

LARISSA GOMES DA SILVA

ISOLAMENTO E CRESCIMENTO DE *Asperisporium caricae* E SUA  
RELAÇÃO FILOGENÉTICA COM *Mycosphaerellaceae*

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Fitopatologia, para obtenção  
do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL

2010

LARISSA GOMES DA SILVA

ISOLAMENTO E CRESCIMENTO DE *Asperisporium caricae* E SUA  
RELAÇÃO FILOGENÉTICA COM *Mycosphaerellaceae*

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Fitopatologia, para obtenção  
do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 23 de fevereiro de 2010.

---

Prof.<sup>o</sup> Eduardo Seiti Gomide Mizubuti  
(Co-orientador)

---

Pesq. Harold Charles Evans

---

Pesq. Trazilbo José de Paula Júnior

---

Pesq. Robson José do Nascimento

---

Prof.<sup>o</sup> Olinto Liparini Pereira  
(Orientador)

À toda a minha família,  
sobretudo aos meus pais, Gilberto e Márcia, pelo apoio incondicional, e  
Aos meu irmãos, Thami e Julian, pelo carinho e incentivo, e  
também ao meu namorado Caio pelo estímulo e carinhosa cumplicidade

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela orientação divina e por me proporcionar força nos momentos de desestímulo e solução nas horas aflitas.

À minha família pelo amor, companheirismo, pelos ensinamentos sábios e pela presença e incentivos constantes, principalmente aos meus pais e irmãos por sempre estarem prontos a me ouvir e vibrarem com as minhas conquistas.

Ao meu namorado Caio, pelo eterno carinho, cumplicidade, apoio e por sempre ter uma palavra de conforto nos momentos mais difíceis, me incentivando para seguir em frente.

Ao Prof<sup>o</sup> Olinto Liparini Pereira pela paciência, dedicação, entusiasmo, companheirismo, incentivo, e principalmente confiança para a execução deste trabalho.

Ao Prof<sup>o</sup> Eduardo S. G. Mizubuti e Prof<sup>o</sup> Robert W. Barreto pela disponibilidade de toda a infraestrutura presente em seus laboratórios, pelos conselhos, sugestões e ensinamentos.

À Dra. Tatiana Rodrigues, minha “mãe científica”, agradeço pela fraterna amizade e carinhosa atenção, sempre disposta a me auxiliar e compartilhar seus ensinamentos.

Aos amigos do laboratório de patologia de sementes e de pós-colheita por tornar o trabalho muito prazeroso, pelas risadas, conselhos e eterno companheirismo.

Aos amigos do laboratório de biologia de populações de fitopatógenos, por sempre estarem dispostos a ajudar nos momentos aflitos, pelas preciosas sugestões, pelas risadas e amizades.

Às minhas companheiras de república pela amizade, e momentos agradáveis, principalmente no café da tarde.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos.

Aos colegas, amigos e funcionários do Departamento de Fitopatologia e por todos aqueles que contribuíram para que fosse possível a realização desta conquista.

À Universidade Federal de Viçosa, por contribuir com a minha formação profissional e pela oportunidade.

À CAPES pela concessão da bolsa e ao CNPq pelo financiamento do projeto.

À todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho e conquista dessa etapa.

Muito obrigada!

## BIOGRAFIA

LARISSA GOMES DA SILVA, filha de Gilberto Gomes da Silva e Márcia de Almeida Gomes da Silva, nasceu em Poços de Caldas, Minas Gerais, em 29 de maio de 1983.

Em março de 2003, ingressou no curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Lavras, graduando-se em 28 de setembro de 2007. No período de 2005 a 2007, foi bolsista de iniciação científica (FAPEMIG) executando trabalhos na área de Fitopatologia, em ênfase em micologia e biologia molecular de fungos, tendo experiência também com fungos endofíticos e de solo.

Em março de 2008 iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em 23 de Fevereiro de 2010.

## ÍNDICE

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. <i>Carica papaya</i> .....	3
2.2. Varíola do mamoeiro .....	5
2.3. <i>Asperisporium caricae</i> .....	6
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1. Obtenção dos isolados .....	10
3.2. Caracterização Morfológica.....	11
3.2.1. Crescimento em diferentes meios de cultura .....	12
3.2.1.1. Avaliações e Análises estatísticas.....	13
3.2.2. Esporulação dos isolados .....	14
3.3. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	14
3.3.1. Extração e amplificação do DNA.....	15
3.3.2. Sequenciamento e análise filogenética .....	16
4. RESULTADOS.....	24
4.1. Caracterização morfológica.....	24
4.1.1. Crescimento em diferentes meios de cultura .....	27
4.1.2. Esporulação dos isolados.....	29
4.2. Caracterização molecular .....	30
5. DISCUSSÃO .....	46
6. CONCLUSÕES .....	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51

## RESUMO

SILVA, Larissa Gomes. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. Isolamento e crescimento de *Asperisporium caricae* e sua relação filogenética com *Mycosphaerellaceae*. Orientador: Olinto Liparini Pereira. Co-orientadores: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti e Robert Weingart Barreto.

O Brasil é o maior produtor mundial de mamão e o terceiro maior exportador da fruta. O mamoeiro pode ser afetado por diversas doenças que inviabilizam a sua comercialização e, conseqüentemente, a exportações de frutos. Dentre as doenças fúngicas, a varíola, ou pinta preta, causada por *Asperisporium caricae*, é uma das doenças que afetam os pomares em todas as regiões produtoras. Interfere diretamente na rentabilidade e viabilidade da produção, pois, além de incidir em folhas, pode também causar lesões na superfície dos frutos, tornando-os inadequados para a comercialização. Trabalhos referentes à biologia do fungo são quase inexistentes, bem como sobre o posicionamento filogenético da espécie. *A. caricae* é considerado por muitos autores como biotrófico, baseado na dificuldade de cultivo e esporulação *in vitro*. Alguns aspectos taxonômicos do gênero *Asperisporium* são controversos, como a comprovação de *Mycosphaerella* como teleomorfo, o relacionamento filogenético com os demais gêneros do complexo cercosporóide e a separação de *Asperisporium* do gênero *Passalora*. Outros autores relacionam *M. caricae* ao anamorfo *Phoma caricae-papaya* (= *Ascochyta caricae-papayae*), agente etiológico da podridão peduncular. Contudo, por meio dos manuais de identificação os gêneros *Phoma* e *Ascochyta* estão relacionados ao teleomorfo *Didymella*. A distinção entre os gêneros *Didymella* e *Mycosphaerella* está na presença de pseudoparáfises neste último, sendo esta característica dificilmente visualizada em cortes histológicos em microscópio de luz, deste modo, sendo passível o equívoco no momento da identificação. Os objetivos do trabalho foram: realizar o isolamento de *A. caricae* em cultura pura, analisar o crescimento e a capacidade de esporulação dos isolados em sete diferentes meios de cultura e proceder a caracterização morfológica dos isolados; verificar a relação entre *Asperisporium caricae* e *Mycosphaerella caricae* por meio da comparação de nucleotídeos de três regiões do DNA (ITS do rDNA, LSU e mtSSU), assim como o relacionamento filogenético com os demais gêneros pertencentes ao complexo cercosporóide, por meio da comparação das sequências obtidas com as sequências publicadas em bancos de dados. Foi possível o cultivo de *A. caricae* em todos os meios de cultura testados, sendo que os meios de

cultura batata-dextrose-ágar, suplementado ou não com aminoácidos, foram os que proporcionaram melhor desenvolvimento ao fungo. Além disso, a espécie produziu esporos *in vitro* em todos os meios de cultura testados, exceto no meio composto por folhas de mamão. Por meio dos dados moleculares e dos agrupamentos obtidos, pode-se concluir que *A. caricae* pertence à família *Mycosphaerellaceae*, agrupando com espécies de *Passalora* verdadeiras e de *Mycosphaerella*. *M. caricae* agrupou-se com espécies pertencentes ao gênero *Phoma*, *Didymella* e *Ascochyta*, representantes da ordem *Pleosporales*. Com isso, é possível que *M. caricae* seja uma espécie de *Didymella*, e teleomorfo de *Phoma caricae-papayae*.

## ABSTRACT

SILVA, Larissa Gomes. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2010. Isolation and growth of *Asperisporium caricae* and their phylogenetic relationship with *Mycosphaerellaceae*. Advisor: Olinto Liparini Pereira. Co-advisors: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti and Robert Weingart Barreto.

Nowadays, Brazil is the largest producer of papaya and the third largest exporter of fruit in the world. Papaya can be affected by various diseases that prevent them from being marketed and, consequently, the exportation of the fruit. Among the fungal diseases, smallpox, or blight, caused by *Asperisporium caricae*, is one of the diseases that affect the orchards in all regions. This disease interferes directly in the profitability and viability of the production. Beyond its incidence on leaves, it can also cause lesions on the fruit surface, making them unsuitable for marketing. It's almost impossible to find publications related to the biology of the fungus and to the phylogenetic position of the species. *A. caricae* is considered by many authors as a biotrophic pathogen, based on the difficulty of cultivation and sporulation *in vitro*. Some aspects of the taxonomic genus *Asperisporium* are controversial, such as proving *Mycosphaerella* as a teleomorph organism, the phylogenetic relationships with other genera of the complex cercosporoidal and the separation of the genus *Asperisporium* from *Passalora*. Other authors relate *M. caricae* to the anamorph *Phoma caricae-papaya* (= *Ascochyta carica-papaya*), causal agent of stalk rot. However, through the manual identification the genera *Phoma* and *Ascochyta* are related to the teleomorph *Didymella*. The differences between the genders *Didymella* and *Mycosphaerella* is the presence of pseudo paraphyses in the last one. This feature is difficult to visualize in histological sections under a light microscope, thus being liable to misunderstand at the time of identification. The aims of the study were the isolation of *A. caricae* in pure culture, examining the growth and sporulation of the isolates in seven different media and make a morphological characterization of isolates. Beyond these, other aim was to verify the relationship between *Asperisporium caricae* and *Mycosphaerella caricae* by comparing nucleotides of three DNA regions (ITS rDNA, LSU and mtSSU) and the phylogenetic relationships with other genera of the complex cercosporoidal, by comparing the sequences obtained to sequences published in databases. It was possible to cultivate *A. caricae* in all tested media. The culture medium potato dextrose agar, supplemented or not with amino acids, were those who presented the best source to the fungus. Moreover, the species produced spores *in vitro* in all tested media, except in the

medium consisting of papaya leaves. Through the molecular data and clusters obtained, it can be concluded that *A. caricae* belongs to the family *Mycosphaerellaceae* grouping it with species of true *Passalora* and *Mycosphaerella*. *M. caricae* was grouped with species of the genus *Phoma*, *Ascochyta* and *Didymella*, representatives of the order *Pleosporales*. Thus, it is possible that *M. caricae* is a species of *Didymella* and teleomorph of *Phoma carica-papaya*.

## 1. INTRODUÇÃO

O mamoeiro, *Carica papaya* L., é uma planta que tem como centro de origem as regiões tropicais e subtropicais da América do Sul. O Brasil é o principal produtor mundial desta fruteira, favorecido pela temperatura, umidade elevada, pelos nutrientes adicionados e pela drenagem do solo (Martins, 2000).

O mamoeiro pode ser afetado por diversas doenças que inviabilizam a sua comercialização e, conseqüentemente, as exportações de frutos para outros mercados (Nishijima, 1994). Dentre as doenças ocasionadas por fungos, a varíola do mamoeiro, ou pinta preta, causada por *Asperisporium caricae* (Speg.) Maubl., é uma das doenças que afetam os pomares em todas as regiões produtoras. Interfere diretamente na rentabilidade e viabilidade da produção, pois, além de incidir em folhas, pode também causar lesões na superfície dos frutos, tornando-os inadequados para a comercialização.

O gênero *Asperisporium* pertence ao grupo dos cercosporóides, constituídos pelos anamorfos de *Mycosphaerella*, tendo como espécie-tipo *Asperisporium caricae*. Trabalhos referentes à biologia do fungo são quase inexistentes, bem como sobre o posicionamento filogenético da espécie.

*A. caricae* é considerado por muitos autores como biotrófico, baseado na dificuldade de cultivo e esporulação *in vitro*. Alguns aspectos taxonômicos do gênero *Asperisporium* são controversos, como a comprovação de *Mycosphaerella caricae* como teleomorfo, o relacionamento filogenético com os demais gêneros do complexo cercosporóides pertencentes à família *Mycosphaerellaceae* e a separação de *Asperisporium* do gênero *Passalora* (Crous *et al.*, 2001).

Outros autores associam *M. caricae* ao anamorfo *Phoma caricae-papayae* (Tarr) Punith., agente etiológico da podridão peduncular (Punithalingam, 1980; Persley e

Ploetz, 2003). O status taxonômico de *Phoma caricae-papayae* é considerado fonte de controvérsia, uma vez que a literatura fitopatológica muitas vezes se refere à essa espécie como sendo *Ascochyta caricae-papayae* Tarr ou *Ascochyta caricae* Pat. (Boerema *et al.*, 2004). *Phoma caricae-papayae* foi relacionada como anamorfo de *M. caricae* por Ullasa *et al.* (1974) através das observações de peritécios de *M. caricae* e picnídios de *P. caricae-papayae* presentes no mesmo material vegetal. Entretanto, do mesmo modo que em *A. caricae*, esta conexão nunca foi comprovada.

Deste modo, os objetivos do presente trabalho foram: i.) realizar o isolamento de *A. caricae* em cultura pura, analisar o crescimento e a capacidade de esporulação dos isolados em sete diferentes meios de cultura e proceder a caracterização morfológica dos isolados; ii.) verificar a relação entre *Asperisporium caricae* e *Mycosphaerella caricae* por meio da comparação de nucleotídeos de três regiões do DNA (ITS do rDNA, LSU e mtSSU), assim como o relacionamento filogenético com os demais gêneros pertencentes ao complexo cercosporóide, por meio da comparação das sequências obtidas com as sequências publicadas em bancos de dados.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. *Carica papaya*

O mamoeiro é uma dicotiledônea da família *Caricaceae*, dividida em cinco gêneros: *Carica*, *Cylicomorpha*, *Horovitzia*, *Jaracatia*, e *Jarilla* (Souza e Lorenzi, 2005). Badillo (2000) recomendou a divisão do gênero *Carica* em dois gêneros: *Carica*, contendo somente a espécie *Carica papaya*, e *Vasconcellea*, possuindo 21 espécies, sendo esta revisão baseada nas diferenças morfológicas e análises moleculares encontradas somente em *C. papaya*, frente ao relativo distanciamento com os demais membros do gênero. Em número de espécies, temos o gênero *Jaracatia* com 6 espécies; *Cylicomorpha* com 2 espécies e *Jarilla* constituída de apenas 1 espécie (Persley e Ploetz, 2003).

Além disso, o mamoeiro tem como centro de origem o noroeste da América do Sul, com condições de clima, temperatura e umidade favoráveis ao seu desenvolvimento. O cultivo do mamão predomina em clima quente e úmido (Nakasome e Paul, 1998) e precipitação pluviométrica de 1500 mm anuais, com boa distribuição mensal (Persley e Ploetz, 2003).

As propriedades do solo que permitem o crescimento do mamoeiro são a boa drenagem, para evitar problemas de podridão de raiz; pH ótimo dentro da faixa de 5,5-6,5 e solo demandando uma fonte balanceada de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e micronutrientes (Ross e Chay-Prove, 2000).

