção dos Iniciadores

A princípio, foi feita uma triagem com 40 primers. Destes, 27 primers foram selecionados por apresentarem boa amplificação, a saber: (GAGA)<sub>6</sub>CC; (GT)<sub>6</sub>CC; (CAC)<sub>3</sub>GC; (AG)<sub>8</sub>YT; (AC)<sub>8</sub>CG; (AC)<sub>8</sub>CT; (CT)<sub>8</sub>RG; (GGAT)<sub>3</sub>GA; (GAA)<sub>6</sub>AA; (GA)<sub>8</sub>C; (AG)<sub>8</sub>YC; (AG)<sub>8</sub>YA; (GACA)<sub>4</sub>; (GGAT)<sub>4</sub>; (AG)<sub>8</sub>C; (AG)<sub>8</sub>T; (CAC)<sub>3</sub>; (GGGGT)<sub>3</sub>G; (GGAT)<sub>3</sub>; (ATC)<sub>6</sub>; (ATC)<sub>6</sub>C; (ATG)<sub>6</sub>G; (AG)<sub>7</sub>GC; (CT)<sub>8</sub>A; (GAA)<sub>6</sub>; (GA)<sub>8</sub>YC e (GA)<sub>8</sub>YG. Os primers (GACA)<sub>4</sub> e (CAC)<sub>3</sub> já haviam sido utilizado para estudo de variabilidade em espécies do gênero *Mycosphaerella* (Castilo e Simón, 2010; Pereira et al., 2010). Os demais primers foram escolhidos de forma aleatória na coleção de primer do laboratório de melhoramento e genética vegetal da UENF.

Para análise do padrão de bandas, o produto de amplificação foi submetido à eletroforese a 90 V, em gel de agarose 2%, imerso em tampão TAE [Tris-Acetato 90 mM (pH8,0) + EDTA 10 mM]. O gel foi corado com GEL REDTM e visualizado pelo sistema de fotodocumentação MiniBis Pro (Bio-Imaging Systems). Para determinar o tamanho dos fragmentos amplificados, foi utilizado o marcador Gene Ruler 50pb DNA Ladder (Thermo Scientific).

### 3.1.3.4. Análises Estatísticas

#### 3.1.3.4.1. Produção de conídios por placa

Foi feita análise de variância para número de esporos/placa de *A. caricae*, com o auxílio do programa SAS. A média e o desvio padrão foram calculados pelo Excell.

#### 3.1.3.4.2. Variabilidade genética de *A. caricae* por marcadores moleculares ISSR

Para a análise molecular, os resultados das amplificações foram codificados na forma de uma matriz binária (0=ausente, 1=presente), que, por sua vez, foi utilizada para calcular a matriz de dissimilaridade, expressa pelo complemento aritmético do Índice de Jaccard. Com os dados da matriz, foi feito o agrupamento dos indivíduos pelo método hierárquico aglomerativo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means). A análise de

agrupamento foi feita segundo as matrizes de distância genética, obtidas do programa GenAlEx (Peakall e Smouse, 2012), utilizado-se o programa MEGA versão 6 (Tamura et al., 2011).

### **3.1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1.4.1. Indução do crescimento e esporulação de *A. caricae***

A metodologia utilizada permitiu confirmar o crescimento micelial lento dos isolados de *A. caricae in vitro*, conforme citado por Chambers e Rijkenberg (1987) e Silva (2010). As colônias apresentaram crescimento estromático, de consistência dura e difíceis de serem fragmentadas quando repicados e macerados.

Após o isolamento monospórico, observou-se, a olho nu, que o aparecimento das hifas ocorreu por volta do décimo quinto dia de incubação a 25°C e fotoperíodo de 12 h luz/12 h escuro. Entretanto, pôde-se observar que, quando as repicagens ocorriam tendo como origem culturas mais antigas (aproximadamente dois meses), as hifas podiam ser visualizadas com sete dias após as repicagens. O crescimento lento do fungo dificultou a multiplicação e a manutenção dos isolados nas etapas posteriores.

##### **3.1.4.1.1. Ensaio 1. Seleção de meios de cultura para crescimento micelial de *A. caricae*.**

Nessa primeira fase, em que foram avaliados 13 meios de cultura e um isolado, o UENF-AC20, a 25°C, após 40 dias de incubação, não foi observada variação na coloração das colônias, à exceção do isolado AVFM, que, ao final da avaliação, apresentou estromas semelhantes àqueles observados na folha doente. Porém nenhum dos meios promoveu esporulação dos isolados, apenas hifas. Não foi possível conduzir a análise estatística devido à quantidade de placas restantes ao final da avaliação.

Dos 13 meios avaliados nesse primeiro ensaio, oito deles permitiram crescimento do patógeno, a saber: CBB, V8, AC, micophil, milho, BDA, AVFM e

FMCM. Nos meios de cultura com cenoura e cenoura+batata, embora o fungo tivesse crescido, o desenvolvimento das colônias foi mais lento que no restante dos outros meios. Já nos meio com beterraba, extrato de tomate e extrato de tomate + folha de mamão não permitiram o crescimento do fungo. Chambers e Rijkenberg (1987) cultivaram isolados de *A. caricae* em 29 meios de culturas, dos quais apenas três possibilitaram o crescimento de *A. caricae*. Silva (2010) cultivou isolados de *A. caricae* em sete meios de cultura: caldo de vegetais, Oat-meal-ágar, batata-dextrose-ágar suplementado com aminoácidos, folha de mamão, batata-dextrose-ágar, casca do fruto do mamão e corn-meal-ágar, sendo que todos os meios avaliados possibilitaram crescimento micelial de *A. caricae*.

Outra espécie do gênero que se caracteriza por apresentar crescimento lento e reduzido *in vitro* é *Asperisporium alstroemeriae*. Após quatro meses de cultivo, as colônias de *A. alstroemeriae* cresceram apenas 8 milímetros (Wolcan, 2006).

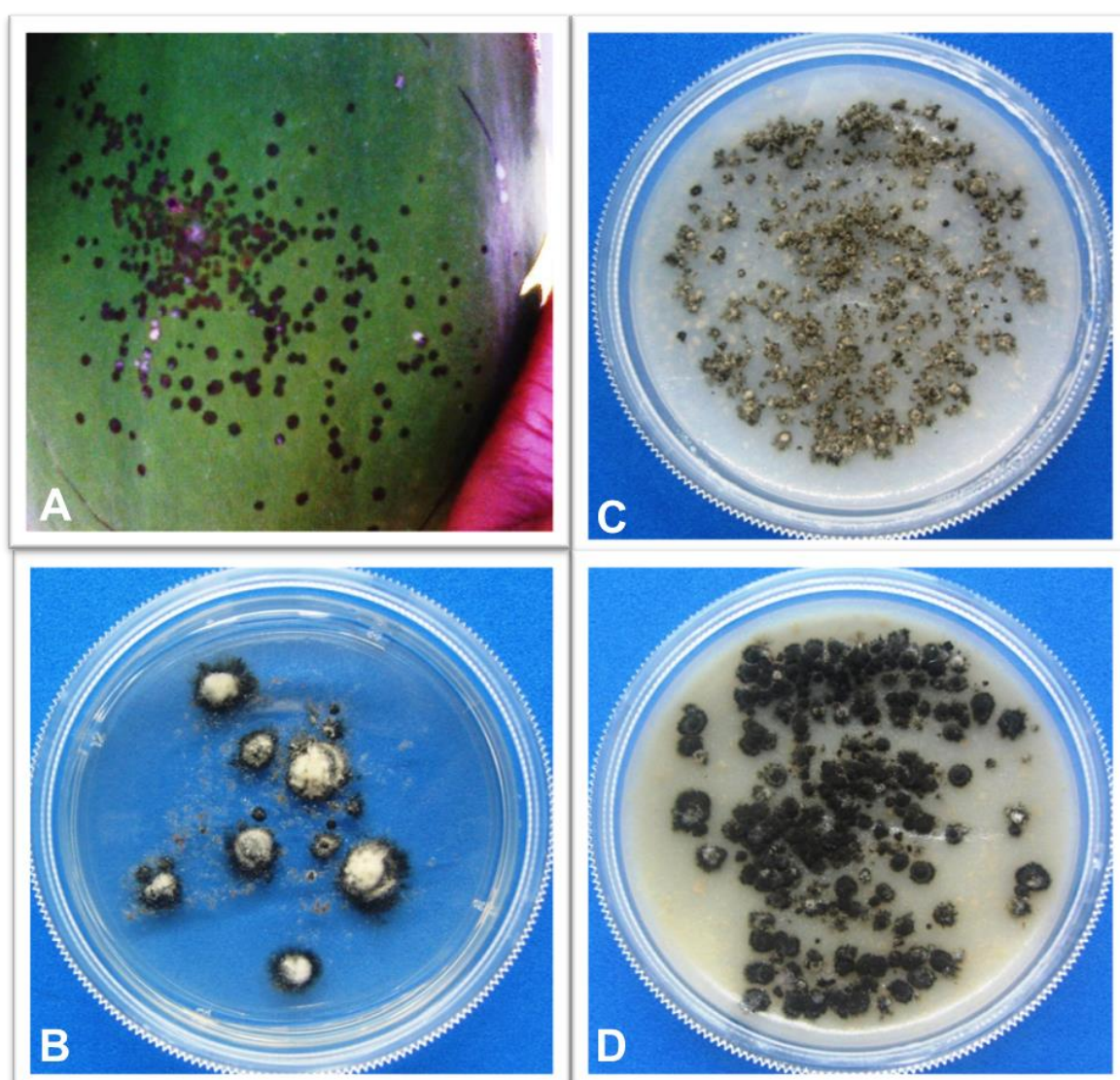
#### **3.1.4.1.2. Ensaio 2. Determinação da temperatura ótima de incubação para esporulação de *A. caricae***

##### **3.1.4.1.2.1. Meios sólidos**

Observou-se que, após 52 dias de incubação dos isolados, nas diferentes temperaturas, as colônias apresentaram 3 tipos diferenciados de coloração, com presença ou ausência de esporos. Para a coloração, o micélio apresentou-se branco, acinzentado ou escuro (Figura 1). Nas colônias em que o micélio se apresentou branco, não houve produção de esporos, mas nas colônias de coloração acinzentada e escura, houve produção de esporos.

Ao longo da avaliação, observou-se que, na grande maioria dos meios de cultura utilizados, inicialmente as colônias se apresentaram brancas, evoluindo para um tom esverdeado, em seguida, apresentando aspecto enegrecido. Grande parte das placas que apresentaram este tipo de evolução, ao final do experimento, apresentaram esporos. Minnis et al. (2011), cultivando *A. caricae in vitro*, obtiveram colônias apresentado padrão de coloração semelhante. Já nos meios em que o micélio se manteve branco, ao final da avaliação não se verificou presença de esporos.

As colônias obtidas pelo espalhamento de fragmentos miceliais caracterizaram-se, normalmente, por serem pontuais, estromáticas e arredondadas. Na observação feita no décimo dia após a instalação do experimento, observou-se que, nas temperaturas maiores, ou seja, 21°C e 23°C, ocorreu melhor crescimento das colônias do que nas temperaturas menores, 17°C e 19°C, exceção feita aos meios com água de coco, que, até aquela avaliação, não mostraram crescimento e, milho e micophil, com crescimento bem mais lento, quando comparado aos demais. Os estromas, normalmente, mediram de 1 a 6 mm de diâmetro, após 52 dias de incubação.



**Figura 1.** Colônias de *A. caricae* em diferentes meios e temperaturas de incubação. A – Fruto do mamoeiro com sintomas de pinta-preta; B – Colônias com micélio branco e ausência de esporos, em meio água de coco; C – Colônias com micélio acinzentado e com presença de esporos, em meio de Milho e E – Colônias com estromas escuros e com esporos, em meio Aveia+folha de mamão. Campos dos Goytacazes, UENF, 2015.