O cultivo do mamoeiro está amplamente distribuído em várias regiões do mundo, tendo alcançado em 2001 uma produção mundial de 6.753.240 toneladas em uma área colhida de 389.172 hectares (FAO, 2006). Os principais países produtores são: Brasil; México; Nigéria; Indonésia; Índia; Etiópia; Congo; Peru; China; Venezuela

(FAO, 2006). O Brasil é o principal produtor mundial desta fruteira, favorecido pela temperatura, umidade elevada e solos férteis e bem drenados (Martins, 2000).

Na década de 70, a produção do mamão tornou-se ameaçada pela ocorrência da virose mosaico do mamoeiro, detectada na região de Monte Alto e municípios vizinhos no estado de São Paulo (Costa *et al.*, 1969). No final desta mesma década, São Paulo e Rio de Janeiro eram responsáveis por cerca de cinco mil hectares. Porém, em 2000, esses mesmos estados produziam apenas cerca de 350 hectares em função da ocorrência desse vírus. Com isso, a presença da virose nos pomares destes estados provocou o deslocamento da região produtora para o Espírito Santo, Bahia e outros estados onde o mosaico estivesse ausente (Souza, 2000).

Em 2006, o Brasil produziu 1,5 milhão de toneladas, contribuindo com 24% da produção mundial (IBGE, 2007). No ano de 2007, a área plantada atingiu, 34.973 hectares, produzindo cerca de 1.811.535 toneladas de mamão, apresentando um rendimento médio de 52.087 Kg de fruto/hectare. Com relação ao ano de 2006, houve um aumento no valor da produção de 14,7% e os maiores produtores nacionais foram os estados da Bahia, Espírito Santo, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pará (IBGE, 2007).

Em 2008, devido a um período climático desfavorável, houve uma retração da área plantada nas regiões tradicionais caracterizado pelo clima quente e seco, com isso, a área plantada foi de 23.919,00 ha., ocasionando uma redução de 6% da área cultivada no Espírito Santo. De janeiro a outubro de 2008, foram exportadas cerca de 26 mil toneladas de mamão, volume semelhante ao do mesmo período de 2007 (Anuário Hortifruti Brasil, 2008).

Atualmente, o Brasil é o terceiro maior exportador da fruta, respondendo por aproximadamente 25% da produção mundial, com 1,6 milhão de toneladas/ano. O

mamão é a sétima fruta “in natura” mais exportada no País, sendo cultivado cerca de 30 mil hectares concentrados nos estados do Espírito Santo, Bahia, Ceará e Rio Grande do Norte. O Espírito Santo continua sendo o estado maior exportador e o segundo maior produtor do Brasil (Agrianual, 2009). A produção brasileira de mamão frente a outros mercados se destaca tanto no consumo nacional quanto nas exportações para outros países.

A cultura apresenta os maiores índices de produtividade do país. Devido a crise econômica mundial em 2009, houve uma redução da área plantada de 11 mil para 7 mil hectares, distribuídos em 11 municípios do Norte do Estado do Espírito Santo. A produção média anual foi de 550 toneladas, chegando a 80 toneladas de fruto/hectare, considerada uma das mais altas do País (Agrianual, 2009).

## 2.2. Varíola do mamoeiro

A varíola do mamoeiro, causada pelo fungo *Asperisporium caricae* é a doença mais comum que incide na cultura do mamoeiro, ocorrendo na Austrália, África, América Central e do Sul, Índia e Estados Unidos (Ellis e Holliday, 1972). Apresenta expressiva importância econômica, pois provoca danos no desenvolvimento da planta e afeta diretamente a superfície fotossintética da folha por meio de lesões arredondadas de coloração escura. Quando atinge os frutos, torna-os inadequados à comercialização. Plantas severamente atacadas podem perder de 50 a 60% de suas folhas maduras em um período de dois a três meses e a incidência da doença em frutos pode atingir quase 100% (Liberato e Zambolim, 2002).

O local de infecção do patógeno pode ser tanto nas folhas como nos frutos. A sintomatologia é caracterizada por pequenas lesões de 1-3 mm de diâmetro, levemente arredondadas, com coloração branca a pardo-claro apresentando um halo amarelo na

face adaxial. Na face abaxial correspondente, observam-se as estruturas reprodutivas do patógeno. As folhas severamente afetadas senescem, resultando em uma extensiva desfolha. Lesões ligeiramente proeminentes, de aproximadamente 2-6 mm de diâmetro, podem também se desenvolver nos troncos (Peterson *et al.*, 1993; Persley e Ploetz, 2003).

O fungo pode incidir nos frutos quando ainda estão pequenos e verdes, apresentando em sua superfície, áreas com lesões circulares com tamanho entre 2-6 mm de diâmetro, de aspecto encharcado, possuindo no centro pontos esbranquiçados, que com o desenvolvimento da doença tornam-se salientes, maiores e com coloração marrom a negra. O tecido abaixo da lesão assemelha-se a cortiça, entretanto não ocorre deterioração interna do fruto (Peterson *et al.*, 1993; Persley e Ploetz, 2003).

A incidência da doença pode ser elevada, induzindo à desvalorização do produto, o que constitui um dos problemas mais sérios dessa fruteira (Bergamin e Kimati, 1997; Oliveira e Santos, 2000). As medidas de controle baseiam-se principalmente na aplicação de fungicidas, mas recomendam-se também práticas culturais como remoção de restos de cultura. Medidas de monitoramento da doença baseada na presença e ausência da lesão e no progresso da doença já foram desenvolvidas, no qual o número de aplicações pode ser diminuído quando se correlaciona com o nível de lesões e as condições de clima (Noronha *et al.*, 2005; Santos Filho *et al.*, 2007).

### 2.3. *Asperisporium caricae*

O gênero *Asperisporium* foi introduzido por Maublanc (1913), sendo *Asperisporium caricae* a espécie-tipo e está inserido no complexo cercosporóide, contudo sem a comprovação de ser anamorfo de *Mycosphaerella*. Os fungos

pertencentes ao complexo cercosporóide são hifomicetos, sendo muitos deles anamorfos de *Mycosphaerella*. Este complexo abriga mais de 20 gêneros de importância fitopatológica. Os gêneros anamorfos de *Mycosphaerella* são reconhecidos pela combinação de diversos caracteres, como: estrutura do conidiomata (picnídio, esporodóquio, conidióforos livres ou fasciculados); presença ou ausência de micélio superficial; conidióforos (quanto à ramificação, ornamentação e pigmentação); célula conidiogênica (conspícua ou inconspícua) e conídio (quanto ao tamanho, formato, ornamentação, pigmentação, septação e formação ou não de cadeias) (Braun, 1995, 1998; Crous *et al.*, 2001; Crous e Braun, 2003).

O gênero *Asperisporium* é composto por 21 espécies, sendo estas: *A. acori* Tehon (1948), *A. alstroemeriae* (Allesch.) Maubl. (1913); *A. asclepiadis* (Ellis e Everh.) Deighton (1976), *A. caricae* (Speg.) Maubl. (1913), *A. cassiae* (Syd.) Deighton (1976); *A. dalbergiae* B.V. Patil e Thirum. (1968), *A. gnaphaliatum* (Bonar) U. Braun (2000), *A. juniperinum* (Georgescu e Badea) B. Sutton e Hodges (1990), *A. mikaniae* (Ellis e Everh.) R.W. Barreto (1995), *A. mikaniigena* (J.M. Yen e Lim) R.W. Barreto (1995), *A. minutulum* (Sacc.) Deighton (1976), *A. moringae* (Thirum. e Govindu) Deighton (1976), *A. musicola* Matsush. (1975), *A. peucedani* (Ellis e Holw.) Maubl. (1913), *A. pongamiae* (Syd.) Deighton (1976), *A. punctulatum* (Tracy e Earle) Maubl. (1913), *A. rafinesquiae* (Harkn.) U. Braun e Crous (2007), *A. robur* (Tho) U. Braun e Melnik (1996), *A. sequoiae* (Ellis e Everh.) B. Sutton e Hodges (1990), *A. vasconcelliae* (Speg.) U. Braun (2000), *A. vitiphyllum* (Speschnew) Deighton (1975).

As características morfológicas da espécie *Asperisporium caricae* são: conidióforos sempre esporodóquias, contínuos ou septados; células conidiogênicas poliblasticas, simpodiais, cicatrizes conidiais protuberantes, espessadas e pigmentadas; conídios fusóides, cilíndricos ou obclavados, 0-3 septos transversais, pigmentados,

paredes verrugosas; hilo espessado e escuro (Hernández – Gutiérrez, 2000). A espécie *A. caricae* está distribuída nos países: Argentina, Austrália, Bermuda, Bolívia, Chile, China, Colômbia, Costa Rica, República Dominicana, Equador, El Salvador, Etiópia, Guatemala, Guiana, Haiti, Honduras, Índia, Indonésia, Jamaica, Japão, Quênia, México, Moçambique, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Filipinas, Porto Rico, África do Sul, Sirilanka, Taiwan, Tanzânia, USA, Venezuela, Ilhas Virgens e Zimbábue (Crous e Braun, 2003).

Maublanc (1913), ao descrever a espécie *A. caricae*, considerou-a anamorfo de *Sphaerella caricae* Maubl. (= *Mycosphaerella caricae* Syd. e P. Syd.), já que no material coletado havia também a presença de peritécios na face adaxial das folhas de mamão. Esses peritécios apresentavam ascas cilíndricas bitunicadas, sésseis, desprovidos de paráfises, contendo oito ascósporos fusóides, retilíneos ou pouco curvados, hialinos, divididos por um septo transversal em duas células ligeiramente desiguais, sendo a inferior mais intumescida que a superior, características típicas do gênero *Mycosphaerella*.

Maublanc também discute o fato de Spegazzini (1883), em “Fungi Guaranitica”, ter nomeado a espécie *Asperisporium caricae*, como *Cercospora caricae* Speg. (1886), já que são distintas as características morfológicas como forma, septação e verrugosidade do conídio, corpo de frutificação e presença de estroma. Saccardo, ao encontrar o mesmo material vegetal, reconheceu que certamente não se tratava de uma *Cercospora*, alocando a espécie em *Fusicladium caricae* (Speg.) Sacc. (1902).

Posteriormente à avaliação de Saccardo, Ellis e Everhart (1892), ao examinarem folhas de mamoeiro com varíola, acreditaram ser um fungo novo e o designaram de *Scolicotrichum caricae* Ellis e Everh. (1892), entretanto, esta espécie não diferia da descrita anteriormente por Spegazzini. Em 1898, George Masee, descreveu *Epiclinium*

*cumminsii* Massee (1898), no qual foi posteriormente considerada sinonímia de *Cercospora caricae*. Em 1902, Earle descreveu *Pucciniopsis caricae* Earle (1902) também considerada sinônimo de *Cercospora caricae*. Por essa razão, Maublanc (1913) considerou sinonímia do gênero *A. caricae*: *C. caricae*, *F. caricae*, *S. caricae*, *E. cumminsii* e *P. caricae*.

A conexão da espécie *S. caricae* (= *M. caricae*), como sendo o teleomorfo de *A. caricae* nunca foi comprovada. Outros pesquisadores atribuíram *M. caricae*, como sendo teleomorfo de *Phoma caricae-papayae* (Punithalingam, 1980), que causa a podridão-peduncular do mamão, sendo classificada também como *Ascochyta caricae-papayae*, apresentando relatos na África, Ásia, Austrália, Oceania, e América do Sul e Central (Ullasa *et al.*, 1974).

Manuais de identificação relacionam o gênero *Didymella* aos anamorfos *Phoma* e *Ascochyta*, sendo a presença de pseudoparáfises uma característica morfológica relevante do gênero *Didymella*, que o distingue de *Mycosphaerella* (Hanlin, 1990). Contudo, esta estrutura é dificilmente visualizada nos cortes histológicos sobre microscópios de luz, podendo gerar equívocos na identificação.

Características morfológicas do gênero *Asperisporium* já o alocaram como pertencente ao gênero *Passalora*, entretanto, a verrugosidade de seus conídios e a conidiomata sempre esporoquial em *Asperisporium*, são características morfológicas utilizadas para distinção entre esses dois gêneros. Porém, até o momento, nenhum trabalho correlaciona esses marcadores morfológicos à filogenia dentro do complexo dos cercosporóides. Além disso, o tratamento de *Asperisporium* como anamorfo de *Mycosphaerella* é controverso (Crous *et al.*, 2001; Crous e Braun, 2003).

É notória a inexistência de trabalhos abordando a biologia deste fungo provavelmente devido a possível condição biotrófica de *Asperisporium* por meio da

dificuldade de crescimento, manutenção da colônia e esporulação *in vitro* (Chambers, 1978). A maioria dos trabalhos focam principalmente no controle químico da doença (Pratissoli *et al.*, 2007; Dianese *et al.*, 2008).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Obtenção dos isolados

Folhas de mamoeiro com sintomas de varíola foram coletadas em diversas regiões do país, perfazendo um total de 26 coletas, além de duas coletas de *M. caricae* na região de Viçosa (Tabela 1). Os isolados de *A. caricae* foram coletados por meio do isolamento direto a partir de conídios coletados de um único esporodóquio. Somente materiais com ausência de hiperparasitas foram utilizados no isolamento.

Os conídios foram transferidos para placas de Petri de 60 mm de diâmetro, contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). A germinação dos esporos foi acompanhada diariamente em estereomicroscópio, sendo transferidos para novas placas contendo meio de cultura BDA, obtendo assim uma cultura monoesporodóquia.

Os isolados de *Mycosphaerella caricae* foram adquiridos por meio de ejeção de ascósporos de material foliar contendo peritécios (Alfenas e Mafia, 2007). Cortes das folhas contendo peritécios foram colocados sobre um retângulo (2 x 3 cm) de papel de filtro umedecido com água destilada e autoclavada. Este papel de filtro foi fixado na tampa da placa de Petri invertida contendo meio de cultura Ágar-água (AA). As placas foram mantidas em câmara de crescimento à 27°C por um período de 24 horas para ejeção dos ascósporos. A germinação dos ascósporos foi acompanhada diariamente em estereomicroscópio, sendo transferidos individualmente para novas placas de Petri contendo meio de cultura BDA, obtendo assim uma cultura monoascospórica. Todas as placas foram mantidas em câmara de crescimento a 27°C.

Tabela 1. Relação dos isolados utilizados e local de origem.

Isolados	Espécie	Origem
LGS 01*	<i>Asperisporium caricae</i>	Marliéria (MG)
LGS 02	<i>A. caricae</i>	Muriaé (MG)
LGS 03*	<i>A. caricae</i>	Ipatinga (MG)
LGS 04*	<i>A. caricae</i>	Montes Claros (MG)
LGS 05*	<i>A. caricae</i>	São Domingo da Prata (MG)
LGS 06	<i>A. caricae</i>	São Domingo da Prata (MG)
LGS 07	<i>A. caricae</i>	Santa Bárbara (MG)
LGS 08*	<i>A. caricae</i>	Alto Jequitibá (MG)
LGS 09*	<i>A. caricae</i>	Santa Leopoldina (ES)
LGS 10*	<i>A. caricae</i>	Viegas (MG)
LGS 11*	<i>A. caricae</i>	Alto Caparaó (MG)
LGS 12*	<i>A. caricae</i>	Dionísio (MG)
LGS 13*	<i>A. caricae</i>	Rio Grandina - Nova Friburgo (RJ)
LGS 14	<i>A. caricae</i>	Murineli (RJ)
LGS 17	<i>A. caricae</i>	Jacareí (SP)
LGS 19	<i>A. caricae</i>	Peruíbe (SP)
LGS 20	<i>A. caricae</i>	Garopabá Sirí (SC)
LGS 21	<i>A. caricae</i>	Volta Redonda (RJ)
LGS 22	<i>A. caricae</i>	Timbó (SC)
LGS 25	<i>A. caricae</i>	Igrapiúna (BA)
LGS 27	<i>A. caricae</i>	Teixeiras (MG)
LGS 28	<i>A. caricae</i>	São Miguel do Anta (MG)
LGS 29	<i>A. caricae</i>	Ponte Nova (MG)
LGS 32	<i>A. caricae</i>	Pedro Canário (ES)
LGS 33	<i>A. caricae</i>	Guaratinguetá (SP)
LGS 34	<i>A. caricae</i>	Poços de Caldas (MG)
LGS 30	<i>M. caricae</i>	Viçosa (MG)
LGS 31	<i>M. caricae</i>	Viçosa (MG)

\* Isolados utilizados no teste de crescimento em diferentes meios de cultura e esporulação.

### 3.2. Caracterização Morfológica

Foram efetuados cortes histológicos dos 26 materiais coletados com varíola do mamoeiro e mantidos em lactofenol entre lâmina e lamínula para visualização das estruturas reprodutivas em microscópio de luz. Os caracteres morfológicos e biométricos foram registrados e comparados à descrição da espécie-tipo de *A. caricae* (Maublanc, 1913; Ellis e Holiday, 1972).

As características morfológicas e biométricas analisadas foram:

- Conídio:
  - presença de verrugosidade;
  - número e comprimento das cicatrizes conspícuas;
  - número de septos;
  - comprimento x largura.
- Conidióforos:
  - número de cicatrizes conspícuas/conidióforo;
  - presença ou ausência de septos;
  - comprimento x largura.
- Esporodóquio:
  - comprimento x largura dos esporodóquios.

### 3.2.1. Crescimento em diferentes meios de cultura

Foram utilizados 10 isolados para avaliar o crescimento em diferentes meios de cultura. Discos de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro foram retirados das bordas de colônias crescidas por 30 dias em meio BDA. Os discos foram dispostos no centro de placas de Petri contendo os seguintes meios de cultura: Batata-dextrose-ágar (BDA), Corn-meal-ágar (CMA), Oat-meal-ágar (OMA), Caldo de vegetais-ágar (CVA) (Pereira *et al.*, 2003), Batata-dextrose-ágar suplementado com aminoácidos (Mattos, 1999) e dois outros desenvolvidos com base na especificidade de *A. caricae*: Folha de mamão-ágar (FMA) e Casca do fruto do mamão-ágar (CFMA) (Tabela 2).

Tabela 2. Meios de cultura desenvolvidos para *Asperisporium caricae*.

Meios de cultura	Composição	Modo de Preparo (1L)
Folha de mamão-ágar (FMA)	- 200g de folhas de mamão; - 18g de ágar;	Folhas de mamão processadas no liquidificador e posteriormente coadas em gaze. Adição dos demais ingredientes e volume completado para 1 litro.
Casca do fruto do mamão-ágar (CFMA)	- 200g de casca de mamão verde; - 18g de ágar;	Cascas de mamão processadas no liquidificador e posteriormente coadas em gaze. Adição dos demais ingredientes e volume completado para 1 litro.

Para cada um dos dez isolados, quatro repetições foram utilizadas para os sete meios de cultura testados, totalizando 280 placas de Petri. As placas foram mantidas em câmara de crescimento a 27°C com fotoperíodo de 12 h/luz e 12 h/escuro. Os critérios avaliados foram: taxa de crescimento das colônias, pigmentação no meio de cultura, coloração e reverso da colônia e esporulação.

### 3.2.1.1. Avaliações e Análises estatísticas

O crescimento das colônias foi avaliado por 135 dias, sendo a 1ª avaliação realizada 30 dias após o plaqueamento dos discos de micélio nos diferentes meios de cultura. As avaliações subsequentes foram realizadas periodicamente em intervalos de 15 dias.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, no qual cada meio de cultura foi repetido quatro vezes. As médias dos diâmetros das colônias nos diferentes meios de cultura foram analisadas pelo programa SAS v. 9.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC), pelo Teste de média Fisher (LSD) a 5% de probabilidade com a finalidade de verificar a existência de um meio de cultura que favoreça o crescimento de *A. caricae*.

### 3.2.2. Esporulação dos isolados

Avaliou-se a capacidade de 10 isolados de *A. caricae* quanto à esporulação *in vitro* utilizando-se a metodologia descrita por Mattos (1999) para a esporulação de *Microcyclus ulei*, espécie de crescimento lento e que também apresenta baixa esporulação *in vitro*.

Discos de micélio foram inseridos em tubos de microcentrífuga esterilizados e por meio de um bastão de vidro esterilizado foi realizada a maceração da massa micelial. Os fragmentos miceliais foram transferidos para placas de Petri de 60 mm, contendo os seguintes meios de cultura: Mineral-dextrose-ágar (Chambers e Rijkenberg, 1987), Extratos de vegetais-minerais-ágar (Chambers e Rijkenberg, 1987) e Caldo de vegetais-ágar (CVA). As placas foram mantidas em câmaras de crescimento com fotoperíodo de 12 h/luz negra e 12 h/escuro, a 23-25°C durante 15 dias e avaliados quanto à presença de conídios de *A. caricae*.

### 3.3. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Dois isolados de *A. caricae* foram selecionados ao acaso (LGS09 e LGS13) para a caracterização molecular. Além destes, também foram utilizados no estudo de filogenia molecular, os 2 isolados de *Mycosphaerella caricae*.

Baseado em informações descritas na literatura, três regiões genômicas foram escolhidas para obtenção e análise das sequências: a região espaçadora interna transcrita (*Internal Transcribed Spacer*) ITS rDNA (ITS1, 5.8S, ITS2), a região da subunidade menor mitocondrial do DNA ribossômico (mtSSU) e da subunidade maior do DNA ribossomal (LSU). As regiões escolhidas são comumente utilizadas em estudos filogenéticos com propósitos taxonômicos. Os critérios para esta seleção foram: genes

não codificantes (ITS) e genes codificantes com moderada taxa de evolução (mtSSU e LSU).

O gene do DNA ribossômico é transcrito como um único precursor, consistido de três regiões codificantes - 18S, 5.8S, 28S - separadas por duas regiões transcritas (ITS1 e ITS2), mas descartadas durante o processamento. As regiões que codificam para rDNA (18S, 5.8S e 28S) não são geralmente úteis em termos de polimorfismo a nível intraespecífico, pois essas regiões evoluem lentamente nas sequências, sendo portanto, particularmente úteis para análises a nível de família e classes taxonômicas mais elevadas. Contudo, a subunidade maior do rDNA, 28S, possui domínios variáveis D1-D3 que são utilizados em estudos filogenéticos (Guarro *et al.*, 1999). A região ITS (ITS-1 e ITS-2) têm um nível intermediário de variação, o que torna essas sequências apropriadas para o uso em nível de gênero e/ou de espécie.

A subunidade menor mitocondrial do DNA ribossômico apresenta elevado polimorfismo, o que a torna uma região adequada para estudos envolvendo a taxonomia e evolução dos fungos (Sheen *et al.*, 1993).

### 3.3.1. Extração e amplificação do DNA

Os isolados foram cultivados em erlenmeyer contendo 100 mL de meio batata-dextrose (BD) líquido, em repouso, incubados no interior de câmara de crescimento e mantidos a 27°C, por aproximadamente quatro semanas. A biomassa produzida foi submetida à extração de DNA, conforme protocolo adaptado CTAB (Murray e Thompson, 1980).

Toda reação de PCR foi preparada em um volume total de 50µL contendo 10x de tampão de PCR; 1,5mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2mM dNTPs; 0,2µM de cada primer; 3.5U Taq

DNA Polimerase e de 30 a 50 ng de DNA extraído. Para amplificação das sequências, foram utilizados os primers descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Sequências dos primers utilizados para amplificação parcial dos genes da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*), subunidade menor mitocondrial do DNA ribossomal (mtSSU) e subunidade maior do DNA ribossomal (LSU) de *Asperisporium caricae*.

<i>Loco</i>	<i>Seqüências dos primers</i>	<i>Referência</i>
ITS	ITS5 – 5' GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G 3' ITS4 – 5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'	White <i>et al.</i> , 1990
mtSSU	MNS1 – 5' GAG CAG TGA GGA ATA TTG GTC AAT G 3' NMS2 – 5' GCG GAT CAT CGA ATT AAA TAA CAT 3'	Arzanlou <i>et al.</i> , 2008
LSU	NL1 – 5' GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG 3' NL4 – 5' GGT CCG TGT TTC AAG ACG G 3'	O'Donnell, 1992

As condições para as reações de PCR para cada um dos genes estão descritas nas referências da Tabela 3. Os produtos de PCR foram verificados por meio da eletroforese em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídio e purificados usando o kit de purificação E.Z.N.A. Eazy Nucleic Acid Isolation. Cycle – pure kit Spin Protocol (Omega bio-tek) de acordo com instruções do fabricante.

### 3.3.2. Sequenciamento e análise filogenética

Os produtos de PCR purificados foram seqüenciados no seqüenciador Applied Biosystems, Megabace (sistema capilar) no Laboratório de Genômica do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agricultura (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa – MG e também na Macrogen Advancing through Genomics – Coréia. Ambas as fitas de cada fragmento foram seqüenciadas para determinação da sequência consenso.

As sequências obtidas foram editadas manualmente usando o programa The Staden Package, versão 1.6.0 (Staden *et al.*, 1999). Posteriormente, procedeu-se o

alinhamento das sequências através do programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). Para cada gene, as sequências obtidas foram analisadas e comparadas pelo método Blast, com sequências de outras espécies de diferentes gêneros pertencentes ao complexo cercosporóide e com espécies de *Mycosphaerella* depositadas no GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)).

As filogenias para cada conjunto de dados foram construídas por quatro métodos: distância – usando “Neighbor-Joining (NJ)”, máxima parcimônia não ponderada (MP), máxima verossimilhança (ML) e análise filogenética bayesiana. Todas as árvores geradas foram enraizadas, com a escolha de um *outgroup*, indicando um caminho evolutivo. A estabilidade dos clados formados foi avaliada de acordo com o suporte da análise de bootstrap e probabilidade posterior.

O algoritmo Neighbor-Joining é muito utilizado, pois é baseado no princípio da evolução mínima, ou seja, minimiza o somatório dos ramos das árvores e, portanto, é muito mais rápido, já que identifica os vizinhos que sequencialmente minimizam o tamanho total da árvore filogenética (Saitou e Nei, 1987; Gascuel e Steel, 2006). O modelo utilizado foi o Kimura-2-Parâmetros, no qual assume taxas diferentes entre transições (A-G, C-T) e transversões (A-C, A-T, C-G, G-T) (Kimura, 1980) e Tamura-Nei que também considera taxas diferentes entre transições e transversões, além de frequência diferencial de bases, sendo as árvores geradas no programa Mega 4.1. (Tamura, 2007; Kumar *et al.*, 2008).

A análise de Máxima Parcimônia é um dos critérios de otimização a serem utilizados em uma inferência filogenética, no qual a filogenia escolhida é aquela que envolve o menor número de transformações de estado de caracteres, com o menor comprimento de ramos quando reconstruímos os eventos evolutivos (Steward, 1993). Para obtenção da filogenia foi utilizado algoritmos de busca heurística, pelo PAUP\*

(Swofford, 2002), com 100 adições aleatórias de taxa e rearranjos de ramos (*branch swapping*) pelo método TBR (Tree bisection and reconstruction), com adição sequencial de táxons (*stepwise addition*) para aumentar as chances de se atingir uma melhor otimização dos dados (Maddison, 1991).

A análise de máxima verossimilhança é um método de inferência filogenética que avalia a hipótese sobre a história evolutiva em termos da probabilidade de que o modelo proposto e a história hipotética dariam ao conjunto de dados observados. O método procura pela árvore com maior probabilidade ou maior verossimilhança. O modelo de substituição de nucleotídeos escolhido foi baseado na informação do critério de Akaike e no InL implementado pelo Model test 3.7 (Posada e Crandall, 1998) e então usado o PAUP\* (Swofford, 2002) para computar a porcentagem de ML bootstrap após 1000 pseudoreplicações começando pela árvore de NJ e o parâmetro NNI (Nearest Neighbor Interchange) .

A análise bayesiana procura dentro do universo das topologias dos tamanhos de ramos e dos parâmetros possíveis, os que apresentem a melhor probabilidade posterior de explicar os dados utilizando o algoritmo *MCMC* (Monte Carlo em Cadeias de Markov). A análise Bayesiana foi realizada no programa MrBayes (Huelsenbech e Ronquist, 2001), sendo o modelo de substituição de nucleotídeos escolhido baseado na informação do critério de Akaike e no InL implementado utilizando o programa MrModelTest (Nylander, 2004) para computar a estabilidade dos clados pela probabilidade posterior a partir de 5.000.000 de gerações e burnin de 25%.

Dois alinhamentos foram utilizados para análise filogenética com as sequências de DNA amplificadas da região LSU. O primeiro alinhamento contendo 61 taxons, incluindo o *outgroup*, consistiu das sequências obtidas dos isolados de *A. caricae* e *M. caricae* geradas neste estudo, juntamente com sequências de espécies pertencentes à

famílias da ordem *Capnodiales*, como: *Mycosphaerellaceae*, *Teratosphaeriaceae* e *Davidiellaceae*, bem como representantes pertencentes às ordens *Dothideales*, *Pleosporales* e *Botryosphaeriales* disponíveis no banco de dados de sequências de nucleotídeos NCBI GenBank (Simon *et al.*, 2009) (Tabela 4).

Tabela 4. Relação das espécies utilizadas para gerar o primeiro alinhamento das sequências de DNA amplificadas da região LSU.