Há controvérsias quanto ao tempo necessário para esporulação de *A. caricae*. Silva (2010), avaliando o crescimento e esporulação *in vitro* de *A. caricae* a 27°C, em 7 meios de cultura, observou que a esporulação não foi abundante, mesmo após 135 dias de incubação, tendo sido encontrados de 1-3 conídios por colônia. Entretanto, Minnis et al. (2011) obtiveram esporos de *A. caricae* cultivados *in vitro* a 24°C, com três semanas a um mês de cultivo. No presente trabalho, as temperaturas menores, de 17°C e 19°C, foram as que melhor favoreceram a esporulação *in vitro* de *A. caricae* aos 52 dias de cultivo. Neste estudo, é possível que alguma esporulação tenha ocorrido em prazo inferior, tal como ocorreu com as avaliações de Minnis et al. (2011). Todavia, o trabalho de Minnis et al. (2011) objetivou confirmar apenas a identidade dos isolados em cultura pura, e os autores não foram precisos sobre a eficiência dos métodos em induzir esporulação em quantidade suficiente para estudos de inoculação, como efetuado neste trabalho.

Embora, não tenham sido feitas medições micrométricas, quanto à morfologia os esporos produzidos *in vitro* se aparentaram como aqueles produzidos na planta. Observou-se presença de conídios solitários, verrugosos e septados e de conidióforos septados com cicatrizes conspícuas (Figura 2).

A continuação dos estudos na tentativa de reduzir ainda mais a quantidade de dias exigidos para esporulação de *A. caricae* faz-se necessária, a fim de viabilizar inoculações artificiais para seleção de genótipos resistentes à pinta-preta do mamoeiro, mediante uso de inóculos produzidos *in vitro*.

Houve diferença significativa para temperatura, meio de cultura, isolado e para as interações avaliadas ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F (Tabela 4). A temperatura 19° C, nos meios AVFM, Micophil, FMCM, CBB e Milho, foi a melhor para esporulação dos isolados UENF-AC6 e UENF-AC22 (Figura 3 e 4). Já para o isolado UENF-AC20, a temperatura 19° C foi a melhor para esporulação de todos os isolados, a única exceção foi para o meio CBB, onde a temperatura melhor foi a 17° C (Figura 5)



**Figura 2.** Morfologia dos conidióforos e conídios de *A. caricae* obtidos em diferentes temperaturas de avaliação. A – Conidióforos septados com cicatrizes conspícuas (indicadas nas setas vermelhas). B – Conídios verrugosos e septados. Campos dos Goytacazes, 2015/UENF.

**Tabela 4.** Resumo da análise de variância para produção de esporo de *A. caricae* cultivado *in vitro* sob diferentes temperaturas e diferentes meios de cultura. Campos dos Goytacazes, UENF, 2015.

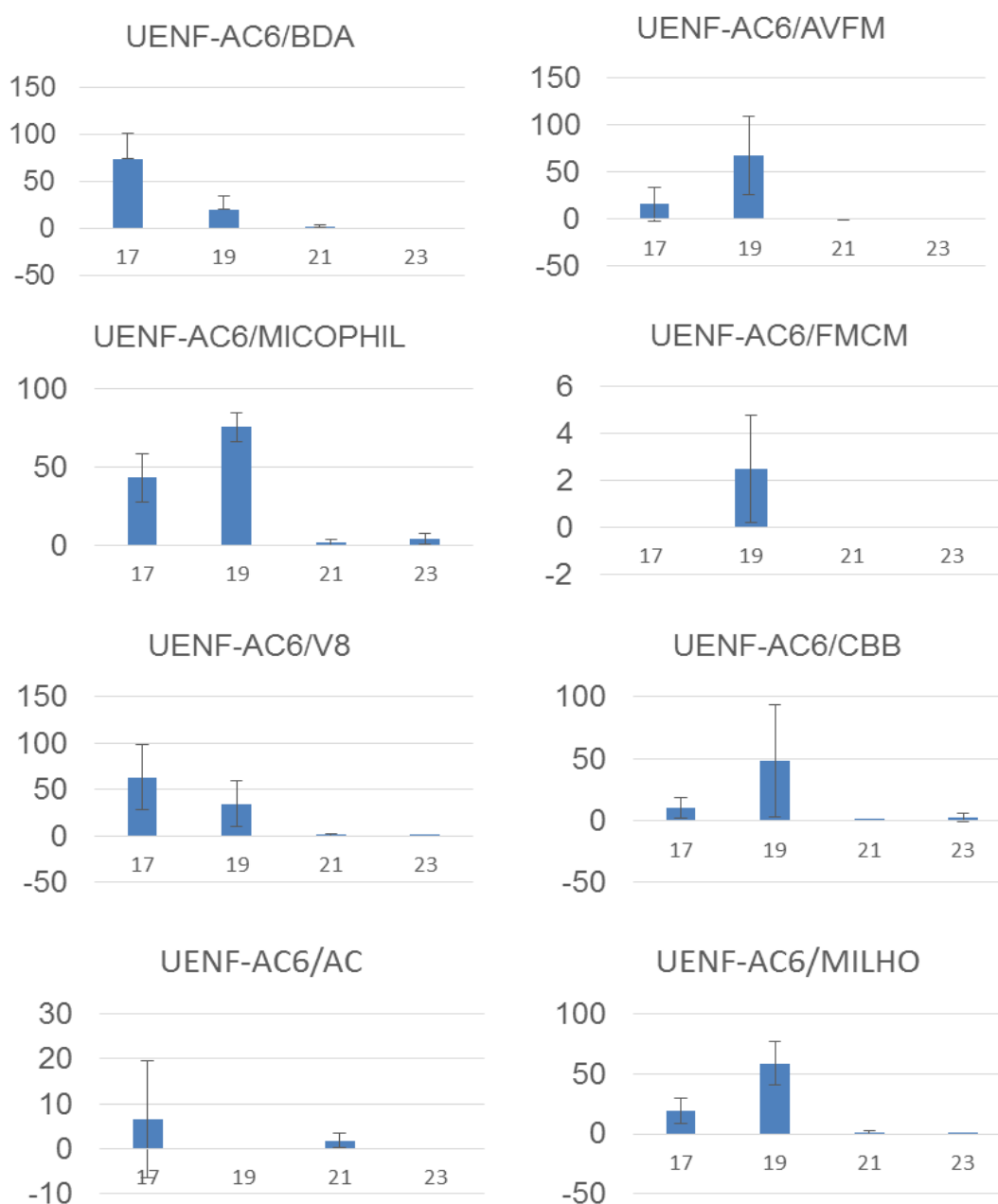
FV	GL	QM	F
Bloco	3	47,41	0,38
Temperatura	3	20443,64	157,71**
Meio	7	1327,60	10,24**
Isolado	2	3468,44	26,76**
Temp*Meio	21	1362,05	10,51**
Temp*Isolado	6	1001,13	7,72**
Meio*Isolado	14	1627,97	12,50**
Temp*Meio*Isolado	42	1070,81	8,26**
Erro	285	129,63	
Cv(%)	88,11		
Média	12,92		

### 3.1.3.2.2. Meios líquidos

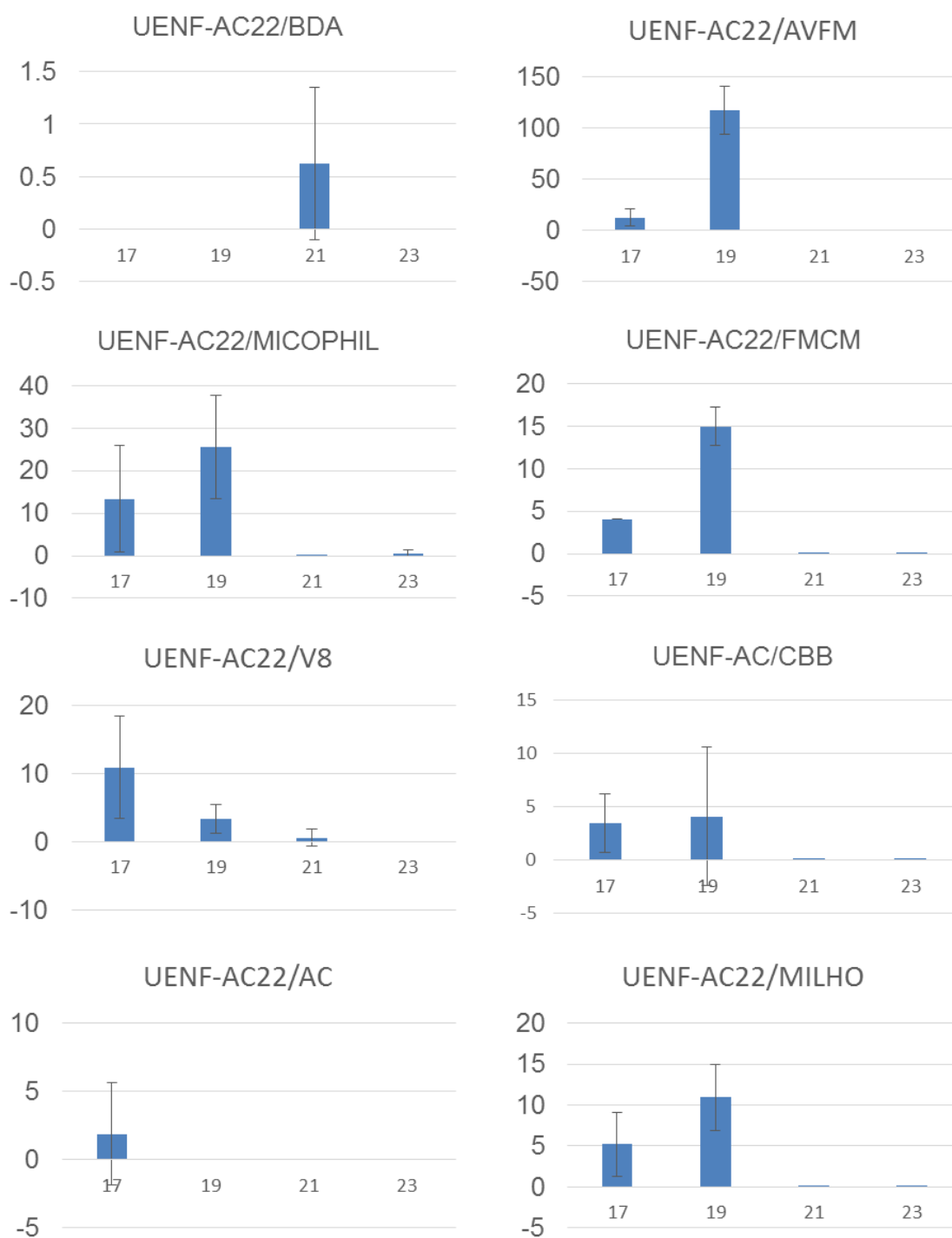
Os isolados AVFM, BCB, BDA, FMCM, milho, Micophil, V8, extrato de folha seca de mamão (EFS) e Czapek), cultivados em meio líquido, mesmo após o período aproximado de 120 dias, não esporularam. Santos et al. (2008) cultivaram *A. caricae* em meio de cultura líquido contendo extrato de folha de mamão e, só após cinco meses de cultivo, no escuro e sob agitação constante, conseguiram obter alguma esporulação do patógeno. Neste estudo, observou-se que esta foi a maneira mais prática para multiplicar o inóculo. Em meio sólido, a colônia é dura e compacta, dificultando as repicagens, diferentemente do observado quando o



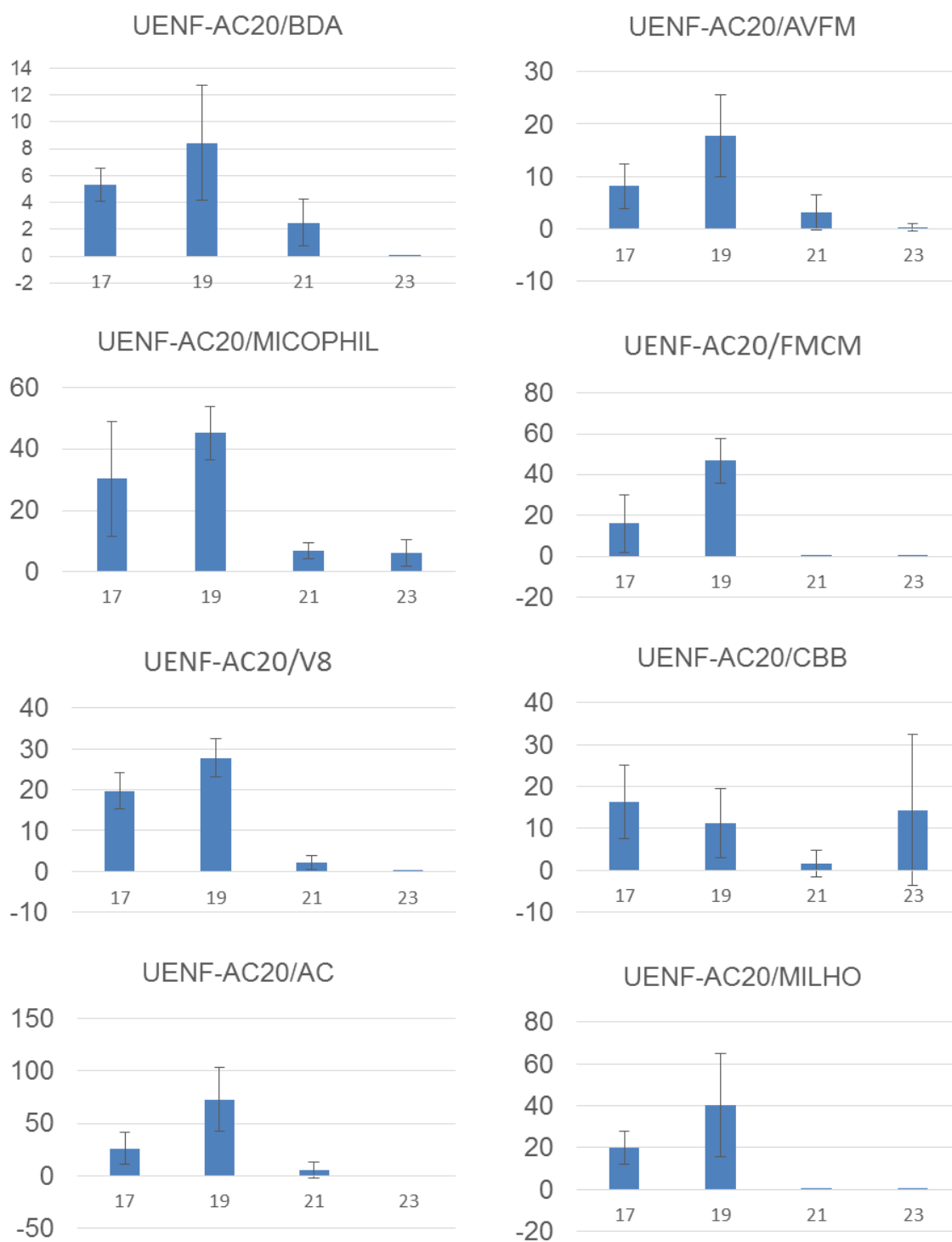
fungo é cultivado em meio líquido. Portanto, no início, quando não se dispõe de esporos para o semeio das placas, pode-se lançar mão do cultivo em meio líquido. Dos meios líquidos avaliados, o que permitiu o melhor desenvolvimento do micélio foi o meio com folha de mamão + casca de mamão.



**Figura 3.** Média da concentração de esporos do isolado UENF-AC6 de *A. caricae* em 2 mL por placas em diferentes temperaturas, 17, 19, 21 e 23° C e meio de cultura, aos 52 dias de incubação. As barras indicam o desvio padrão.



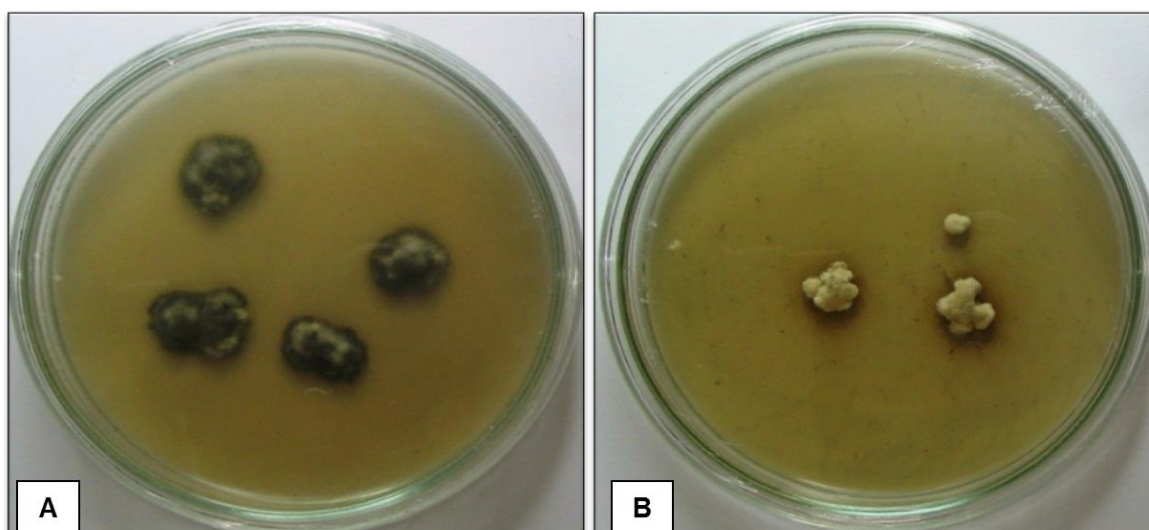
**Figura 4.** Média da concentração de esporos de do isolado UENF-AC22 *A. caricae* em 2 mL por placa em diferentes temperaturas, 17, 19, 21 e 23° C e meio de cultura, aos 52 dias de incubação. As barras indicam o desvio padrão.



**Figura 5.** Média da concentração de esporos do isolado UENF-AC20 de *A. caricae* em 2 mL por placas em diferentes temperaturas, 17, 19, 21 e 23° C e meio de cultura, aos 52 dias de incubação. As barras indicam o desvio padrão.

### 3.1.4.1.3. Ensaio 3. Influência da temperatura na esporulação de *A. caricae*

O cultivo dos isolados em duas temperaturas, 19°C e 32°C, por aproximadamente dois meses, permitiu detectar diferenças na coloração e aparência das colônias e na produção de esporos. Aos 19°C, as colônias apresentaram-se com coloração escura e presença de esporos. Na temperatura de 32°C, as colônias mostraram-se brancas e sem esporos ou sinais de conidiogênese (Figura 6). Não foi possível realizar análise estatísticas, mas apenas observacionais.



**Figura 6.** Culturas de *A. caricae*, isolado UENF-AC12 aos 60 dias, cultivado a 19°C (A) e 32°C (B) em meio de BDA. Campos dos Goytacazes, UENF, 2015.

### 3.1.4.2. Variabilidade genética por marcadores moleculares

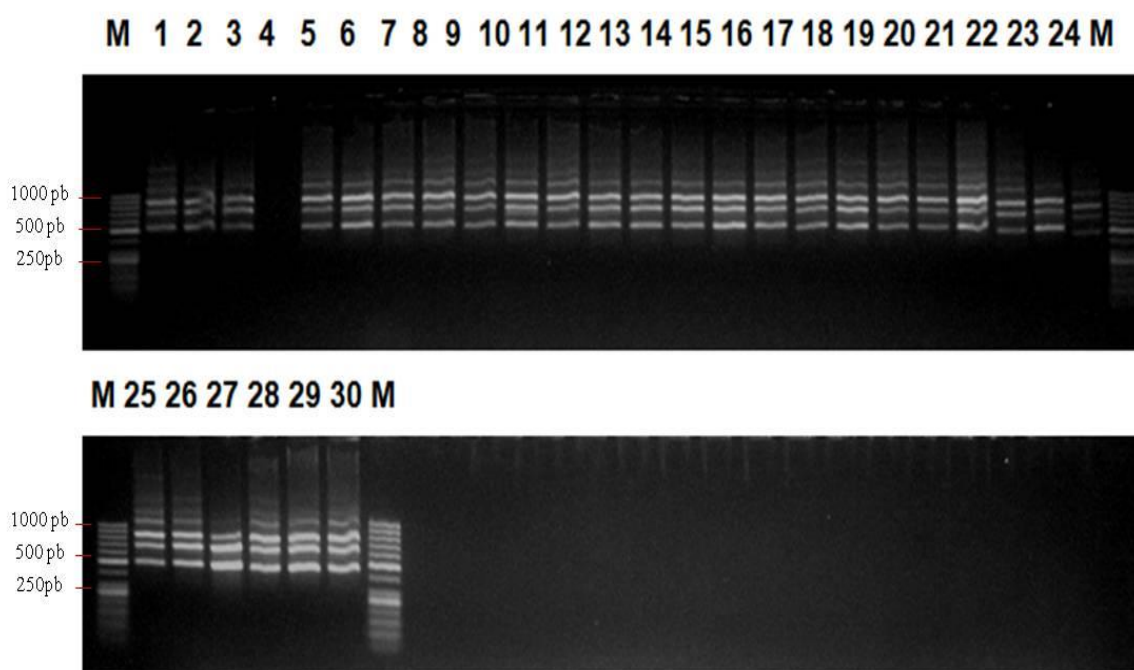
A maioria dos iniciadores amplificaram bandas de tamanho iguais (Figura 6). Dos 27 primers de ISSR testados, foram obtidas 87 bandas, das quais apenas duas foram polimórficas. A similaridade entre os isolados variou de 30 a 100%. Pela análise de agrupamento, considerando a similaridade entre os isolados, foi possível formar dois grupos, um grupo representado pelo isolado UENF-AC20 e o segundo grupo composto pelos demais isolados (Figura 7).

As colônias de *A. caricae* utilizadas para extração molecular não apresentaram diferenças expressivas quanto à morfologia em meio de cultura.