Espécies	Acesso GenBank
	LSU
<i>Ascochyta fabae</i>	EU167566
<i>Ascochyta pisi</i> var. <i>pisi</i>	EU167557
<i>Ascochyta vicia pannonicae</i>	EU167559
<i>Ascochyta vicia villosae</i>	EU167560
<i>Asteroma alneum</i>	EU167609
<i>Bagnisiella examinans</i>	EU167562
<i>Cercospora beticola</i>	AY840527
<i>Cladosporium</i> sp.1	EU167574
<i>Cladosporium</i> sp.2	EU167586
<i>Cladosporium</i> sp.3	EU167592
<i>Davidiella macrospora</i>	EU167591
<i>Davidiella tassiana</i>	EU167558
<i>Didymella bryoniae</i>	EU167573
<i>Didymella exitialis</i>	EU167564
<i>Didymella phacae</i>	EU167570
<i>Didymella rabiei</i>	EU167600
<i>Dothidea berberidis</i>	EU167601
<i>Dothidea muelleri</i>	EU167593
<i>Guignardia vaccinii</i>	EU167584
<i>Kabatiella caulivora</i>	EU167576
<i>Kabatiella microsticta</i>	EU167608
<i>Mycosphaerella aleuritidis</i>	EU167594
<i>Mycosphaerella arbuticola</i>	EU167571
<i>Mycosphaerella berberidis</i>	EU167603
<i>Mycosphaerella brassicicola</i>	EU167607
<i>Mycosphaerella coacervata</i>	EU167596
<i>Mycosphaerella crystallina</i>	EU167579
<i>Mycosphaerella flageoletiana</i>	EU167597
<i>Mycosphaerella fragariae</i>	EU167605
<i>Mycosphaerella gregaria</i>	EU167580
<i>Mycosphaerella harthensis</i>	EU167602
<i>Mycosphaerella laricina</i>	EU167595
<i>Mycosphaerella linorum</i>	EU167590
<i>Mycosphaerella microsora</i>	EU167599

Espécies	Acesso GenBank
	LSU
<i>Mycosphaerella milleri</i>	EU167577
<i>Mycosphaerella punctata</i>	EU167582
<i>Mycosphaerella populicola</i>	EU167578
<i>Mycosphaerella pseudoellipsoidea</i>	EU167585
<i>Mycosphaerella punctiformis</i>	EU167569
<i>Mycosphaerella pyri</i>	EU167606
<i>Mycosphaerella grossulariae</i>	EU167588
<i>Mycosphaerella rosigena</i>	EU167587
<i>Mycosphaerella rubi</i>	EU167589
<i>Mycosphaerella stromatosa</i>	EU167598
<i>Phaeosphaeria rousseliana</i>	EU167604
<i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i>	EU167567
<i>Phoma medicaginis</i> var. <i>medicaginis</i>	EU167575
<i>Phoma pinodella</i>	EU167565
<i>Phoma sojicola</i>	EU167568
<i>Pleiochaeta ghindensis</i>	EU167561
<i>Pleiochaeta setosa</i>	EU167563
<i>Pseudocercospora vitis</i>	DQ073923
<i>Ramichloridium cerophilum</i>	EU041798
<i>Schizothyrium pomi</i>	EF134948
<i>Schizothyrium pomi</i>	EF134949
<i>Teratosphaeria fibrillosa</i>	EU019282
<i>Teratosphaeria microspora</i>	EU167572
<i>Teratosphaeria molleriana</i>	EU167583

As sequencias de dados do segundo alinhamento continham 96 taxons, incluindo o *outgroup*, apresentando as sequencias *A. caricae* e *M. caricae* originadas neste estudo, como também de espécies taxonomicamente alocadas dentro das famílias *Mycosphaerellaceae* e *Teratosphaeriaceae* (Tabela 5). Foram analisados 551 caracteres, destes 335 constantes, 209 variáveis e não informativos a parcimônia e 155 informativos a parcimônia.

Tabela 5. Relação das espécies utilizadas para gerar o segundo alinhamento das sequencias de DNA amplificadas da região LSU.

Espécies	Acesso GenBank	Referência
	LSU	
<i>Baudoinia compniacensis</i>	GQ852580	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Capnobotryella renispora</i>	EU019248	
<i>Capnobotryella renispora</i>	GQ852582	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Cercospora apii</i>	GQ852583	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Cercospora zebrinae</i>	GQ852584	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Cercospora virgaureae</i>	GQ852585	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Dissoconium aciculare</i>	GQ852586	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Dissoconium australiensis</i>	GQ852588	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Dissoconium commune</i>	GQ852589	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Dissoconium dekkeri</i>	GQ852592	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Dothistroma pini</i>	GQ852596	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Dothistroma septosporum</i>	GQ852597	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Lecanosticta acicola</i>	GQ852598	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Mycosphaerella acaciigena</i>	GQ852599	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Mycosphaerella africana</i>	GQ852601	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Mycosphaerella ellipsoidea</i>	GQ852602	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Mycosphaerella endophytica</i>	GQ852603	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Mycosphaerella heimii</i>	GQ852604	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Mycosphaerella heimioides</i>	GQ852607	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Mycosphaerella holualoana</i>	GQ852608	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Mycosphaerella irregulariramosa</i>	GQ852609	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Mycosphaerella irregulariramosa</i>	DQ204754	Hunter <i>et al.</i> , 2006
<i>Mycosphaerella keniensis</i>	GQ852610	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Mycosphaerella konae</i>	GQ852611	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Mycosphaerella marksii</i>	GQ852612	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Mycosphaerella parkii</i>	GQ852616	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Mycosphaerella pyri</i>	GQ852617	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Mycovellosiella eucalypti</i>	AF309575	Crous <i>et al.</i> , 2001
<i>Mycosphaerella aurantia</i>	DQ246256	Hunter <i>et al.</i> , 2006
<i>Mycosphaerella keniensis</i>	DQ246259	Hunter <i>et al.</i> , 2006
<i>Mycosphaerella microsora</i>	EU167599	Simon <i>et al.</i> , 2009
<i>Mycosphaerella grandis</i>	DQ246240	Hunter <i>et al.</i> , 2006
<i>Mycosphaerella tasmaniensis</i>	DQ246232	Hunter <i>et al.</i> , 2006
<i>Mycosphaerella tasmaniensis</i>	DQ246233	Hunter <i>et al.</i> , 2006
<i>Mycosphaerella cryptica</i>	DQ246222	Hunter <i>et al.</i> , 2006
<i>Mycosphaerella nubilosa</i>	DQ246228	Hunter <i>et al.</i> , 2006
<i>Mycosphaerella nubilosa</i>	DQ246229	Hunter <i>et al.</i> , 2006
<i>Passalora bellynckii</i>	GQ852618	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Passalora brachycarpa</i>	GQ852619	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Passalora daleae</i>	EU040236	Crous <i>et al.</i> , 2007a
<i>Passalora eucalypti</i>	GQ852620	Crous <i>et al.</i> , 2009a

Espécies	Acesso GenBank	Referência
	LSU	
<i>Passalora graminis</i>	GQ852621	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Passalora sp.</i>	GQ852622	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Passalora vaginae</i>	GQ852624	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Penidiella nectandrae</i>	EU019275	Crous <i>et al.</i> , 2007b
<i>Periconiella velutina</i>	EU041838	Arzanlou <i>et al.</i> , 2007
<i>Periconiella arcuata</i>	EU041836	Arzanlou <i>et al.</i> , 2007
<i>Penidiella sp.</i>	GQ852625	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Phacellium paspali</i>	GQ852627	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Phaeothecoidea sp.</i>	GQ852628	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Phaeothecoidea eucalypti</i>	DQ246225	Hunter <i>et al.</i> , 2006
<i>Pseudocercospora bixae</i>	GQ852630	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Pseudocercospora crousii</i>	GQ852631	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Pseudocercospora fijiensis</i>	GQ852632	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Pseudocercospora griseola forma griseola</i>	GQ852633	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Pseudocercospora paraguayensis</i>	GQ852634	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Pseudocercospora platani</i>	GQ852635	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Pseudocercospora pseudoeucalyptorum</i>	GQ852636	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Pseudocercospora punctata</i>	GQ852645	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Pseudocercospora schizolobii</i>	GQ852646	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Pseudocercospora sp.</i>	GQ852647	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Pseudocercospora sphaerulinae</i>	GQ852652	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Ramulispora sorghi</i>	GQ852653	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Ramulispora sorghi</i>	GQ852654	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Readeriella callista</i>	GQ852655	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Readeriella eucalypti</i>	GQ852660	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Readeriella mirabilis</i>	GQ852661	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Readeriella nontingens</i>	GQ852663	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Readeriella patrickii</i>	GQ852664	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Readeriella sp.</i>	GQ852665	Crous <i>et al.</i> , 2009
<i>Rasutoria pseudotsugae</i>	EF114704	Winton <i>et al.</i> , 2007
<i>Rasutoria tsugae</i>	EF114705	Winton <i>et al.</i> , 2007
<i>Ramichloridium biverticillatu</i>	EU041853	Arzanlou <i>et al.</i> , 2007
<i>Ramichloridium australiense</i>	EU041852	Arzanlou <i>et al.</i> , 2007
<i>Readeriella epicoccoides</i>	EU019288	Crous <i>et al.</i> , 2007b
<i>Readeriella moleriana</i>	EU019292	Crous <i>et al.</i> , 2007b
<i>Septoria aceris</i>	GQ852673	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Septoria apiicola</i>	GQ852674	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Septoria convolvuli</i>	GQ852675	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Septoria cucubali</i>	GQ852676	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Septoria leucanthemi</i>	GQ852677	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Septoria senecionis</i>	GQ852678	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Sonderhenia eucalypticola</i>	GQ852679	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Teratosphaeria considenianae</i>	GQ852680	Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Teratosphaeria cryptica</i>	GQ852682	Crous <i>et al.</i> , 2009a

Espécies	Acesso GenBank		Referência
	LSU		
<i>Teratosphaeria destructans</i>	GQ852690		Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Teratosphaeria destructans</i>	EU019287		Crous <i>et al.</i> , 2007b
<i>Teratosphaeria eucalypti</i>	GQ852691		Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Teratosphaeria molleriana</i>	GQ852692		Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Teratosphaeria nubilosa</i>	GQ852694		Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Teratosphaeria parva</i>	GQ852708		Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Teratosphaeria sp.</i>	GQ852710		Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Teratosphaeria stellenboschiana</i>	GQ852715		Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Teratosphaeria suberosa</i>	GQ852718		Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Teratosphaeria suttonii</i>	GQ852729		Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Verrucisporota daviesiae</i>	GQ852730		Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Verrucisporota proteacearum</i>	GQ852731		Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Zasmidium anthuriicola</i>	GQ852732		Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Zasmidium citri</i>	GQ852733		Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Zasmidium sp.</i>	GQ852734		Crous <i>et al.</i> , 2009a
<i>Botryosphaeria visci</i>	DQ377868		Philips <i>et al.</i> , 2006

Um terceiro alinhamento foi realizado com sequencias das regiões ITS do rDNA e subunidade menor do rDNA (mtSSU) concatenadas (Tabela 6).

Tabela 6. Relação das espécies utilizadas para gerar o alinhamento das sequencias de DNA amplificadas da região ITS e mtSSU.

Espécies	Acesso GenBank		Referência
	ITS	mtSSU	
<i>Botryosphaeria ribis</i>	DQ267604	DQ246263	Hunter <i>et al.</i> , 2006
<i>Mycosphaerella mozambica</i>	EU514258	EU514424	Arzanlou <i>et al.</i> , 2008
<i>Mycosphaerella colombiensis</i>	AY752149	EU514404	Crous <i>et al.</i> , 2004
<i>Passalora loranthi</i>	EU514280	EU514443	Arzanlou <i>et al.</i> , 2008
<i>Pseudocercospora assamensis</i>	EU514281	EU514445	Arzanlou <i>et al.</i> , 2008
<i>Mycosphaerella thailandica</i>	AY752161	EU514442	Crous <i>et al.</i> , 2004
<i>Pseudocercospora longispora</i>	EU514285	EU514447	Arzanlou <i>et al.</i> , 2008
<i>Mycosphaerella musae</i>	EU514264	EU514426	Arzanlou <i>et al.</i> , 2008
<i>Mycosphaerella musicola</i>	AY266149	EU514432	Steward <i>et al.</i> , 1999

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Caracterização morfológica

Os materiais de *A. caricae* coletados em folhas de mamão sintomáticas de diferentes regiões do país apresentaram morfologia correspondente àquela descrita para a espécie-tipo (Maublanc, 1913; Ellis & Holiday, 1972). Conidióforos pigmentados de (35) 45-55 (65) x (5) 6-8 (10)  $\mu\text{m}$ , com 0-1 septos, apresentando de 1-6 cicatrizes conspícuas/conidióforo, arranjados em esporodóquios de (45) 60-90 x 65-100 (120)  $\mu\text{m}$  de tamanho. Conídios solitários, elipsóides a piriformes, verrugosos e pigmentados, contendo de 0-3 septos, com tamanho de (17) 18-26 (30) x (5) 7-12 (14)  $\mu\text{m}$  (Figura 1). Foi possível o isolamento monoesporodóquial a partir dos diferentes materiais coletados e manutenção de colônia de *A. caricae* “in vitro” nos diferentes meios de cultura testados.

Material examinado: Marliéria, MG, em folhas de mamoeiro, 20/08/2008, O. L. Pereira (VIC 31280); Muriaé, MG, em folhas de mamoeiro, 28/08/2008, O. L. Pereira (VIC 31281); Ipatinga, MG, em folhas de mamoeiro, 16/08/2008, O. L. Pereira (VIC 31282); Montes Claros, MG, em folhas de mamoeiro, 24/08/2008, D. M. Macedo (VIC 31283); São Domingos da Prata, MG, em folhas de mamoeiro, 23/08/2008, O. L. Pereira (VIC 31284 e VIC 31285); Santa Bárbara, MG, em folhas de mamoeiro, 23/08/2008, O. L. Pereira (VIC 31286); Alto Jequitibá, MG, em folhas de mamoeiro, 20/08/2008, O. L. Pereira (VIC 31287); Santa Leopoldina, ES, em folhas de mamoeiro, 17/08/2008, O. L. Pereira (VIC 31288); Viegas, MG, em folhas de mamoeiro, 19/08/2008, O. L. Pereira (VIC 31289); Alto Capavaó, MG, em folhas de mamoeiro, 27/08/2007, O. L. Pereira (VIC 31291); Dionísio, MG, em folhas de mamoeiro, 28/08/2008, O. L. Pereira (VIC 31292); Rio Grandina, RJ, em folhas de mamoeiro, 10/09/2008, O. L. Pereira (VIC 31293); Murineli, RJ, em folhas de mamoeiro,

10/09/2008, O. L. Pereira (VIC 31294); Porto Seguro, BA, em folhas de mamoeiro,  
02/10/2008, O. L. Pereira (VIC 31295); Jacareí, SP, em folhas de mamoeiro,  
09/10/2008, M. F. Fujinawa (VIC 31296); Peruíbe, SP, em folhas de mamoeiro,  
12/12/2008, O. L. Pereira (VIC 31298); Garobabá Siriri, SC, em folhas de mamoeiro,  
16/07/2008, D. A. Schurt (VIC 31299); Linhares, ES, em folhas de mamoeiro,  
12/12/2008, S. I. Moreira (VIC 31300); Jimbó, SC, em folhas de mamoeiro,  
05/01/2009, D. A. Schurt (VIC 31301); Meaípe, ES, em folhas de mamoeiro,  
26/01/2009, S. I. Moreira (VIC 31302); Londrina, PR, em folhas de mamoeiro,  
26/01/2009, D. A. Schurt (VIC 31303); Icrapiúna, BA, em folhas de mamoeiro,  
26/01/2009, O. L. Pereira (VIC 31304); Caraguatatuba, SP, em folhas de mamoeiro,  
24/01/2009, L. G. Silva (VIC 31305); Teixeiras, MG, em folhas de mamoeiro,  
02/03/2009, D. C. Dutra (VIC 31306); São Miguel do Anta, MG, em folhas de  
mamoeiro, 08/02/2009, O. L. Pereira (VIC 31307); Ponte Nova, MG, em folhas de  
mamoeiro, 13/02/2009, M. F. Fujinawa (VIC 31308); Pedro Canário, ES, em folhas de  
mamoeiro, 22/01/2009, S. I. Moreira (VIC 31309); Guaratinguetá, SP, em folhas de  
mamoeiro, 05/03/2009, R. C. Roma (VIC 31310); Poços de Caldas, MG, em folhas de  
mamoeiro, 05/03/2009, L. G. Silva (VIC 31311).