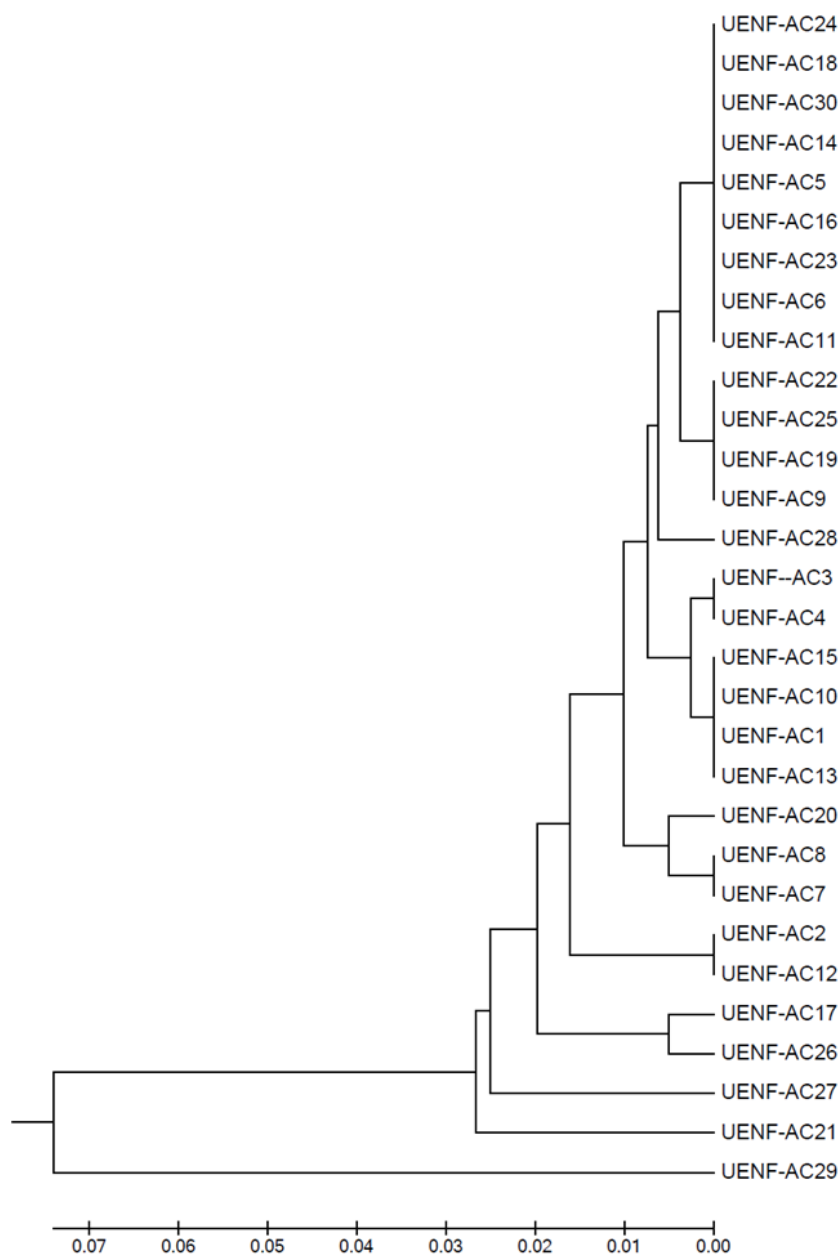
Estudos adicionais são necessários para comprovar a baixa variabilidade genética entre isolados de *A. caricae*, conforme constatado pelos marcadores ISSR.

Medidas de diversidade em fungos com reprodução assexuada são complicadas (Silva, 2009). Fungos que se reproduzem via assexual são geralmente menos diversos que os microrganismos que têm reprodução sexual, pela ausência de recombinação genética. Entretanto, alguns mecanismos podem ocorrer em espécies que se reproduzem de forma assexuada para ampliar a variabilidade do patógeno, como, por exemplo, mutação e ciclo parassexual podem compensar a ausência de reprodução sexual (Burdon, 1993). Mas essas informações também não estão disponíveis para *A. caricae*

Silva et al. (2010) detectaram variabilidade genética por meio de marcadores moleculares entre os isolados de *Fusarium oxysporum f.sp cubense*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum lindemuthianum*, que também se reproduzem de forma assexuada, porém são descritos como fungos que apresentam ampla variabilidade genética (Souza et al., 2007; Camargo Júnior et al., 2007).



**Figura 7.** Padrão de amplificação de isolados de *A. caricae* utilizando o primer (GA)<sub>8</sub>YC).



**Figura 8.** Dendrograma de dissimilaridade genética de 30 isolados de *A. caricae*, obtido pelo método de agrupamento UPGMA, com base em *primers* ISSR. Campos dos Goytacazes, 2015, UENF.

### 3.1.5. CONCLUSÕES

São possíveis o cultivo *in vitro* e a obtenção de esporulação de *A. caricae* (Speg.) Maubl. em diferentes meios de cultura e temperaturas de incubação, sendo os meios Micophil, V8 e Milho e, a temperatura de 19 °C os melhores neste estudo.

Com base nos marcadores utilizados e pela quantidade de bandas polimórficas obtidas, não foi possível correlacionar os grupos por área geográfica de origem, nem concluir sobre a variabilidade genética do patógeno.

## **3.2. SELEÇÃO DE PROGÊNIES DE MEIOS-IRMÃOS DERIVADAS DE GENÓTIPOS CRIoulos DE MAMOEIRO, VISANDO À RESISTÊNCIA À PINTA-PRETA**

### **3.2.1. INTRODUÇÃO**

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de mamão (FAO, 2013) e é a terceira fruta mais consumida *in natura* e a sétima fruta mais exportada no país (Agrianual, 2011).

O mamoeiro apresenta base genética estreita (Dantas, 2000). Dessa forma, há uma considerável vulnerabilidade genética a doenças e pragas, o que acaba comprometendo a sustentabilidade do cultivo. A ocorrência de doenças na cultura do mamoeiro, notadamente a pinta-preta, causada pelo fungo *Asperisporium caricae* (Speg.) Maubl, é um dos principais fatores responsáveis pela redução na produção da cultura. Assim, o desenvolvimento de novas variedades resistentes a doenças pode garantir maior competitividade e sustentabilidade à cultura do mamoeiro.

As flores do mamoeiro podem ser divididas, basicamente, em três tipos bem diferenciados: flor hermafrodita, que caracteriza as plantas hermafroditas; flor estaminada, que caracteriza plantas masculinas; e flor pistilada, que caracteriza uma planta feminina típica (Medina et al., 1994). Com base nos tipos florais, podem ocorrer três tipos de populações:



**População dioica:** constituída por plantas com flores femininas e plantas com flores masculinas. Essa população é resultante de frutos obtidos do cruzamento entre plantas do sexo masculino e plantas do sexo feminino.

**População ginoico-andromonoica:** constituída por plantas com flores femininas e plantas com flores hermafroditas (andromonoicas). As plantações de mamoeiros ginoico-andromonoicos são originárias dos cruzamentos entre plantas hermafroditas, que são capazes de se autofecundar, pois apresentam os órgãos masculino e feminino na mesma flor. Vale ressaltar que, em condições de campo, um mamoeiro hermafrodita pode não se autofecundar, podendo receber pólen de outro hermafrodita ou mesmo masculino (dioico) que estiver nas proximidades.

**População andromonoico-trioica:** constituída por plantas com flores femininas, plantas com flores hermafroditas e plantas com flores masculinas (Souza, 2000; Marin e Gomes, 1986).

A expressão sexual nas plantas está sob controle genético, sendo, em mamoeiro, a genética do sexo um caráter de herança simples, ou seja, monogênico, com três formas alélicas. *C. papaya* L. tem três tipos ou formas sexuais: ginoica (com plantas exclusivamente femininas), androica (com plantas exclusivamente masculinas) e andromonoica (com plantas cujas inflorescências são hermafroditas) (Storey, 1953). Em seu estudo sobre a herança do sexo, Storey (1953) mostrou que as plantas femininas são geneticamente homozigotas para o alelo *m* e as plantas masculinas e hermafroditas são heterozigotas para os alelos *M1* e *M2*, respectivamente, formando as combinações: *mm* (plantas femininas), *M1m* (plantas masculinas), *M2m* (plantas hermafroditas). O autor ainda relata em seu estudo que as combinações *M1M1* e *M2M2* não existem porque são letais ao zigoto.

As variedades crioulas, também denominadas de variedades locais ou “*landraces*”, podem ser usadas em programas de melhoramento para ampliação da variabilidade genética com o objetivo de seleção de novos materiais e como fonte de genes de adaptação, resistência a estresses bióticos e abióticos (Neitzke et al., 2009). Dessa forma, alguns melhoristas de diferentes culturas, como melão (Neitzke et al., 2009), cebola (Barbieri et al., 2005), alfafa (Perez et al., 2009), milho (Fidelis et al., 2010), têm procurado ampliar a variabilidade genética nos seus programas de melhoramento com o uso de germoplasma crioulo. Germoplasmas crioulos de mamão estão sendo testados como fonte de

variabilidade genética e resistência a doenças, com potencial para uso em programas de melhoramento (Oliveira et al., 2010; Oliveira et al., 2011; Vivas et al., 2012; Vivas et al., 2013, Vivas et al., 2014) Todavia, genótipos crioulos na cultura do mamoeiro produzem plantas dioicas, onde são produzidas plantas masculinas e femininas que não possuem valor comercial. Dessa forma, o interesse dá-se na identificação dos genes de resistência apresentada por esses genótipos.

No que tange a estudos relacionados à resistência a doenças, os trabalhos ainda são incipientes (Vivas et al., 2012; Vivas et al., 2013), necessitando de informações, tanto do nível de resistência, quanto do potencial de cada progênie avaliada.

Em razão da importância da pinta-preta do mamoeiro, há necessidade de se buscarem genótipos mais resistentes a fim de se ampliar a base genética visando ao melhoramento genético da cultura. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi identificar genótipos resistentes à pinta-preta do mamoeiro, considerando a seleção praticada em população crioula, para serem inseridos no programa de melhoramento genético da UENF-Caliman.

### 3.2.2. REVISÃO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma das fruteiras mais cultivadas e consumidas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Seus frutos se caracterizam por serem excelentes fontes de cálcio, pró-vitamina A e vitamina C (ácido ascórbico), por isso são amplamente utilizados em dietas alimentares (Serrano e Catanneo, 2010).

Antes da década de 1970, o cenário da cultura do mamoeiro no Brasil não era muito favorável, visto predominarem cultivos com materiais dioicos. Entretanto, a partir de 1976/1977, com a introdução de cultivares do grupo Solo e de híbridos do grupo Formosa, a cultura do mamoeiro começou a assumir grande importância econômica no país.

A cultura do mamoeiro tem expressiva participação na produção nacional da fruticultura. É a terceira fruta mais consumida no País, apresentando grande

relevância econômica e social, sobretudo na geração de emprego e renda (Buainain e Batalha, 2007).

Toda a área de produção comercial é implantada quase que exclusivamente com dois grupos de cultivares, Solo e Formosa, além disso, o número de genótipos de mamoeiro cultivado é restrito, resultando em uma estreita base genética (Dantas, 2000; Oliveira et al., 2011). Dessa forma, existe maior vulnerabilidade a doenças e pragas, o que acaba comprometendo a sustentabilidade do cultivo. Assim, a busca pelo aumento da variabilidade genética, tendo como base o desenvolvimento de novos genótipos, pode garantir maior competitividade e sustentabilidade à cultura do mamoeiro (Dias et al., 2011).

Atualmente, no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), estão registradas 44 cultivares de *Carica papaya* L., 13 delas obtidas pela parceria existente entre a Uenf e a empresa Caliman Agrícola. Esta parceria foi iniciada em 1996 e em 2002 possibilitou o registro de nove cultivares, a saber: UENF/Caliman01, UENF/Caliman02, UENF/Caliman03 UENF/Caliman04, UENF/Caliman05, UENF/Caliman06, UENF/Caliman07, UENF/Caliman08 e UENF/Caliman 09. Em 2014, mais quatro cultivares foram registradas: UC10, UC12, UC14 e UC16. UENF/Caliman01 é o híbrido de maior importância econômica para o país. Essa importância se deve, sobretudo, ao fato de antes do seu lançamento aos produtores, ter havido necessidade constante de importação de sementes do híbrido Tainung 01, pertencente ao grupo Formosa. O registro do híbrido UENF/Caliman01 possibilitou tanto a redução da quantidade de sementes híbridas importadas quanto a redução do valor dessas sementes. Além disso, a comercialização, tanto das sementes quanto dos frutos, tem ultrapassado as fronteiras nacionais.

Segundo Araújo e Nass (2002), no melhoramento genético, a escolha do germoplasma é parte fundamental e decisiva para qualquer programa de melhoramento de plantas, podendo interferir significativamente no sucesso ou no fracasso da seleção.