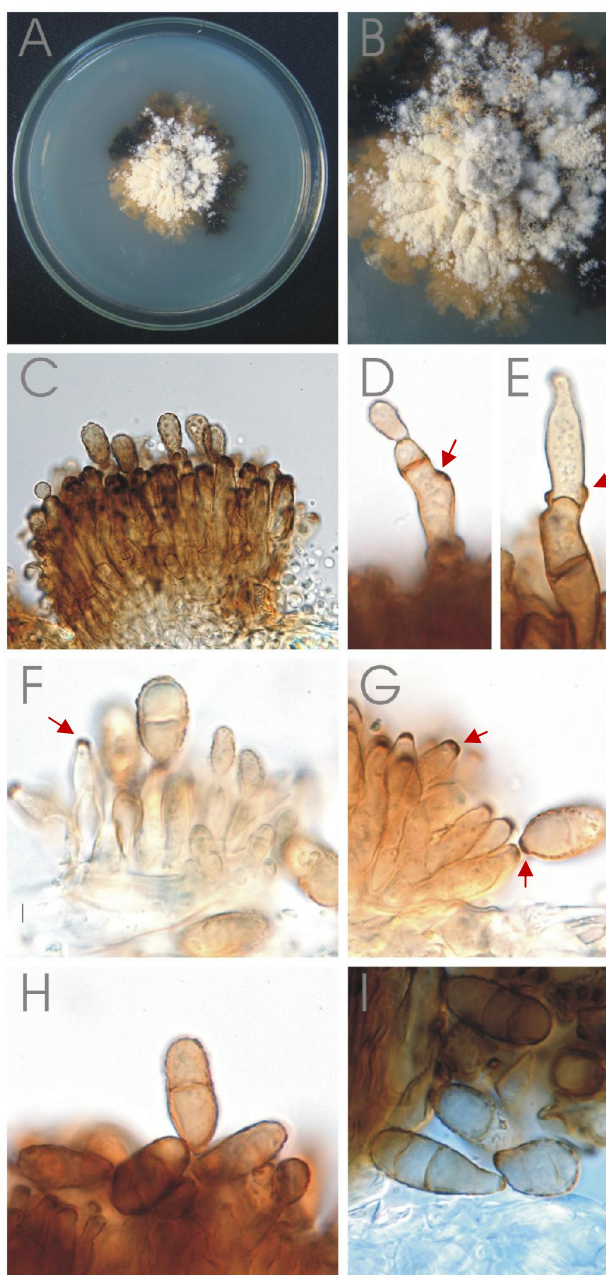


Figura 1. *Asperisporium caricae*. A. e B. Morfologia da colônia em meio BDA com 135 dias. C. Conidióforos arranjados em esporodóquios. D. e E. Conidióforos pigmentados septados com cicatrizes conspícuas (indicadas nas setas vermelhas). F., G., H. e I. Conídios pigmentados, verrugosos e septados com presença de cicatriz proeminente (indicadas nas setas vermelhas). A barra equivale a 10  $\mu$ m.

#### 4.1.1. Crescimento em diferentes meios de cultura

Os critérios avaliados no teste de crescimento de isolados de *A. caricae* nos diferentes meios de cultura foram: taxa de crescimento das colônias (comprimento x largura), coloração e reverso da colônia, presença de pigmentação no meio de cultura, e esporulação (Tabela 7, Figura 2).

Tabela 7. Caracteres qualitativos das colônias de *A. caricae* nos meios de cultura CVA (Caldo de vegetais); OMA (Oat-meal-ágar); BDA supl. (Batata-dextrose-ágar suplementado com aminoácidos); FMA (Folha de mamão-ágar); CFMA (Casca do fruto do mamão-ágar); BDA (Batata-dextrose-ágar); CMA (Corn-meal-ágar).

Meio de Cultura	Coloração da colônia	Reverso da colônia	Presença pigmentação	Presença conídios
CVA	Micélio branco/preto cotonoso	Preto	não	sim
OMA	Micélio preto/branco	Preto	não	sim
BDA supl.	Micélio branco estromático	Preto	não	sim
FMA	Micélio branco/preto	Preto	sim	não
CFMA	Micélio preto	Preto	não	sim
BDA	Micélio branco/cinza estromático	Branco/creme	não	sim
CMA	Micélio branco cotonoso e crescimento ralo	Marrom claro	não	sim

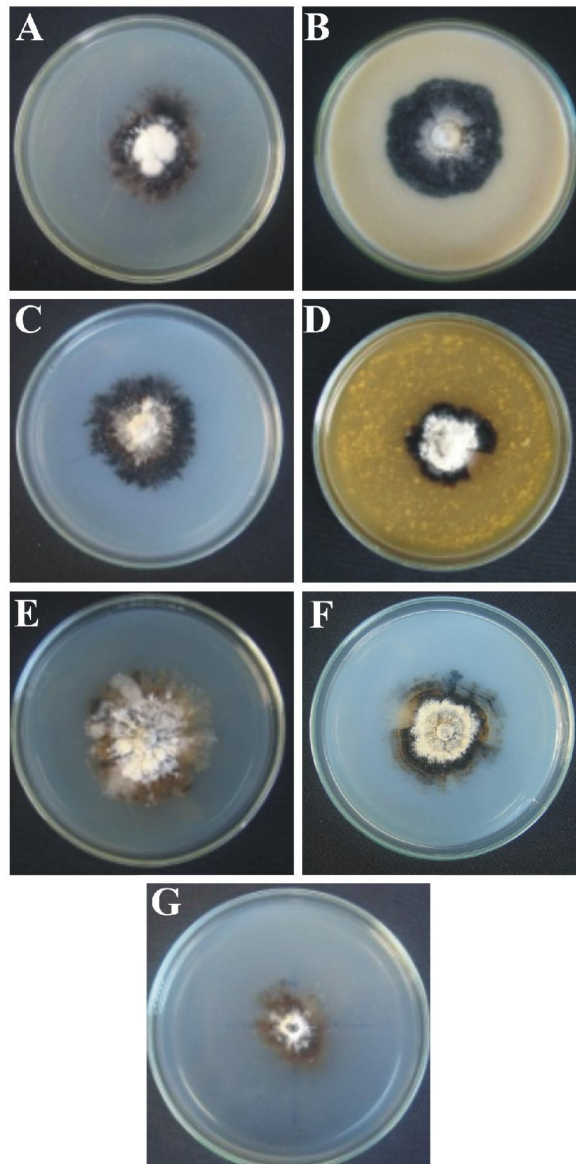


Figura 2. Aspecto geral das colônias de *A. caricae* com 135 dias nos diferentes meios de cultura testados. A. Caldo de vegetais-ágar (CVA). B. Oat-meal-ágar (OMA). C. Batata-dextrose-ágar suplementado com aminoácidos (BDA suplementado). D. Folha de mamão-ágar (FMA). E. Batata-dextrose-ágar (BDA). F. Casca do fruto do mamão-ágar (Casca). G. Corn-meal-ágar (CMA).

Foi avaliado para cada meio de cultura as médias do diâmetro dos isolados de *A. caricae*, sendo não significativa a análise de variância entre isolados, e significativa a interação entre isolado e meio de cultura. Foram utilizadas para análise as médias dos diâmetros da 7<sup>a</sup> avaliação.

De acordo com os resultados obtidos pelo teste de média Fisher (LSD) a 5% de probabilidade, os meios de cultura BDA suplementado ou não com aminoácidos foram aqueles que proporcionaram melhor crescimento para os isolados avaliados de *A. caricae*, seguidos pelos meios de Casca de fruto de mamão (CFMA) e Caldo de vegetais-ágar (CVA). Os meios de cultura Oat-meal-ágar (OMA) e Corn-meal-ágar (CMA) não diferiram em relação ao crescimento dos diâmetros dos isolados. O meio composto por folha de mamão (FMA) foi o que menos favoreceu o crescimento dos isolados (Tabela 8).

Tabela 8. Médias dos diâmetros das colônias de *A. caricae* em sete diferentes meios de cultura.

Meio	Médias do diâmetro das colônias (cm)	
BDA suplementado	3,35*	a
BDA	3,33	a
CFMA	3,26	b
CVA	2,99	c
OMA	2,92	d
CMA	2,86	d
FMA	2,33	e

\* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Fisher (LSD) a 5% de probabilidade.

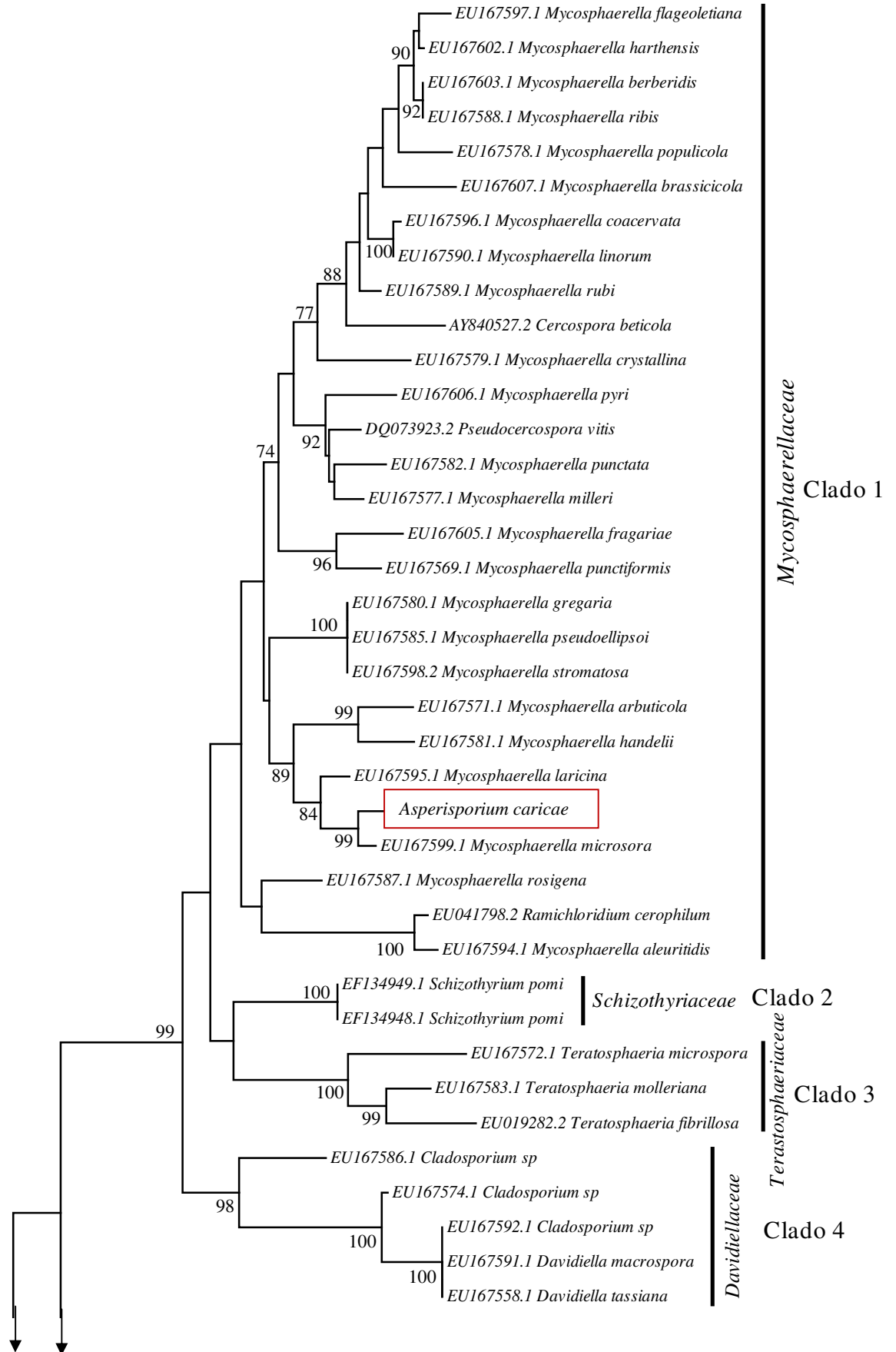
#### 4.1.2. Esporulação dos isolados

A metodologia de maceração da massa micelial e a exposição deste micélio em fotoperíodo de 12 h/luz negra e 12 h/escuro foram eficientes para a obtenção *in vitro* de conídios de *A. caricae*. A esporulação em meio de cultura não foi abundante, mas suficiente para ser visualizada em microscópio de luz, sendo encontrados de 1-3 conídios por colônia.

#### 4.2. Caracterização molecular

Com os dados moleculares provenientes do primeiro alinhamento da região LSU foram realizadas as análises filogenéticas de *Neighbor Joining*, Máxima parcimônia, Máxima verossimilhança e Bayesiana. Todas as árvores geradas apresentaram topologia semelhante e clados bem definidos. Em todas as análises realizadas *A. caricae* ficou alocado no clado representado pelas espécies pertencentes à família *Mycosphaerellaceae* (Clado1) diferindo apenas o suporte deste agrupamento. Na análise de Neighbor joining, o suporte bootstrap foi de 99% (Figura 3), para Máxima parcimônia 88% (Figura 4), Máxima verossimilhança 86% (Figura 5) e Bayesiana, a probabilidade posterior foi de 0,97 (Figura 6).

Do mesmo modo, o isolado obtido de peritécios presentes nas lesões das folhas de mamão se agrupou em todas as análises realizadas com suporte bootstrap 100%, com representantes da ordem *Pleosporales*, principalmente com a espécie *Didymella bryoniae* (Fuckel) Rehm (1881), diferenciando apenas os suportes deste agrupamento. Na análise de Neighbor joining, o suporte bootstrap foi de 88% (Figura 3), para Máxima parcimônia 80% (Figura 4), Máxima verossimilhança 81% (Figura 5) e Bayesiana, a probabilidade posterior foi de 1,0% (Figura 6).