As variedades crioulas, também denominadas de variedades locais ou *landraces*, podem ser usadas em programas de melhoramento para ampliação da base genética, com o objetivo de seleção de novos genótipos e como fonte de genes de adaptação, resistência a estresses bióticos e abióticos (Neitzke et al.,

2009). Segundo Zeven (1998), o termo *landraces* foi empregado pela primeira vez em estudos de recursos genéticos em meados de 1890. De maneira geral, as populações crioulas são menos produtivas que as cultivares comerciais. Entretanto, essas populações são importantes por constituírem fonte de variabilidade genética que podem ser exploradas na busca por genes tolerantes e/ou resistentes a fatores bióticos e abióticos (Araújo e Nass, 2002). Dessa forma, alguns melhoristas têm procurado ampliar a base genética de seus programas de melhoramento com o uso desses germoplasmas.

A substituição das variedades crioulas por variedades melhoradas tem sido motivo de preocupação para especialistas da área, uma vez que esses materiais representam fonte de genes de interesse, adaptados a condições específicas (Rodrigues e Santos, 2011). É premente que os programas que historicamente promoveram a substituição dos recursos genéticos locais pelas sementes comerciais sejam reorientados, passando a apoiar efetivamente as dinâmicas locais de conservação da agrobiodiversidade (Londres, 2014).

Ao longo das últimas décadas, alterações relacionadas ao uso de recursos genéticos na agricultura levaram a uma gradativa marginalização das sementes crioulas, o que resultou na extinção de muitas variedades e na redução da população de outras. Além do desaparecimento físico das variedades, esse processo, tecnicamente conhecido como erosão genética, significa também a perda de um valioso acervo de conhecimentos culturais associados ao uso e ao manejo da agrobiodiversidade (Londres, 2014).

No tocante à cultura do mamoeiro, a preservação dos seus recursos genéticos é essencial para a sustentabilidade da cultura. Nesse contexto, a caracterização e a avaliação de acessos de mamoeiro podem permitir a identificação de genótipos superiores, além de fornecer o material básico para programas de melhoramento genético.

No Brasil, as principais empresas responsáveis pela conservação do germoplasma de mamão são: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (Dantas e Lima, 2001); UENF, em parceria com a empresa Caliman Agrícola e o Instituto Capixaba de Pesquisa Agropecuária – (Incaper). A Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical conta com 241 acessos, que compreendem cinco espécies, assim distribuídas: 224 acessos de *Carica papaya* L, dez acessos de *Jaracatia spinosa*, dois acessos de *Vasconcellea cauliflora*, dois acessos de *Vasconcellea*

*monoica* e três acessos de *Vasconcellea quercifolia*, constituindo o maior banco de germoplasma dessa cultura no país (Oliveira et al., 2007).

A despeito da importância das variedades crioulas como fonte de variabilidade a ser usada nos programas de melhoramento, estudos envolvendo variedades crioulas de mamoeiro, no Brasil, ainda são incipientes, visto serem poucos os estudos dessa natureza encontrados na literatura (Oliveira et al., 2010; Oliveira et al., 2011, Vivas et al., 2012; Vivas et al., 2013). E estudos envolvendo esse tipo de variedade, relacionado a doenças, são ainda mais escassos (Vivas et al., 2012; Vivas et al., 2013).

A ocorrência de doenças é um dos principais fatores responsáveis pela redução na produção da cultura, podendo acarretar vários danos, que podem ser desde o desfolhamento até a morte precoce da planta e, conseqüentemente, queda na produtividade e na qualidade da produção, causando uma série de prejuízos de ordem financeira e social. A pinta-preta do mamoeiro é considerada uma das doenças foliares mais comuns que incidem na cultura, sendo seu controle feito quase que exclusivamente com aplicação de fungicida. Essa alternativa de controle é bastante onerosa, podendo ainda acarretar vários danos, tanto ao agricultor quanto ao meio ambiente, além de inviabilizar as exportações. Dessa forma, a identificação de um germoplasma fonte de resistência é algo muito almejado pelos melhoristas dessa área.

### **3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS**

Avaliaram-se 20 progênies de meios-irmãos de mamoeiro crioulos cultivados por pequenos agricultores do sul do Espírito Santo. O material genético avaliado resultou da seleção praticada anteriormente por Vivas et al. (2013). Para fins comparativos, também foi incluída, no estudo, a variedade Maradol, considerada genótipo padrão para resistência à pinta-preta (Vivas et al. 2012, Vivas et al., 2015). Os genótipos foram semeados em tubetes de 53 cm. Após 60 dias do semeio, as plântulas foram transplantadas para vasos com 10L de capacidade, contendo esterco bovino + areia (2:1). Instalou-se experimento em blocos casualizados, com quatro repetições, em casa de vegetação, sob

inoculação natural, no Campus Leonel Brizola da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro

As avaliações foram feitas nos meses de setembro, outubro e novembro de 2013 e 2014.

Foram avaliadas a severidade e a incidência de pinta-preta. Na avaliação da severidade da doença, foram consideradas a quinta e a sétima folha, contadas a partir do ápice da planta. A severidade da pinta-preta foi quantificada usando duas escalas: Terra (2009) e outra escala desenvolvida por Santos Filho et al. (2007). A incidência da doença foi obtida dividindo-se o número de folhas com sintoma pelo número total de folhas por planta. Além da severidade e da incidência, determinou-se em qual folha surgiram os primeiros sintomas da pinta-preta, contando-se do ápice para a base.

Com os dados fenotípicos, foram feitas a análise de variância, com comparação das médias, estimação dos parâmetros genéticos, e as análises multivariadas, utilizando o programa Genes (Cruz, 2013). As médias dos genótipos (progênies e testemunha) foram comparadas pelo método de agrupamento Scott-Knott a 5% de probabilidade. Foram estimados os seguintes parâmetros genéticos: a) variância fenotípica média; b) variância ambiental média; c) variabilidade genética média; d) coeficiente de determinação genotípico; e) correlação intraclasse; f) coeficiente de variação genético; e g) índice de variação. Na análise multivariada, a divergência genética entre os acessos foi estimada pelo método de agrupamento de Tocher (RAO, 1952), com o emprego da distância generalizada de Mahalanobis ( $D^2$ ) como medida de dissimilaridade. Com base na matriz de distâncias, foi feita também uma análise de agrupamento pelo algoritmo de classificação hierárquica ascendente UPGMA (Unweighted Pair Grouped Method Average).

A importância relativa das características foi calculada utilizando o método proposto por Singh (1981), que se baseia na partição do total das estimativas das distâncias  $D^2$ , considerando todos os possíveis pares de indivíduos para a parte devida a cada característica.

### 3.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferenças significativas entre tratamentos para todas as características estudadas, IPP, SPP5A, SPP7A, SPP5B, SPP7B e FIPP (Tabela 1). Esses resultados indicam existência de variabilidade genética entre os genótipos para as diferentes características avaliadas, o que é um indicativo favorável para o melhoramento dessas características.

**Tabela 1.** Resumo da análise de variância, associada à resistência à pinta-preta em progênies de meios-irmãos derivadas de população crioulas de mamoeiro dioico, provenientes do sul do Espírito Santo. Campos dos Goytacazes, 2015.

Fonte de Variação	GL	Quadrado médio					
		IPP	SPP5A	SPP7A	SPP5B	SPP7B	FIPP
Bloco	3	105,29	0,08	0,05	0,25	0,35	1,09
Genótipos	20	231,55**	0,113**	0,43**	0,42**	0,67**	0,87**
Resíduo	60	89,28	0,03	0,07	0,13	0,18	0,36
Média		46,21	0,23	0,43	1,09	1,36	4,37
CV (%)		20,45	79,14	59,75	32,62	31,39	13,73

Incidências de pinta-preta (IPP). Severidades de pinta-preta na quinta (SPP5A e SPP5B) e na sétima folha (SPP7A e SPP7B), contadas a partir do ápice, usando escala desenvolvida no setor de patologia vegetal do laboratório de Entomologia e Fitopatologia da UENF (SPP5A, SPP7A) e a escala desenvolvida por Santos Filho et al. (2007) (SPP5A, SPP7B). Posição da primeira folha a iniciar o sintoma de pinta-preta (FIPP).

Pelas estimativas dos parâmetros genéticos estimados, observou-se que a variância genética foi maior que a variância ambiental para todas as características analisadas, Tabela 2, com destaque para IPP, SPP7A e SPP7B, em que foram observados valores de variância genética maiores, quando comparados com as demais características. A característica SPP5A foi a que apresentou menor valor de variância genética, praticamente se igualando à variância ambiental. As estimativas para o coeficiente de determinação genotípico ( $H^2$ ) variaram entre 58,86% (FIPP) e 84,86% (SPP7A). As maiores estimativas do

$H^2$  foram obtidas pelas características SPP7A e SPP7B, respectivamente, com 84,86 e 72,97, mostrando a possibilidade de sucesso para seleção por meio dessas características.

As estimativas do coeficiente de variação genética (CVg) nos permitem uma comparação da variabilidade genética entre os diferentes características avaliadas. Os valores obtidos para CVg variaram entre 8,21 e 70,74%, constatando-se existência de variabilidade genética entre os tratamentos. De acordo com Faleiro et al. (2001), para se ter uma ideia real da situação de cada característica visando ao melhoramento, é necessário analisar a razão entre CVg/CVe, ou seja, analisar o índice de variação de cada característica, que deve ser maior do que a unidade. Segundo Cruz et al. (2012), altas estimativas de coeficiente de determinação genotípico, associadas a um índice de variação maior que a unidade, refletem uma situação muito favorável para a seleção. Entretanto, isto só foi observado para SSP7A, que apresentou CVe de 1,18. Ainda assim, as estimativas de parâmetros genéticos obtidas para esta população foram superiores àquelas apresentadas pela população original que lhe deu origem (Vivas et al., 2012).

Ao comparar as médias dos genótipos, associadas às características de resistência à pinta-preta, observa-se que, para IPP, houve formação de dois grupos, tendo 17 genótipos ficado alocados no grupo mais suscetível. E somente quatro genótipos, no grupo resistente, incluindo a cv. Maradol, que apresenta padrão resistente (Vivas et al., 2015). Para SPP5A, houve formação de dois grupos, tendo sido os genótipos PMI-12, PMI-13 e PMI-16 os mais suscetíveis. Já para SPP7A, houve formação de três grupos. Os genótipos PMI-6, PMI-13, PMI-16 ficaram alocados no primeiro grupo, ou seja, no grupo que apresenta as maiores médias para severidade de pinta-preta e, no segundo grupo, com valores médios intermediários de severidade para pinta-preta, ficaram os genótipos PMI-9, PMI-12 e PMI-17 e, todas as demais progênies, no terceiro grupo, ou seja, o grupo com as menores médias de severidade da doença, incluindo a cv. Maradol.



**Tabela 2.** Estimativas de parâmetros genéticos para características associadas à resistência à pinta-preta em progênes de meios-irmãos derivadas de populações crioulas de mamoeiros dioicos provenientes do sul do Espírito. Campos dos Goytacazes, 2015.

Parâmetros genéticos	IPP	SPP5A	SPP7A	SPP5B	SPP7B	FIPP
Variância fenotípica	57,89	0,03	0,11	0,10	0,17	0,22
Variância ambiental	22,32	0,01	0,02	0,03	0,05	0,09
Variabilidade genotípica média	35,57	0,02	0,09	0,07	0,12	0,13
Coeficiente de determinação genotípica	61,44	69,59	84,86	69,52	72,97	58,86
Correlação intraclasse	28,49	36,39	58,36	36,31	40,29	26,34
CVg	12,91	59,85	70,74	24,63	25,79	8,21
Razão CVg/CVe	0,63	0,76	1,18	0,76	0,82	0,60

Incidências de pinta-preta (IPP). Severidades de pinta-preta na quinta (SPP5A e SPP5B) e na sétima folha (SPP7A e SPP7B) contadas a partir do ápice, usando a escala desenvolvida no setor de patologia vegetal do laboratório de Entomologia e Fitopatologia da UENF (SPP5A, SPP7A) e a escala desenvolvida por Santos Filho et al. (2007) (SPPBA, SPP7B). Posição da primeira folha a iniciar o sintoma de pinta-preta (FIPP). CVg: coeficiente de variação genético. CVe: coeficiente de variação experimental.