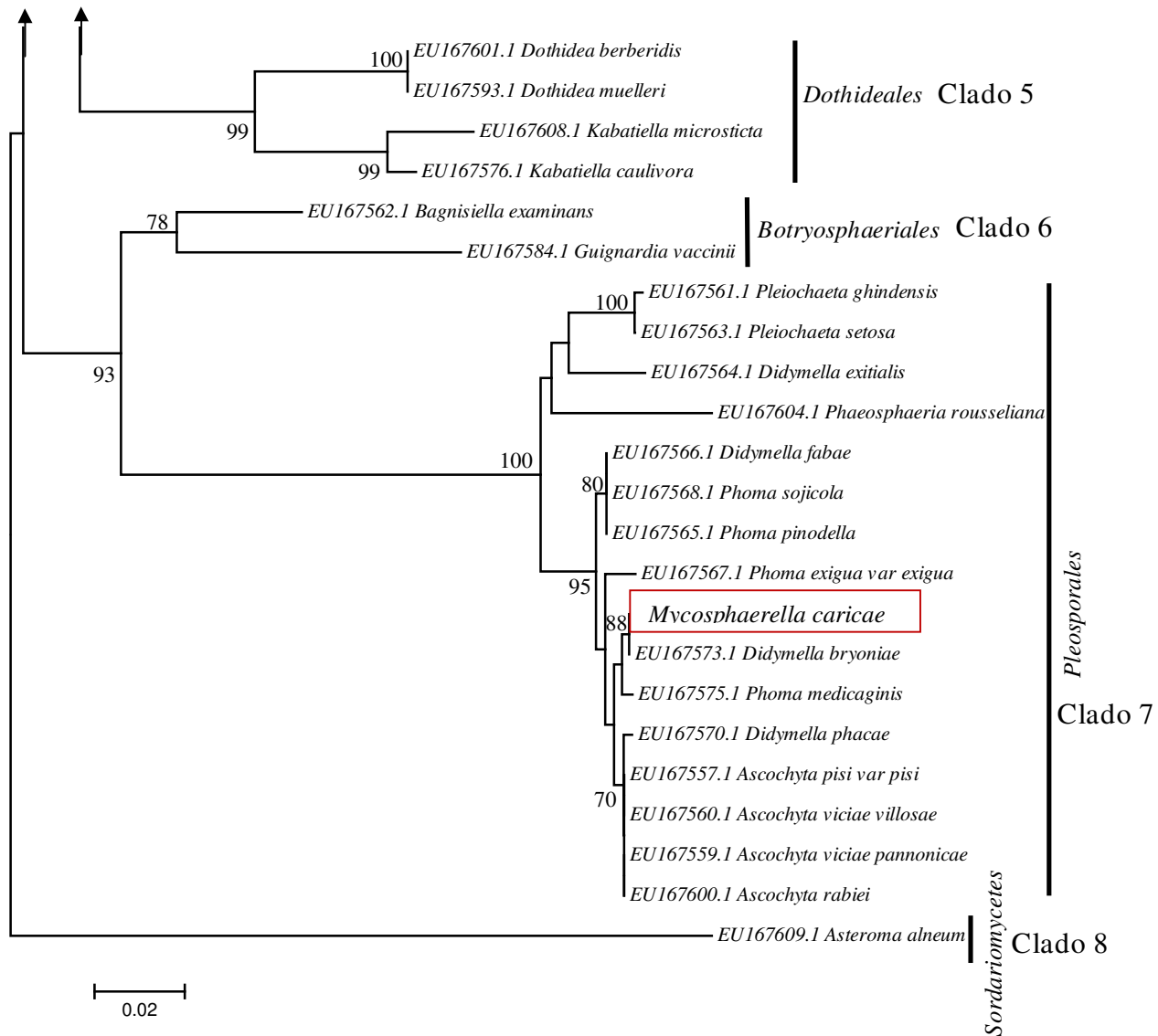


Figura 3. Árvore filogenética obtida do alinhamento das sequências da subunidade maior do rDNA utilizando a análise de Neighbor Joining (Kimura-2-parâmetros). Os valores do suporte de bootstrap (> 70%) com 1000 repetições são exibidos nos nós. Utilizando como *outgroup* *Asteroma alneum* (Pers.) B. Sutton (1980).

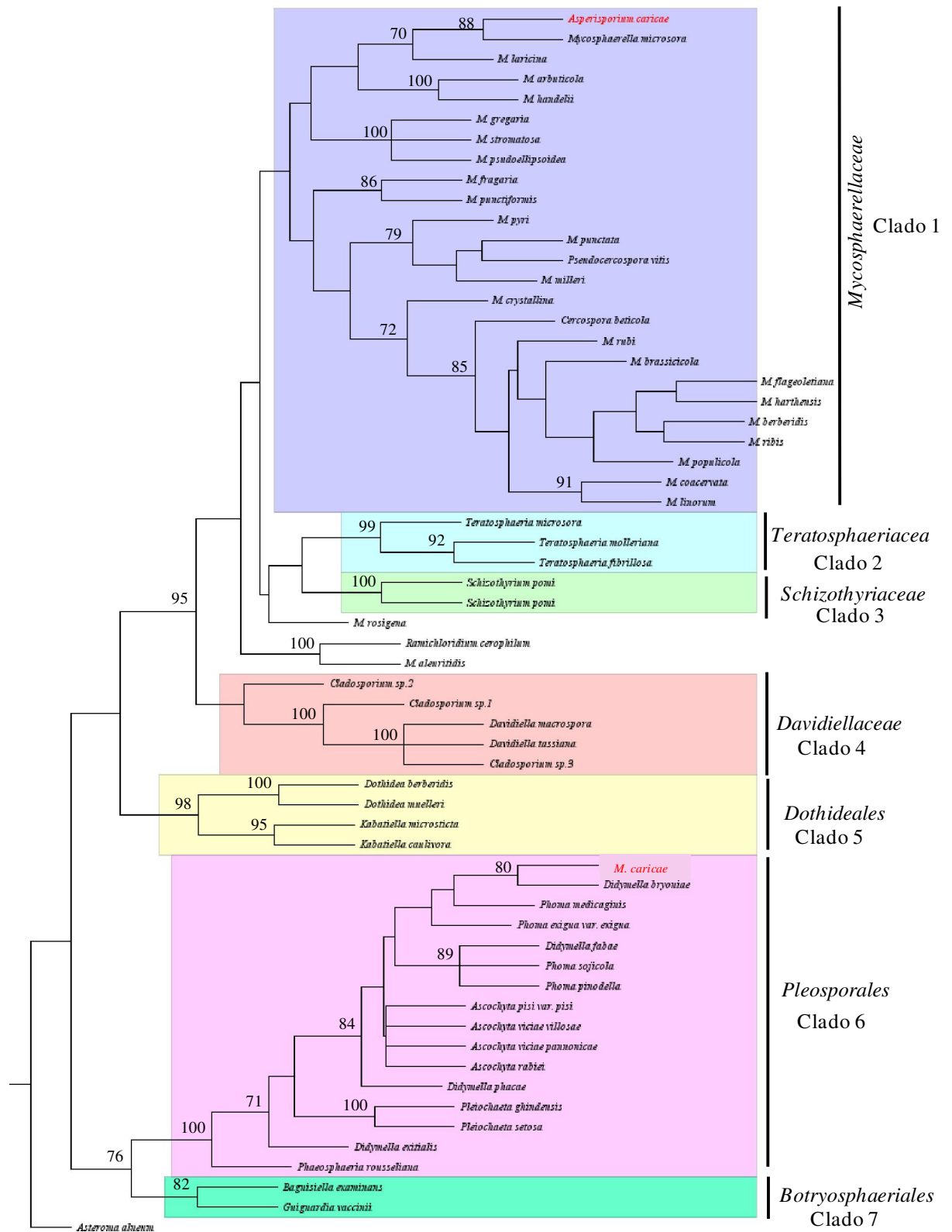
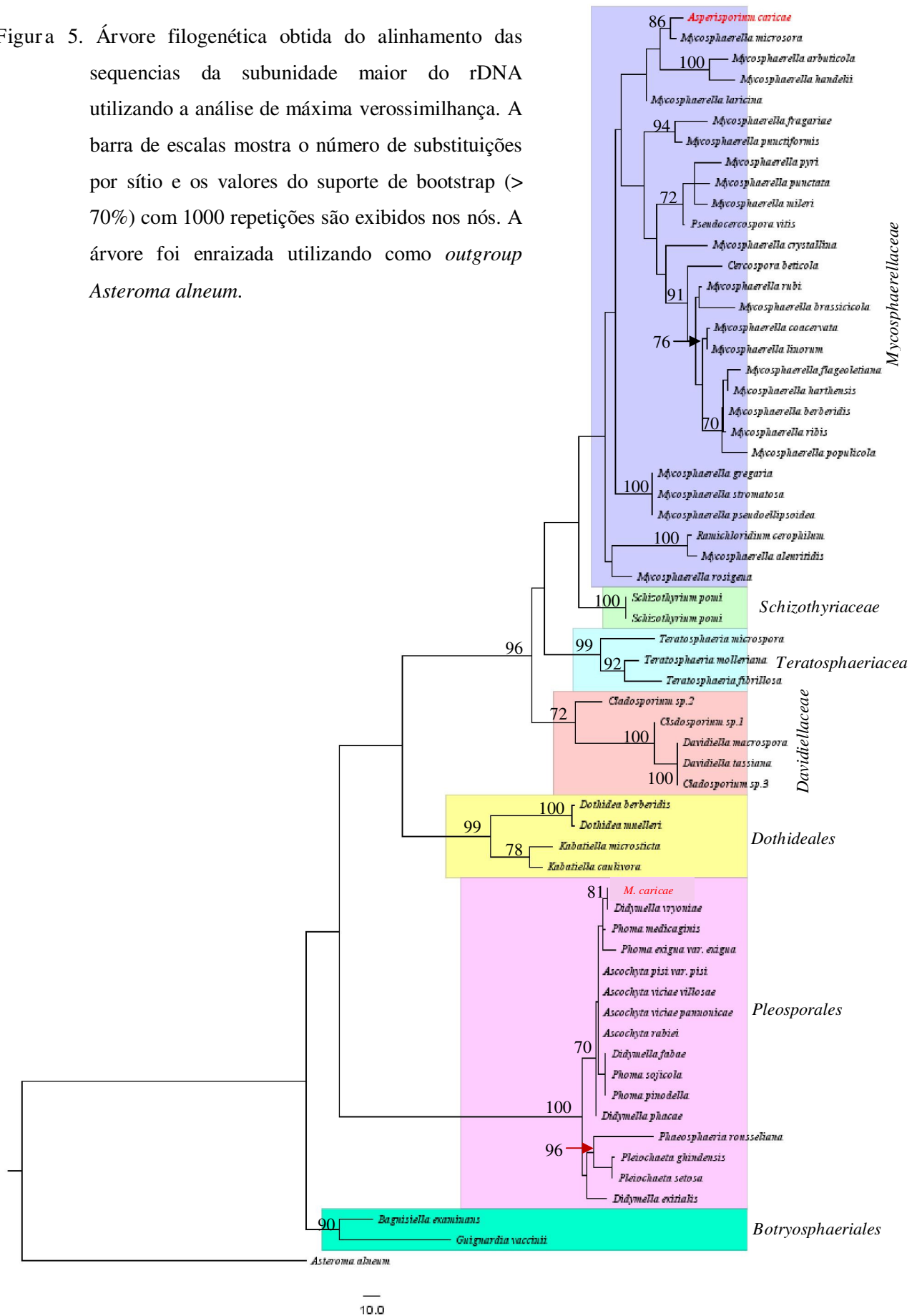


Figura 4. Árvore filogenética obtida do alinhamento das sequencias da subunidade maior do rDNA utilizando a análise de máxima parcimônia. A barra de escalas mostra o número de substituições por sítio e os valores do suporte de bootstrap (> 70%) com 1000 repetições são exibidos nos nós. A árvore foi enraizada utilizando como *outgroup* *Asteroma alneum*.

Figura 5. Árvore filogenética obtida do alinhamento das sequências da subunidade maior do rDNA utilizando a análise de máxima verossimilhança. A barra de escalas mostra o número de substituições por sítio e os valores do suporte de bootstrap (> 70%) com 1000 repetições são exibidos nos nós. A árvore foi enraizada utilizando como *outgroup* *Asteroma alneum*.