Para SPP5B, foram formados dois grupos, oito genótipos ficaram alocados no grupo mais resistente. Para SPP7B, também foi observada formação de dois grupos. Para esta variável, foram verificados 14 genótipos inseridos no grupo mais resistente. A avaliação da característica FIPP possibilitou a formação de dois grupos, cujas melhores médias, ou seja, locais onde a doença demorou mais para manifestar o sintoma, foram obtidas pelos genótipos PMI-2, PMI-3, PMI-4, PMI-5, PMI-7, PMI-9, PMI-11, PMI-15, PMI-18 e pela cv. Maradol, não diferindo estatisticamente entre si. Observou-se que os genótipos PM-1 e PM-4 foram os mais promissores, uma vez que, para a maioria das variáveis estudadas, apresentaram médias inferiores à cv. Maradol (Tabela 3). Como se trata de materiais dioicos, haverá necessidade voltar à progênie original a fim de multiplicar as melhores para continuação de estudos futuros.

Considerando o método de otimização de Tocher, foi possível agrupar os 20 genótipos crioulos de mamoeiro e a cultivar Maradol em 4 grupos distintos (Tabela 4). O grupo I foi o que agrupou a maior quantidade de acesso (71,43%).

Porém, neste grupo, houve necessidade de subagrupamentos em decorrência das altas magnitudes observadas pela distância entre pares de indivíduos dentro do grupo (Abreu et al., 2004), como foi observado entre os acessos PM-17 e PM-21 (D2=11,40), o que indica presença de variabilidade dentro do grupo, justificando-se, então, o subagrupamento. Dessa forma, foram formados 5 subgrupos, a saber: 1.A, 1.B, 1.C, 1.D e 1.E. No subgrupo 1.B, ficou alocado o genótipo PMI-4, junto com a cv. Maradol, que apresenta padrão resistente. Os genótipos PMI-6, PMI-12, PMI-13, PMI-16 formaram o segundo grupo, caracterizado por apresentar os genótipos mais suscetíveis. No grupo III, ficou o genótipo PMI-7, que apresentou certo nível de resistência se comparado aos genótipos do grupo II. E no último grupo ficou o PMI-1, um dos melhores genótipos quanto ao nível de resistência apresentado por todos os genótipos.

**Tabela 3.** Médias associadas para características associadas à resistência à pinta-preta em progênies de meios-irmãos derivadas de populações crioulas de mamoeiro dioicos provenientes do sul do Espírito Santo. Campos dos Goytacazes, 2015.

TRAT	IPP	SPP5A	SPP7A	SPP5B	SPP7B	FISPP
PMI-1	34,38 b	0,11 b	0,01 c	0,65 b	0,49 b	4,13 b
PMI-2	45,71 a	0,26 b	0,24 c	1,15 a	1,30 b	4,59 a
PMI-3	45,20 a	0,21 b	0,34 c	1,15 a	1,21 b	4,58 a
PMI-4	37,80 b	0,08 b	0,19 c	0,71 b	0,67 b	4,96 a
PMI-5	50,96 a	0,20 b	0,46 c	0,72 b	1,36 b	4,67 a
PMI-6	54,91 a	0,34 b	1,08 a	1,47 a	1,72 a	3,60 b
PMI-7	26,73 b	0,02 b	0,23 c	0,53 b	2,00 a	5,31 a
PMI-8	50,67 a	0,27 b	0,46 c	1,31 a	1,54 a	4,13 b
PMI-9	44,73 a	0,22 b	0,66 b	1,20 a	1,43 b	4,75 a
PMI-10	49,08 a	0,15 b	0,39 c	1,15 a	1,28 b	4,13 b
PMI-11	48,15 a	0,14 b	0,16 c	0,96 b	1,33 b	4,67 a
PMI-12	56,67 a	0,59 a	0,79 b	1,65 a	1,42 b	3,72 b
PMI-13	56,81 a	0,64 a	1,10 a	1,45 a	1,92 a	3,57 b
PMI-14	48,55 a	0,13 b	0,15 c	0,84 b	1,17 b	4,23 b
PMI-15	43,70 a	0,07 b	0,14 c	0,90 b	1,19 b	4,63 a
PMI-16	46,69 a	0,56 a	1,00 a	1,65 a	1,98 a	4,13 b
PMI-17	50,41 a	0,15 b	0,60 b	1,27 a	1,96 a	4,25 b
PMI-18	42,23 a	0,17 b	0,19 c	1,12 a	1,09 b	4,43 a
PMI-19	49,89 a	0,17 b	0,16 c	1,21 a	0,99 b	4,04 b
PMI-20	51,90 a	0,24 b	0,48 c	1,21 a	1,56 a	4,125 b
Maradol	35,23 b	0,23 b	0,17 c	0,71 b	0,98 b	5,13 a

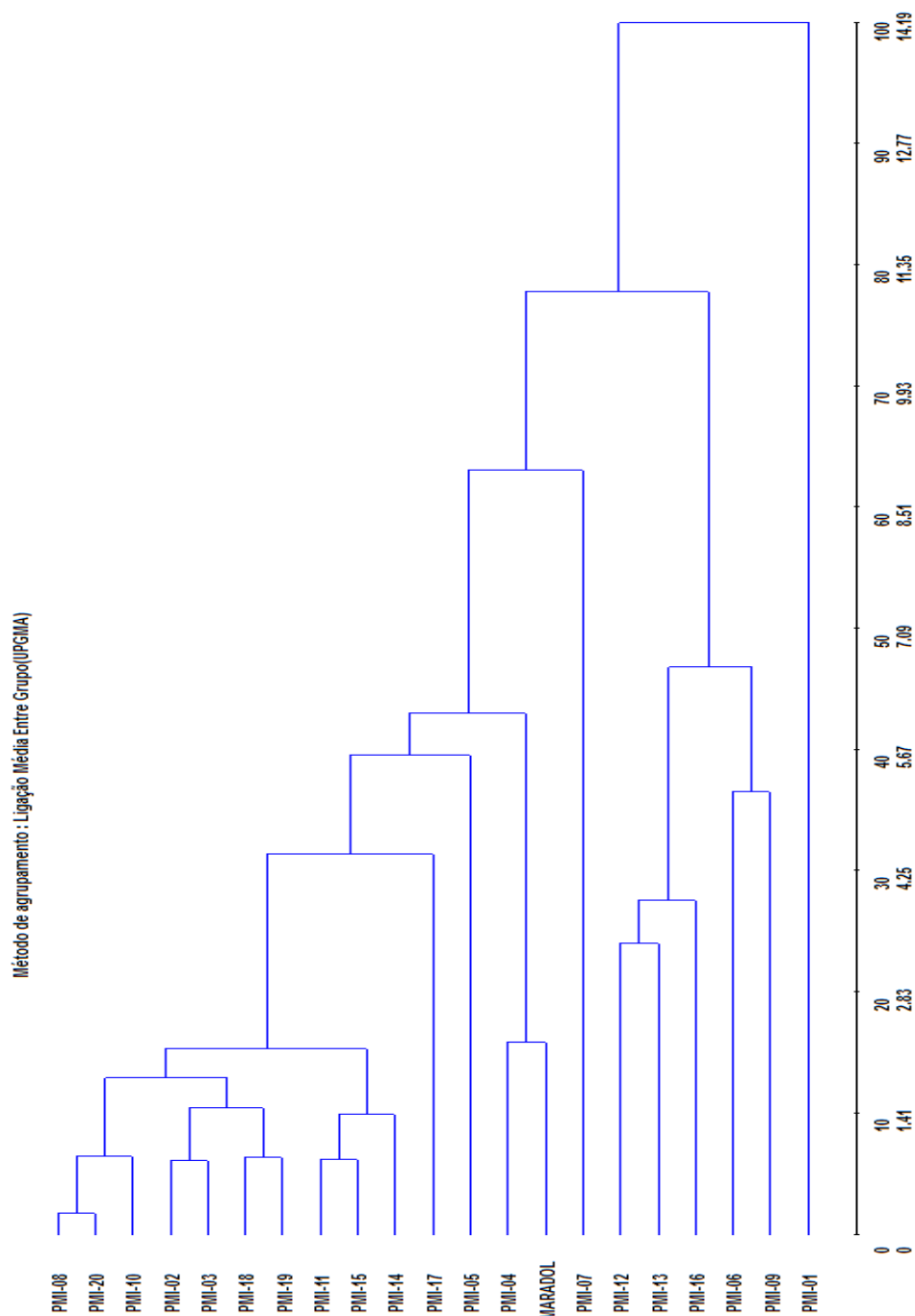
Médias na vertical seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

**Tabela 4.** Agrupamento e subagrupamento de 20 genótipos crioulos de mamoeiro, submetido à inoculação natural de pinta-preta do mamoeiro, conforme método de otimização de Tocher. Campos dos Goytacazes, UENF, 2015.

Grupos	Subgrupos	Trat
1	1.A	PMI-8, PMI-20, PMI-10, PMI-3, PMI-2, PMI-15, PMI-18, PMI-19, PMI-11, PMI-14
	1.B	PM-4, Maradol
	1.C	PM-9
	1.D	PM-5
	1.E	PM-17
2		PM-12, PM-13, PM-16, PM-6
3		PMI-7
4		PMI-1

Pelo método UPGMA, observou-se que os resultados foram muito próximos aos obtidos pelo método de Tocher, principalmente quando se estabeleceu o limite de 42% de similaridade entre as progênies. Adotando este critério, houve formação de seis grupos (Figura 1). O grupo 1 foi formado pelas progênies que apresentaram níveis intermediários de resistência. No grupo 2 e 6, estão os genótipos que apresentaram maiores médias para as características de resistência à pinta-preta avaliadas. O grupo 4 alocou 3 das 4 progênies mais suscetíveis. A PMI-7 ficou em um grupo isolado, apresentando valores próximos dos valores do grupo das progênies mais resistentes.

Pelo método de Singh (1981), utilizado para avaliar a importância relativa das características quantitativas, as variáveis que mais explicaram a variação encontrada foram SPP7A (37,31%) e SPP7B (17,67%). A característica que menos contribuiu foi FIPP, com 9,73% (Tabela 5).



**Figura 1.** Dendrograma obtido pela análise de distância genética entre vinte 20 genótipos crioulos de mamoeiro e o genótipo Maradol pelo método UPMA, utilizando a medida de distância generalizada de Mahalanobis. Campos dos Goytacazes, 2015.

**Tabela 5.** Contribuição relativa de seis características relacionadas à pinta-preta do mamoeiro, para divergência genética, pelo Método de Singh (1981). Campos dos Goytacazes, UENF, 2015.

VARIÁVEL	VALOR(%)
IPP	12,13
SPP5A	10,54
SPP7A	37,31
SPP5B	12,63
SPP7B	17,67
FIPP	9,73

### 3.2.5. CONCLUSÕES

Houve variabilidade genética entre os genótipos avaliados.

Os genótipos PMI-1 e PMI-4 são os mais promissores quanto à resistência à pinta-preta e os mais indicados para serem utilizados no melhoramento visando à resistência a essa doença, pois apresentam menores valores médios de doença.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, F.B., Leal, N.R., Rodrigues, R., Amaral Júnior, A.T., Silva, D.J.H (2004) Divergência genética entre acessos de feijão-de-vagem de hábito de crescimento indeterminado. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 22(3):547-552.
- Adikaram, N.K.B., Wijepala, M. (1995) *Asperisporium* Black Spot in Carica papaya: a new disease in Sri Lanka. *Journal of the National Science Council of Sri Lanka*. 23(4): 213- 218.
- Agriannual, 2011 Anuário da Agricultura Brasileira: Mamão. São Paulo: FNP, 2011. P. 325-322.
- Araújo, P.M., Nass, L.L. (2002) Caracterização e avaliação de populações de milho crioulo. *Scientia Agricola*, 59(3):589-593.
- Badillo, V.M. (2001) Nota Corretiva Vasconcellea St. Hil. Y No Vasconcella (Caricaceae). *ERNSTIA*, Macaray, 11(1):75-76. .
- Badilo, V.M. (2002) Carica, L.,VS. VasconcellaSt.Hill.(Caricaceae) com la rehabilitacion de deste ultimo. *Ernestia*, 10:74-79..

- Barreto, L.F., Savan; P. A. L. Lima, L. L. de; Lodo, B.N (2011) Avaliação de fungicidas no controle de *Asperisporium caricae* na cultura do mamoeiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Volume especial, 33:399-403.
- Bentes, J.L da S., Costa Neto, P.Q. (2011) Variabilidade genética de *Colletotrichum guaranicola* usando marcadores AFLP. *Acta Amazonica*, 41(2):251-256.
- Brunelli, K.R., Fazza, A.C., Athayde Sobrinho, C., Camargo, L.E.A. (2006) Effect of culture media and light exposure on the sporulation of *Cercospora zeaemaydis*. *Summa Phytopatologica*, 32:92-94.
- Buainain, A.M., Batalha, M.O (2007). Cadeia produtiva de frutas / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Política Agrícola, Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura ; – Brasília : IICA : MAPA/SPA,. v.7, 102 p.
- Burdon, J.J. 1993. The structure of pathogen populations in natural plant communities. *Annual Rev. Phytopathol.* 31:305-323.
- Camargo Junior, O.A., Souza, E.A., Mendes-Costa, M.C.; Santos, J.B.; Soares, M.A. (2007) Identification of *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* recombinants by RAPD markers. *Genetic and Molecular Research*, Ribeirão Preto, 6(3):607-615.
- Camera, J.N., Deuner, C.C., Danelli, A L.D., Reis, E.M. (2014) Desenvolvimento de *Passalora sojina* em diferentes meios de cultura e regimes luminosos *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, 35(4):1793-1800.
- Cardoso, J.E., Wilkinson, M.J. (2008) Development and characterisation of microsatellite markers for the fungus *Lasiodiplodia theobromae*. *Summa Phytopathologica*, 34:55-57.
- Carlier, J., Hayden, H., Rivas, G., Zapater, M.-F., Abadie, C., Aitken, E. (2003) Genetic differentiation in *Mycosphaerella* leaf spot pathogens. In: Workshop

on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San Jose, 2002, Costa Rica. *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook, 123-129.p.

Carnaúba, J.P., Sobral, M.F., Amorim, E.P. da R., Silva, J.C., Santos, V.B., Félix, K.C. da S.(2007) Avaliação de diferentes meios de cultura na esporulação de *Scytalidium lignicola*. *Summa Phytopathologica*, 33(2):199-200.

Chambers, K.R., Rijkenberg, F.H.J (1987) Culture of *Asperisporium caricae* , the papaya black spot organism. *Phytophylactica*, 19(1):113.

Cruz, C. D.; Regazzi, A. J.; Carneiro, P. C. S (2012) Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. v. 1, 4. ed. Viçosa: UFV, 514 p.

Cruz, C.D. (2013) GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum*. 35(3):271-276.

Cumagun, C.J.R.; Padilla, C.L (2007) First record of *Asperisporium caricae* causing black spot of papaya in the Philippines. *Australasian Plant Disease Notes*, 2, 89–90.

Dantas, J.L.L., Castro Neto, M.T. de. (2000) Aspectos botânicos e fisiológicos. In: A.V. Trindade (org.) Mamão. Produção: Aspectos técnicos. p. 11-14. Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. Frutas do Brasil, 3. Brasília, DF

Dantas, J.L., LIMA, J.F.de. (2001) Seleção e recomendação de variedades de mamoeiro - avaliação de linhagens e híbridos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 23(3):617-621.

Dantas, J.L.L.; Dantas, A.C.V.L.; Lima, J. F. (2002) Melhoramento de fruteiras tropicais. Viçosa, UFV. p. 422.



- Dias, N.L.P., Oliveira, E J., Dantas, J.L.L. (2011) Avaliação de genótipos de mamoeiro com uso de descritores agronômicos e estimação de parâmetros genéticos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 46(11):1471-1479.
- Dianese, A.C.; Blum, L.E.B.; Dutra, J.B.; Lopes, L.F.; Sena, M.C.; Freitas, L.F.; Yamanishi, O.K. (2007) Reação de Genótipos de Mamoeiro à Variola e à Podridão-do-pé. *Fitopatologia Brasileira*, 32:419-423.
- Dianese, A.C.; Blum, L.E.B.; Dutra, J.B.; Lopes, L.F.; Sena, M.C, Freitas, L.F. (2008) Avaliação do efeito de fosfitos na redução da variola (*Asperisporium caricae*) do mamoeiro (*Carica papaya*). *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 30(3):834-837.
- Dhingra, O.D., Sinclair, J.B (1994) Basic plant pathology methods. Boca Raton: CRC Press, 1994 434p.
- Faleiro, F.G., Cruz, C. D., Ragagnin, V.A., Souza, T.L.P.O., Moreira, M.A.; Barros, E. G.de (2001) Estimativas de parametros geneticos, correlacoes e analise de trilha em linhagens endogamicas recombinantes de feijoeiro-comum *Agrotropica*, Ilheus, Bahia, 13(3):115-124.
- FAOSTAT (2013) – Food and Agriculture Organization. Area harvest, yield and production in 2010/ FAOSTAT/FAO Statistics Division. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/default.asp#ancor>. Acessado em: 31 de agosto de 2015.
- FAO.(2013) Food and agriculture organization of the United Nations for a worldwithout hunger. Area harvest, yield and production in 2011/ FAOSTAT/FAO Statistics Division. Disponível em:<<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>.Acessado em: 1. Outubro de. 2015.
- Griffin, D. H. Fungal Fisiology.(1994) Ed. New York. Wiley-Liss, Inc.

- Groenewald, M., Groenewald, J. Z., Linde, C. C., Crous, P. W. (2007) Development of polymorphic microsatellite and single nucleotide polymorphism markers for *Cercospora beticola* (Mycosphaerellaceae) *Molecular Ecology Notes*, 7(5):890–892.
- Gupta, M., Chyi, Y. S., Romero-Severson, J., Owen, J.L. (1994) Amplification of DNA markers from evolutionary diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.* 89:998-1006.
- Halkett, F., COSTE, D., Rivas Platero, G. G., Zapater, M. F., ABADIE, C., CARLIER, J. (2010). Genetic discontinuities and disequilibria in recently established populations of the plant pathogenic fungus *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology*, 19:3909-3923.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2013) Produção Agrícola Municipal. Disponível em: <http://Sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisa/pam/default.asp>. Acessado em: 30 de outubro de 2015.
- Johnston, A., Booth, C (1983) *Pant Pathologist's Pocketbook*. 2 ed. Commonwealth Mycological Institute. 439p.
- Koshikumo, E. S. M. (2011) Identificação molecular e morfológica, métodos de esporulação, indução e detecção de cercosporina das espécies de cercospora do milho. 109 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Liberato, J. R.; Zambolim, L. (2002) Controle das doenças causadas por fungo, bactérias e nematóides em mamoeiro. In: ZAMBOLIN, L.; VALE, F. X. R.; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H. (Eds). *Controle de doenças de plantas: fruteiras*. Suprema Gráfica e Editora, Viçosa, v.2, p. 1023-1170.
- Londres, F. (2014) Sementes da diversidade: a identidade e o futuro da agricultura familiar. *Revista Agriculturas: experiências em agroecologia*, 11(1).4-8.

- Marin, S. L. D.; Gomes, J. A. (1986) Morfologia e biologia floral do mamoeiro. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 12(134): 10-14.
- Marin, S. L. D., Gomes, J. A., Silva, J. G. F, Salgado, J. S. (1994) Comportamento de preços de mamão do grupo Solo no região do Espírito Santo destinados aos mercados nacional e internacional. In:Congresso Brasileiro de Fruticultura, 13., Salvador. Resumos... Salvador: Sociedade Brasileira de Fruticultura. P.665.
- Martelleto, L. A. P.; Ribeiro, R. L. D.; Carmo, M. G. F.; Sudo-martelleto, M.; GOES, A. (2009) Incidência da varíola, causada por *Asperisporium caricae*, em folhas de mamoeiros submetidos ao manejo orgânico, em diferentes ambientes de cultivo. Summa Phytopathologica, 35(4):288-292.
- Martins, D. dos S., Costa, A. N., Costa, A. de F. S. da (2007) Papaya Brasil: Manejo, Qualidade e Mercado do Mamão. Vitória, ES: Incaper, 704p.
- Martins, M. V. V., Lima, J. S., Lima, F. A., Viana, F. M. P. (2012) Monitoramento, Sanitização e Controle Químico no Manejo da Mancha-de-Corynespora do Mamoeiro Fortaleza, Embrapa Agroindústria Tropical, 19 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 69). Disponível em: [http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/down/index.php?pub/Bd\\_69.pdf](http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/down/index.php?pub/Bd_69.pdf). Acessado: 30 de agosto de 2015.
- Maublan, A (1913) Uma moléstia do mamoeiro (*Carica papaya* L.). Boletim do Ministério da Agricultura Indústria e Comércio. Rio de Janeiro 2(1):126-130.
- Medina, V.M.; Cordeiro, Z.J.M. (1994) Mamão para exportação: aspectos técnicos da produção. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 52p.
- Meeboon, J., Hidayat, I., To-anun, C. (2007) An annotated list of cercosporoid Fungi in Northern Thailand. Journal of Agricultural Technology Agricultural Technology. 3(1): 51-63.

- Minnis, A. M.; Kennedy, A. H.; Grenier, D. B.; Rehner, S. A.; Bischoff, J. F. (2011) *Asperisporium* and *Pantospora* (Mycosphaerellaceae): epitypifications and phylogenetic placement. *Persoonia*, 27, p.1–8.
- Moraes, W. B.; Moraes, W. B.; Cosmi, F. C.; Jesus Junior, W. C.; Cecilio, R. A.; Valadares Júnior, R.; Souza, A. F. (2011) Análise de risco sobre o impacto das mudanças climáticas globais na distribuição espacial da pinta preta do mamoeiro no Brasil. *Nucleus*, 8(2):115-126.
- Neitzke, R.S, Barbieri, R.L., Heiden G., Büttow M.V., Oliveira, C.S., Corrêa, L.B., Schwengber, J.E., Carvalho, F.I.F. (2009) Caracterização morfológica e dissimilaridade genética entre variedades crioulas de melão. *Horticultura Brasileira*, 27:534-538.
- Nogueira, E.M.C.; Ferrari, J.T.; Domingues, R.J.; Tófoli J.G. (2011) A ação do fungicida Flutriafol no controle da Varíola na cultura do mamão. *Biológico, São Paulo*, 73(1):39-42.
- Oliveira, E.J., Dantas, J.L.L., Castellen, M. da S. (2007) Conservação e uso do germoplasma de mamoeiro na Embrapa. In: Grupo cultivar. Artigos técnicos: fruticultura. Acesso em: 22 de março de 2015.
- Oliveira, A. A. R.; Santos Filho, H. P.; Sanches, N. F.; Cruz, J. L.; Oliveira, A. M. G.; Andrade, P. R. O. de.; Lopes, F. F. Monitoramento da pinta preta do mamoeiro no município de Itamaraju, BA, com ênfase na produção integrada. In: Simpósio do Papaya Brasileiro, 4., 2009, VITÓRIA-ES. Pesquisa científica e a crise no mercado do mamão: anais... Vitória: Incaper, 2009. 1 CD-ROM.
- Oliveira, E.J., Amorim, V.B.O., Matos, E.L.S., Costa, J.L., Castellen, M.S., Pádua, J.G., Dantas, J.L.L. (2010) Polymorphism of microsatellite markers in papaya (*Carica papaya* L.). *Plant Molecular Biology Reporter*, 28:519-530.