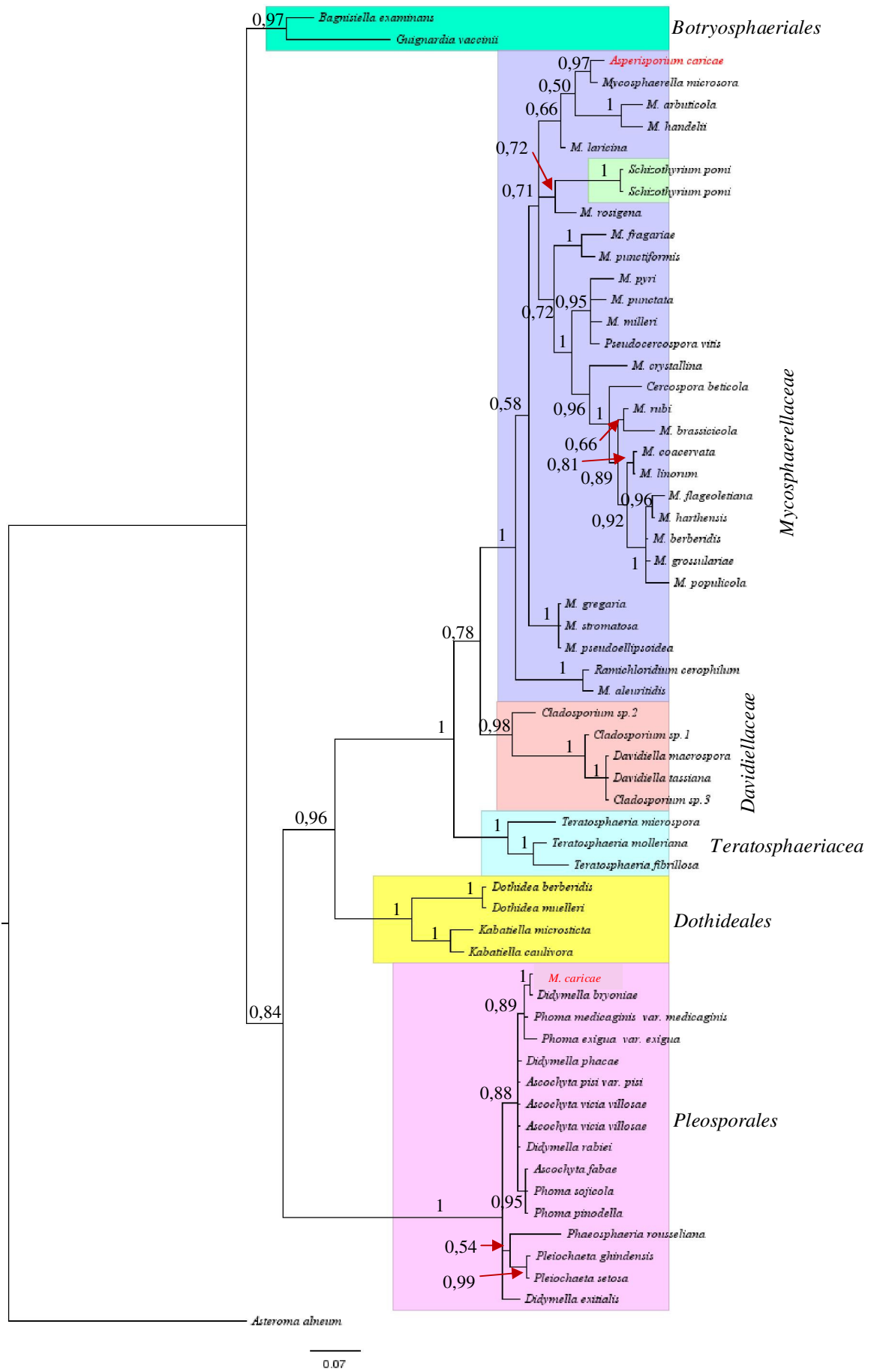
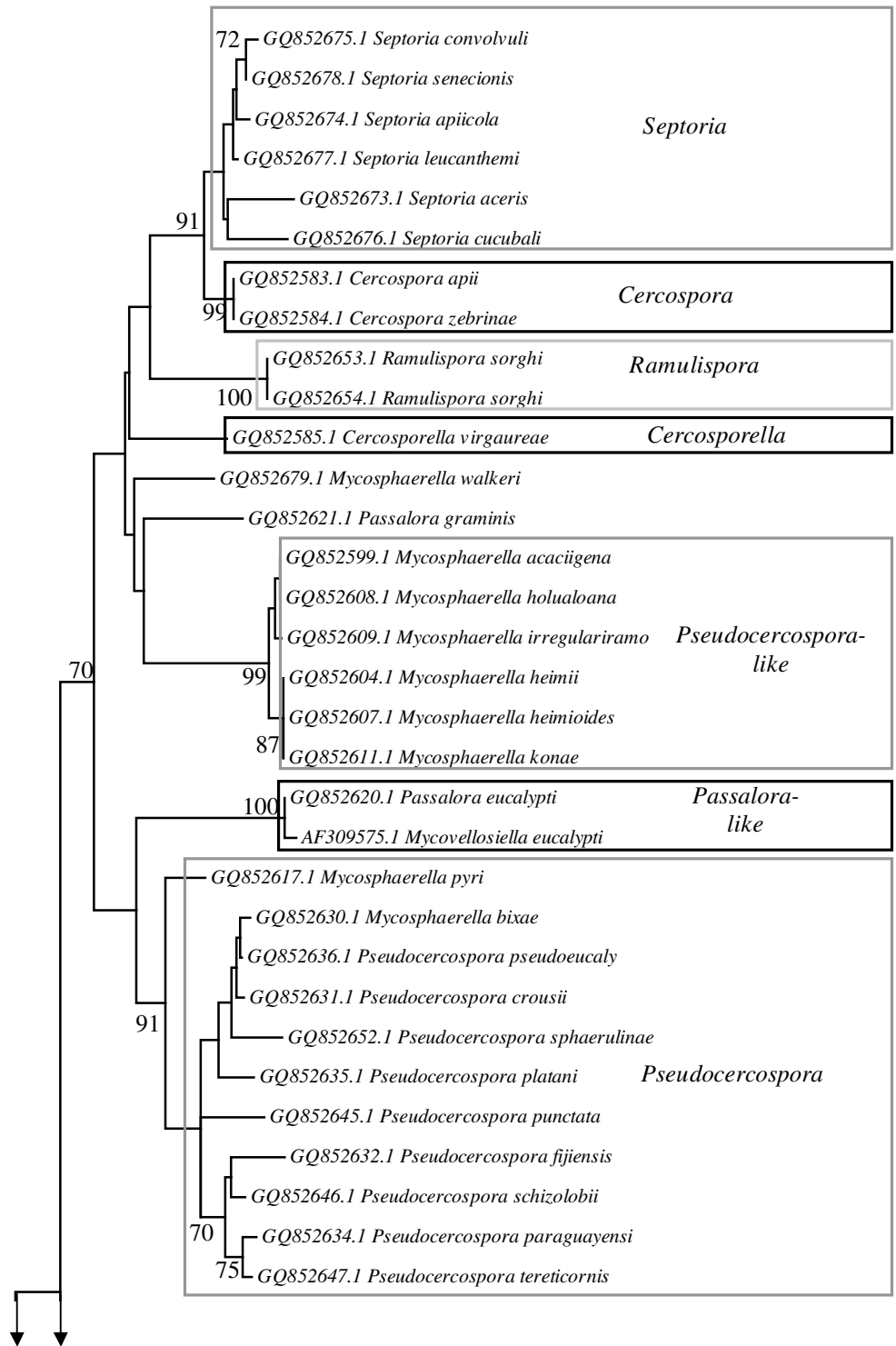
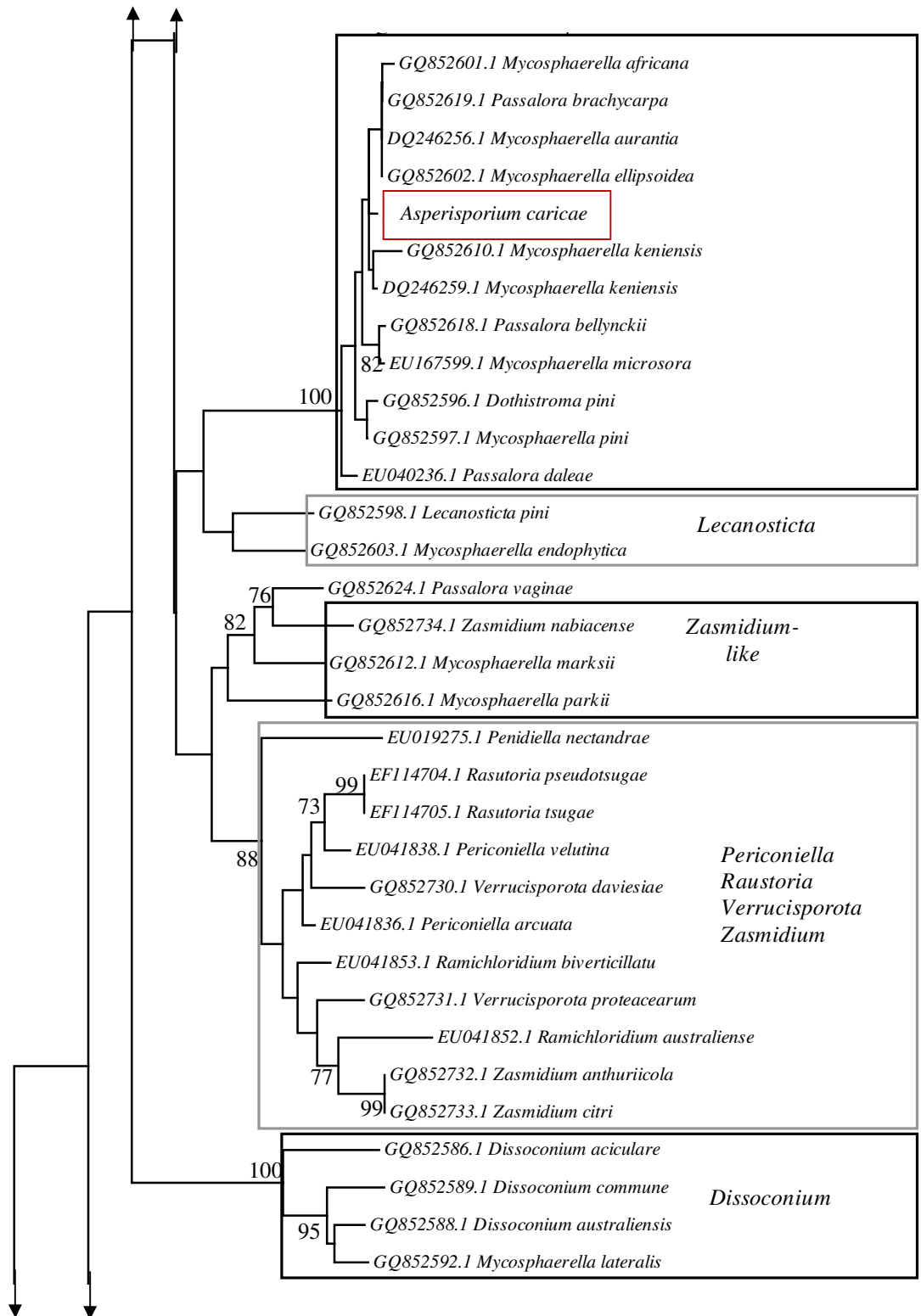


Figura 6. Árvore filogenética obtida do alinhamento das sequências da subunidade maior do rDNA utilizando a análise bayesiana. A barra de escalas mostra o número de substituições por sítio e os valores exibidos nos nós são referentes à probabilidade posterior realizada (>0,50) em 5.000.000 gerações. A árvore foi enraizada utilizando como *outgroup* *Asteroma alneum*.

Para o segundo alinhamento, o modelo utilizado para Neighbor joining foi Tamura-Nei. Os resultados obtidos em todas as análises foram similares, mostrando o agrupamento de *A. caricae*, com suporte de bootstrap de 100% e probabilidade posterior de 1%, com as espécies *Passalora brachycarpa* (Syd.) U. Braun e Crous (2003), *P. bellynckii* (Westend.) U. Braun (1995), *P. daleae*, *Mycosphaerella africana* Crous e M.J. Wingf. (1996), *M. aurantia* A. Maxwell (2003), *M. ellipsoidea* Crous e M.J. Wingf. (1996), *M. keniensis* Crous e T.A. Cout. (1998), *M. microsora* Syd. e P. Syd. (1940), *M. pini* Rostr. (1957) e *Dothistroma pini* Hulbary (1941) (Figura 7, Figura 8, Figura 9 e Figura 10).





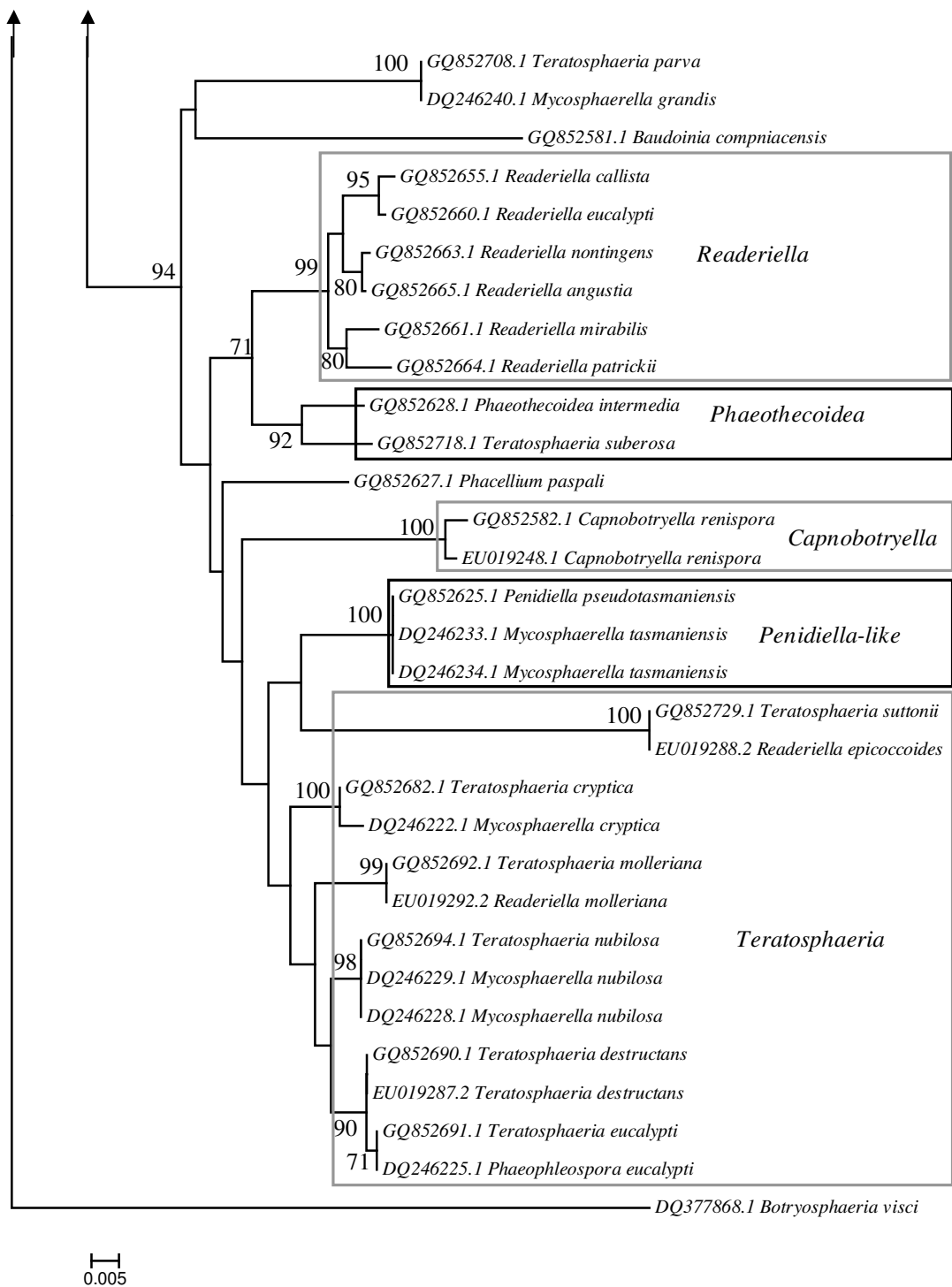


Figura 7. Árvore filogenética obtida do alinhamento das sequências da subunidade maior do rDNA utilizando a análise de Neighbor Joining (Tamura-Nei). Os valores do suporte de bootstrap (>70%) com 1000 repetições são exibidos nos nós. Utilizando como *outgroup* *Botryosphaeria visci* (Kalchbr.) Arx e E. Müll. (1954).

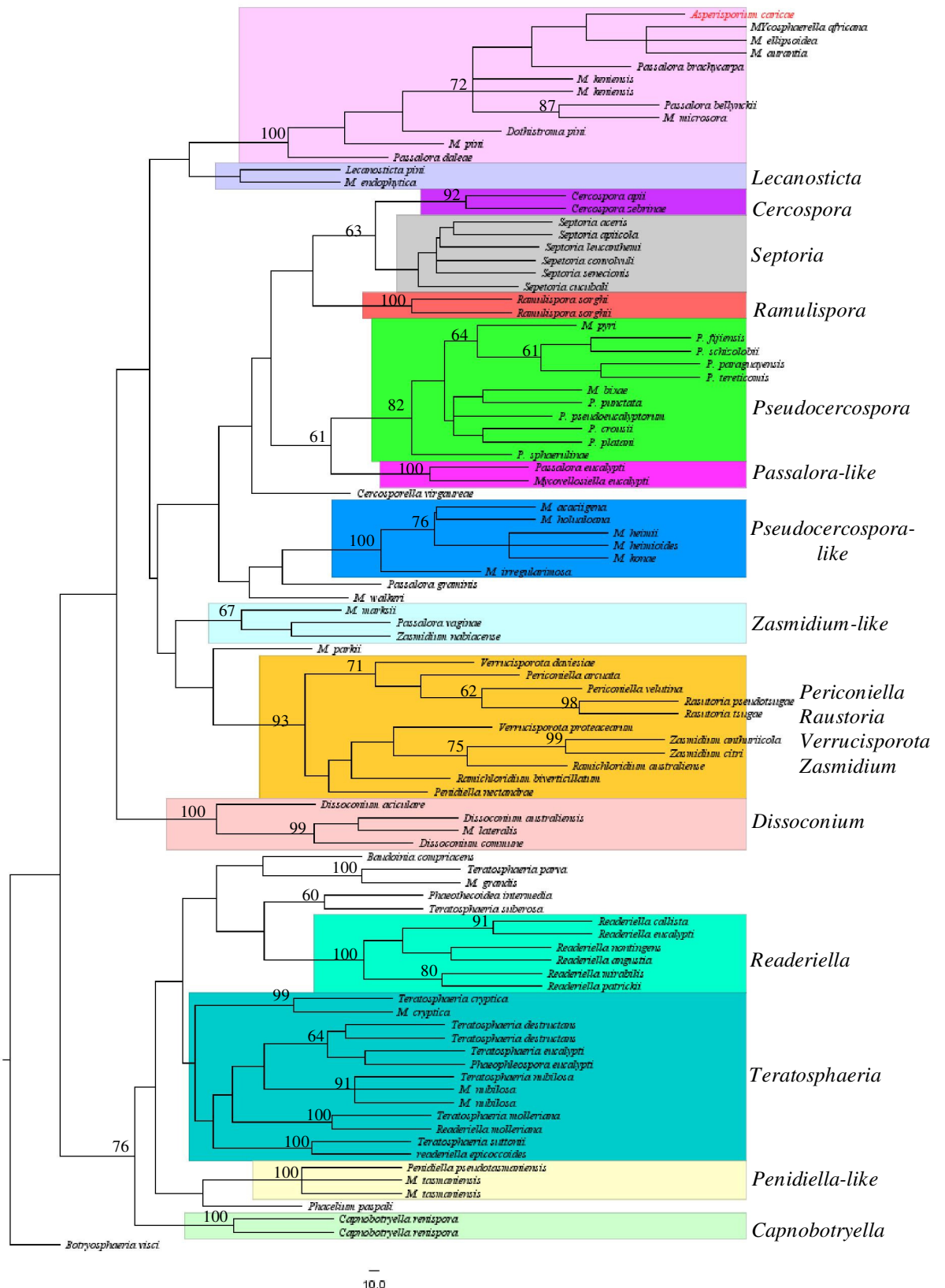


Figura 8. Árvore filogenética obtida do alinhamento das sequências da subunidade maior do rDNA utilizando a análise de máxima parcimônia. A barra de escalas mostra as mudanças de nucleotídeos e os valores do suporte de bootstrap (>60%) com 1000 repetições são exibidos nos nós. A árvore foi enraizada utilizando como *outgroup* *Botryosphaeria visci*.