- Oliveira, J. G.; Vitória, A. P. (2011) Papaya: Nutritional and pharmacological characterization, and quality loss due to physiological disorders. An overview. *Food Research International*, v.44, p.1306–1313.
- Oliveira, E.J de., Costa, J.L., Santos, L.F., Carvalho, F.M., Silva, A.S., Dantas, J.L. L. (2011) Caracterização molecular de genótipos de mamoeiro com uso de marcadores do tipo AFLP. *Revista Brasileira de fruticultura*, 33(3):848-858.
- Peakall, R., Smouse, P.E. (2012) GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics*, 28: 2537-2539.
- Pereira, A.T .B., SOUZA, R. F., SOUSA, N. R., GASPAROTTO, L., HANADA, R. E., SILVA, G. F (2010). Diversidade genética *Mycosphaerella fijienses* no Estado do Amazonas. Anais da VI Jornada da Iniciação científica da Embrapa Amazônia Ocidental.
- Perez, N.B., Agnol, M.D. (2009) Características morfológicas de plantas de alfafa relacionadas à aptidão ao pastejo. *Revista Brasileira Zootecnia*, 38(3):418-421.
- Pinho, D. B., Firmino, A L., Ferreira-junior, Walnir G., Pereira, Olinto L. (2012) An efficient protocol for DNA extraction from *Meliolales* and the description of *Meliola centellae* sp. nov. *Mycotaxo*, 122:333–345.
- Pinho, D. B., Dutra, D C., Pereira, Olinto L. (2013) Notes on *Ceratocystis paradoxa* causing internal post-harvest rot disease on immature coconut in Brazil, *Tropical Plant Pathology*, 38(2):152-157.
- Pulz, P.; Massola Jr., N.S. (2009) Efeito de meios de cultura e fatores físicos no crescimento e esporulação de *Alternaria dauci* e *A. solani*. *Summa Phytopathologica*, 35(2):121-126

- Rao, C.R. (1952) An advanced statistical methods in biometric research. New York: J. Wiley, 330p.
- Reddy, M. P., Sarla, N., Siddiq, E. (2002) A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, Dordrecht, 128:9-17.
- Rezende, J. A. M.; Fancelli, M.I. (1997) Doenças do mamoeiro (*Carica papaya* L.). In: Kimati H, Amorim L, Bergamin Filho A, Camargo LEA, Rezende JAM (Eds.) Manual de Fitopatologia. Doenças das plantas cultivadas. São Paulo SP. Agronômica Ceres. p. 486-496.
- Rezende, J. A. M.; Martins, M. C. (2005) Doenças do mamoeiro (*Carica papaya* L.). In: Kimati H, Amorim L, Bergamin Filho A, Camargo LEA, Rezende JAM (Eds.) Manual de Fitopatologia. Doenças das plantas cultivadas. São Paulo SP. Agronômica Ceres. p. 435-443.
- RIVAS, G.G., Zapater, M. F., Abadie, C., Carlier., Jean (2004) Founder effects and stochastic dispersal at the continental scale of the fungal pathogen of bananas *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology*, 13:471-482.
- Robert, S.; Rieux, A.; Argout, X.; Carlier, J.; Zapater, M-F (2010) Optimized genotyping with microsatellite markers in the fungal banana pathogen *Mycosphaerella fijiensis* (Mycosphaerellaceae). *American Journal of Botany*: 97:130-132.
- Rodrigues, R., Santos, M.H. (2011) Agrobiodiversidade, germoplasma e melhoramento de plantas. In: Estratégias em melhoramento de plantas. Viçosa, MG: Arka, 134p.
- Santana, E.N. Controle químico das doenças fúngicas do mamoeiro em pré e póscolheita pelo uso de fungicidas e ceras. 2004. Tese (Doutorado em Fitopatologia) Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG.

- Santos, M. C., Barreto, M.(2003) Estudo epidemiológico da varíola do mamoeiro em cultivares submetidos a tratamentos com fungicidas. *Summa Phytopathologica* 29:141-146.
- Santos Filho, H.P., Oliveira, A.A.R., Noronha, A.C.S., Sanches, N.F., Lopes, F.F., Andrade, P.R.O., Osório, A.C.B., Souza, J.A., Oliveira, A.M.G., Santos, M.J. (2007) Monitoramento e controle da Pinta-preta do mamoeiro. Cruz das Almas: Embrapa,. 5p. (Comunicado técnico 125b).
- Santos, V. J. dos., Dantas, A. C. V. L., Vilarinhos, A. D., Oliveira, A. A., Santos Filho, H. P., Sousa, C. S., Almeida, V. de O., Feitosa, W., Alves, A (2008). Uma técnica para obter esporulação de *A. caricae*. In: SEMINÁRIO DE PESQUISA DO RECÔNCAVO DA BAHIA, 2.; SEMINÁRIO ESTUDANTIL DE PESQUISA DA UFRB, 2.; SEMINÁRIO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFRB, 2., 2008, Cruz das Almas, BA. Sustentabilidade ambiental e qualidade de vida. Cruz das Almas: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.
- Serrano, L.A.L., Cattaneo, L.F. (2010) O cultivo do mamoeiro no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 32(3)657-959.
- Silva, C. M. da (2009) Análise da diversidade genética por marcadores RAPD e SSR em *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* no Estado de Santa Catarina. Tese. Universidade Federal de Santa Catarina.
- Silva, L. G. (2010) Isolamento e crescimento de *Asperisporium caricae* e sua relação filogenética com *Mycosphaerellaceae*. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais. 58p.
- Silva, C. M. da., Hinzi, R. H., Stadnik, M. J., Pereira, A., Tcacenco, F. A. (2010) Diversidade genética por marcadores moleculares em *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* no Estado de Santa Catarina. *Ciência Rural*, Santa Maria, 40(12):2480-2485.

- Singh, D.(1981) The relative importance of characters affecting genetic divergence. *The Indian Journal of Genetics e Plant Breeding*, 41:237-245.
- Simón, M. R., Cordo, C. A. , Castillo, N. S. , Struik, P. C. Börner, Andreas (2012) Population structure of *Mycosphaerella graminicola* and location of genes for resistance to the pathogen: Recent Advances in Argentina, *International Journal of Agronomy*. P.1-7.
- Souza, J. S. (2000) Aspectos socioeconômicos. In: Mamão Produção: Aspectos técnicos. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA. Brasília-CNPMT, 77p. (Frutas do Brasil).
- Souza, B. S., Durigan, J. S. Donadon, J. R., Teixeira, G. H. A. (2005) Conservação de mamão “Formosa minimamente processado armazenado sob refrigeração. *Revista brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal-SP,27(2):273-273.
- Souza, S. A. M. (2007) MAMÃO NO BRASIL: distribuição regional da produção e comportamento dos preços no período 1996-2005. *Informações Econômicas*, 37(9)
- Souza, B. O. de., Souza, E. A. de., Mendes-Costa, M.C.(2007). Determinação da variabilidade em isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de marcadores morfológicos e culturais. *Ciências agrotecnologia* 31(4):1000-1006.
- Souza, M.G., Pereira, J.C.R., Garcia, M.V.B., Kano, C., Bioso, P.S.T. (2014) Primeiro relato de Pinta-preta, causada por *Asperiporium caricae*, em Mamoeiro no Amazonas. *Comunicado técnico* 109.
- Storey, W. B. (1953) Genetics of the papaya. *Jour. Hered.*, 44: 70-78.
- Suzuki, M. S., Zambolim, L., Liberato., J. R. (2007) Progresso de doenças fúngicas e correlação com variáveis climáticas em mamoeiro. *Summa Phytopathologica*,33(2): 167-177.



- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Masatoshi, N., Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28(10): 2731–2739.
- Terra, C. E. P. S. (2009) Avaliação de genótipos e indutores de resistência no controle da pinta preta do mamoeiro. Dissertação (Mestrado em produção vegetal) - Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do norte Fluminense - UENF, 71p.
- Ventura, J. A.; Costa, H.; Tatagiba, J.S. (2003) Manejo das doenças do mamoeiro. In: Martins, D.S., Costa, A.F.S. (Ed.). A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção. Vitória, ES: Incaper. p. 229-308.
- Vivas M (2009) Avaliação de germoplasma e híbridos de mamoeiro quanto à resistência a doenças causadas pelos fungos *Asperisporium caricae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Oidium caricae* e *Phoma caricae-papayae*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Campos dos Goytacazes
- Vivas, M., Terra, C.E.P.S., Silveira, S.F., Fontes, R.V., Pereira, M.G. (2010). Diagrammatic scale for assessing severity of back-spot in papaya fruit. *Summa Phytopathologica*, 36:161-163.
- Vivas, M.; Silveira, S.F.; Terra, C.E.P.S.; Pereira, M.G. (2011) Testers for combining ability and selection of papaya hybrids resistant to fungal diseases. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 11:36-42.
- Vivas, M., Silveira, S.F., Vivas, J.M.S., Pereira, M.G. (2012) Patometria, parâmetros genéticos e reação de progênies de mamoeiro à Pinta-preta. *Bragantia* (São Paulo, SP), 71:235-238.

- Vivas, M., SILVEIRA, S.F., VIVAS, J.M.S., PEREIRA, M.G. (2013b) Predição de ganhos genéticos e seleção de progênie de mamoeiro para resistência à Pinta-preta. *Tropical Plant Pathology*, 38:142-148.
- Vivas, M., Silveira, S.F., Viana, A.P., Amaral Junior, A.T., Cardoso, D.L., Pereira, M. G.(2014) . Efficiency of circulant diallels via mixed models in the selection of papaya genotypes resistant to foliar fungal diseases. *Genetics and Molecular Research* , 13:4797-4804.
- Vivas, M., Silveira, S.F., Viana, A.P., Amaral Junior, A.T., Ferregueti, G. A., PEREIRA, M.G. (2015) Resistance to multiple foliar diseases in papaya genotypes in Brazil. *Crop Protection*, 71:138-143.
- Zambolim, L., Junqueira, N. T. V., Zambolim, E. M. Manejo integrado de doenças de fruteiras. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 19., 2006, Cabo Frio, RJ. Frutas do Brasil: saúde para o mundo.Cabo Frio: SBF/UENF/UFRural-RJ, p. 19-35.
- Zauza, E. A. V., Alfenas, A. C., Mafia, R. G (2007). Esterilização, preparo de meios de cultura e fatores associados ao cultivo de fitopatógenos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G.; (Ed.). Métodos em fitopatologia. Viçosa, MG: UFV, p. 23-50.
- Zeven, A.C (1998) Landraces: A review of definitions and classifications. *Euphytica*, 104(2):127-139.
- Wolcan, S., Rollán, C., Ronco,L. (2006) Leaf spot of cultivated and wild *Alstroemeria* spp. caused by *Asperisporium alstroemeriae*. *Australasian Plant Disease Notes* v. 1, P.33–35.