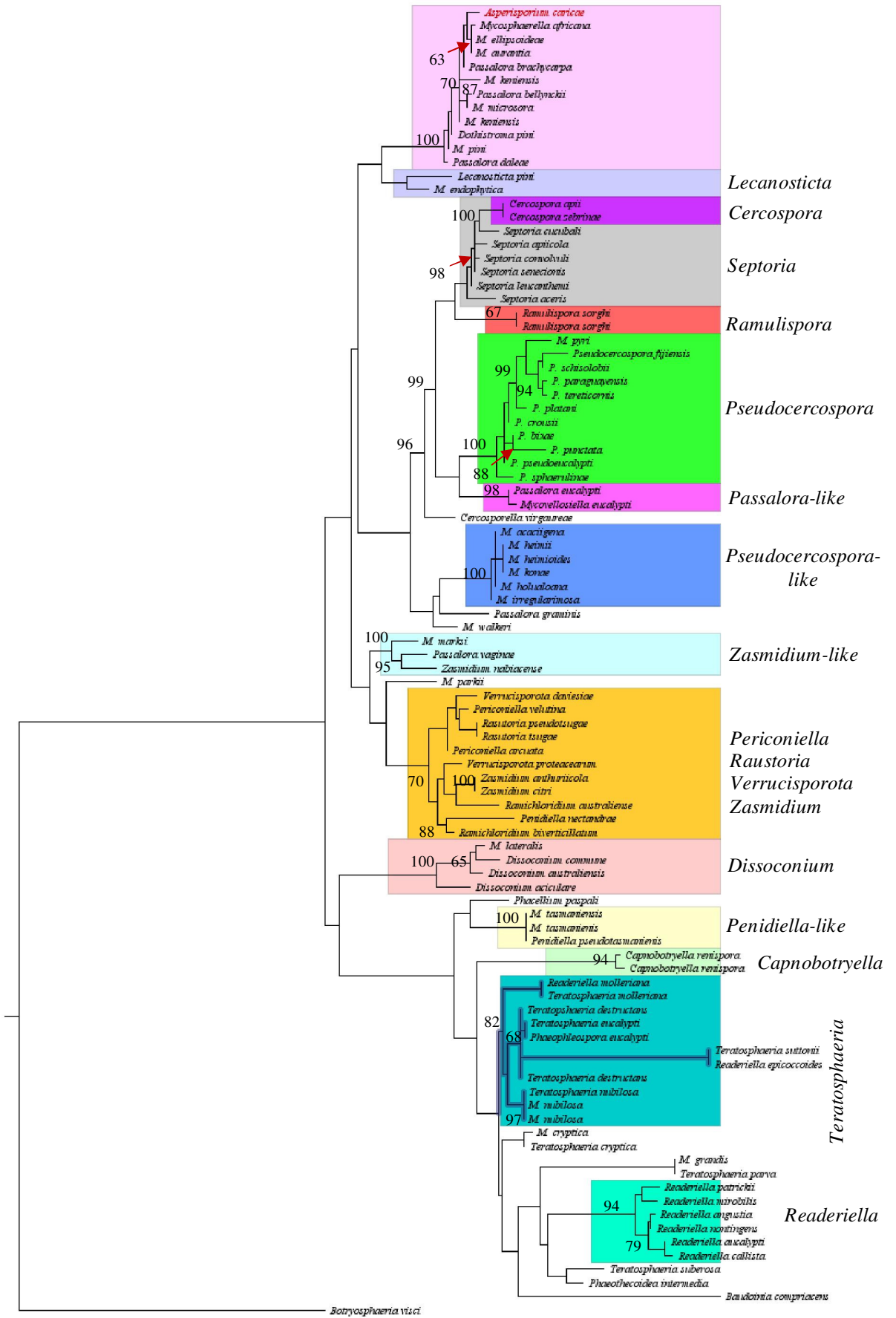
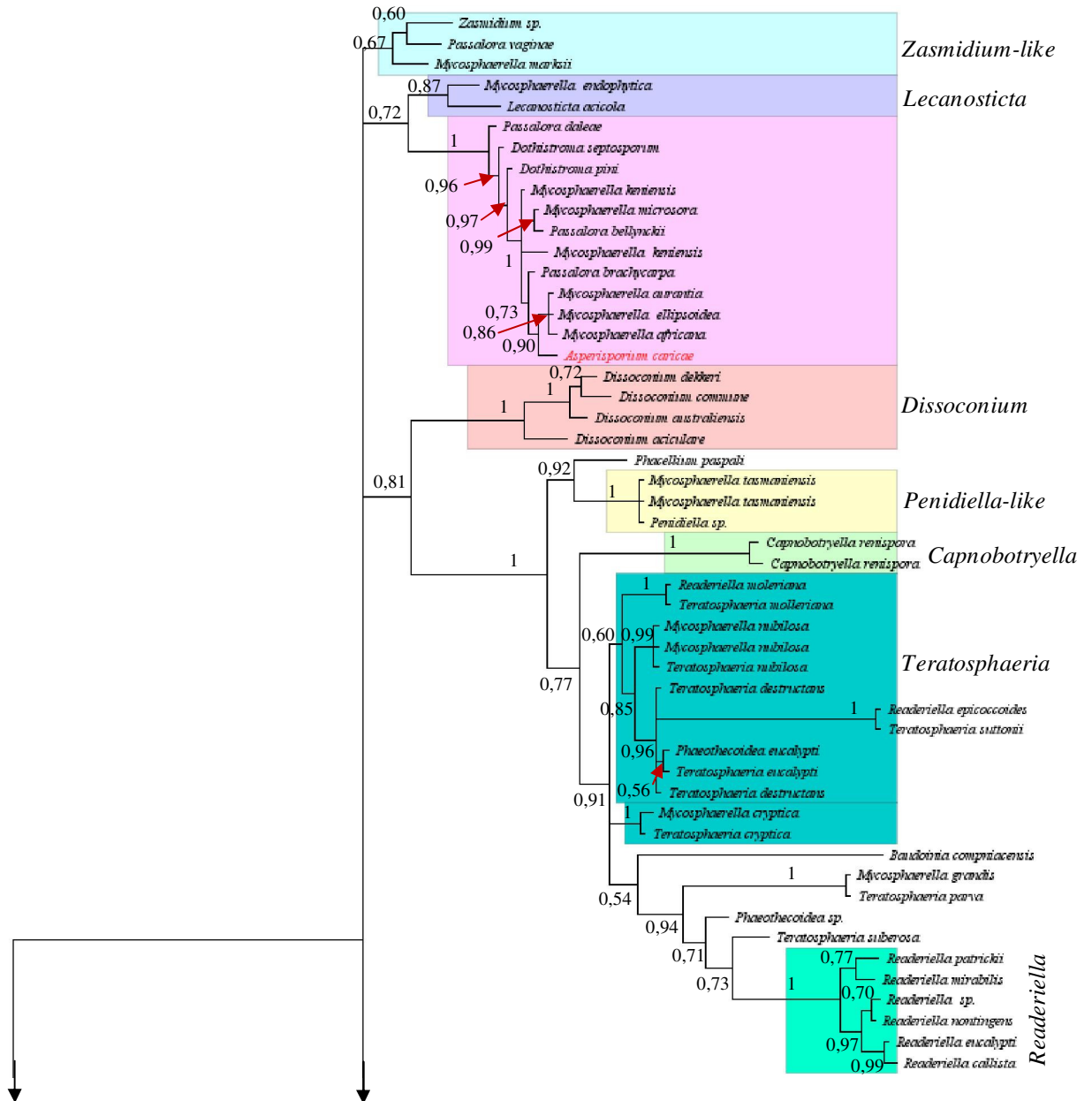


Figura 9. Árvore filogenética obtida do alinhamento das sequências da subunidade maior do rDNA utilizando a análise de máxima verossimilhança. A barra de escalas mostra o número de substituições por sítio e os valores do suporte de bootstrap (> 60%) com 1000 repetições são exibidos nos nós. A árvore foi enraizada utilizando como *outgroup* *Botryosphaeria visci*.



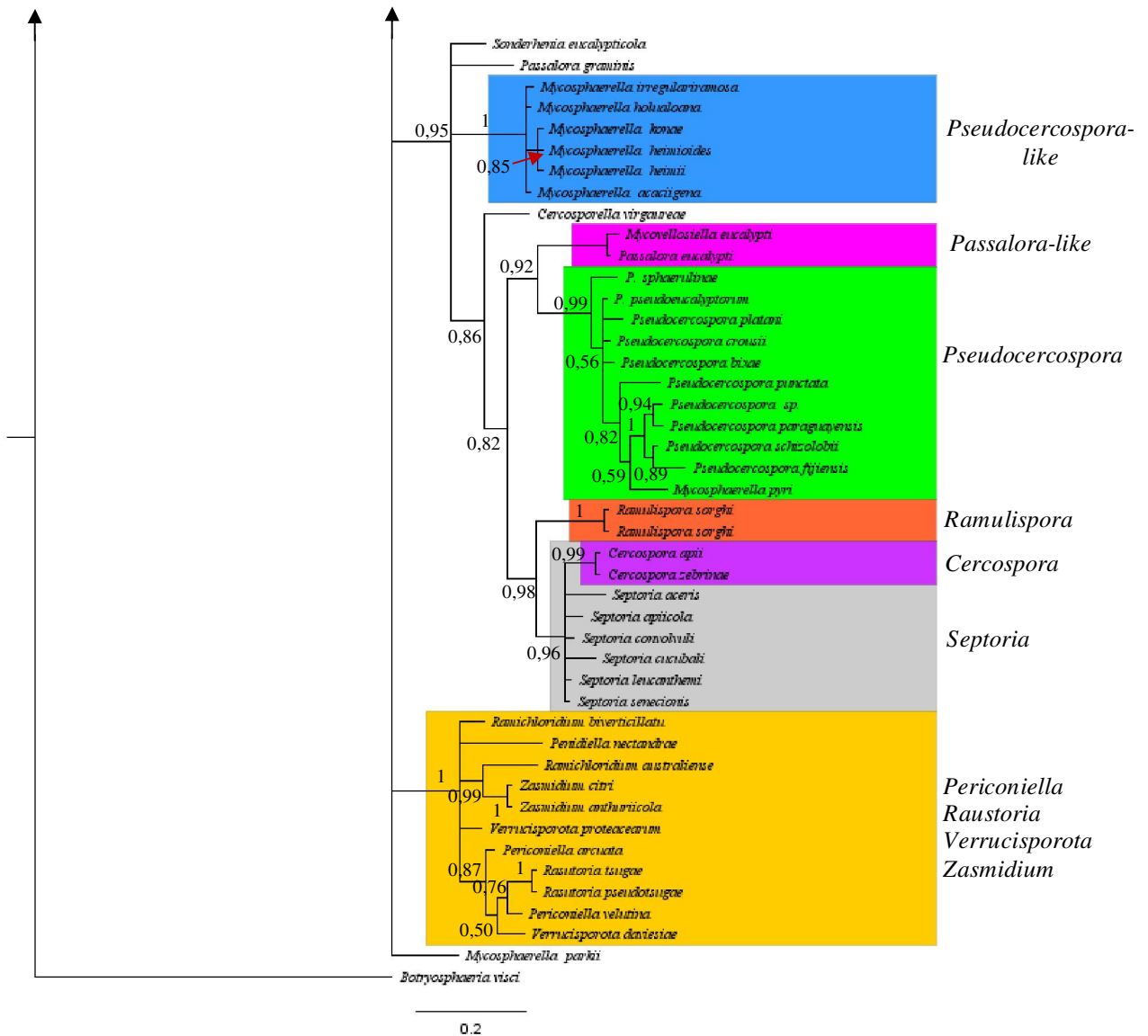


Figura 10. Árvore filogenética obtida do alinhamento das sequências da subunidade maior do rDNA utilizando a análise bayesiana. A barra de escalas mostra o número de substituições por sítio e os valores exibidos nos nós são referentes à probabilidade posterior realizada (>0,50) em 5.000.000 gerações. A árvore foi enraizada utilizando como *outgroup* *Botryosphaeria visci*.

No terceiro alinhamento, *Asperisporium caricae* agrupou-se com 99% de suporte de bootstrap com as espécies *Mycosphaerella mozambica* Arzanlou (2008) e *Passalora loranthi* (Petr.) U. Braun (1995) na análise de Neighbor Joining (Figura 11) e com suporte de 94% na análise de máxima parcimônia (Figura 12).

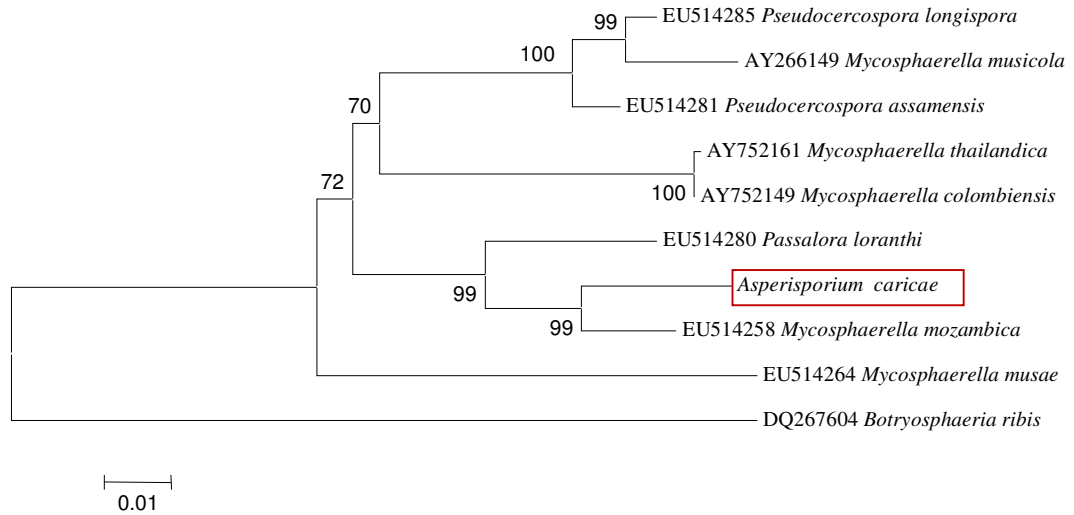
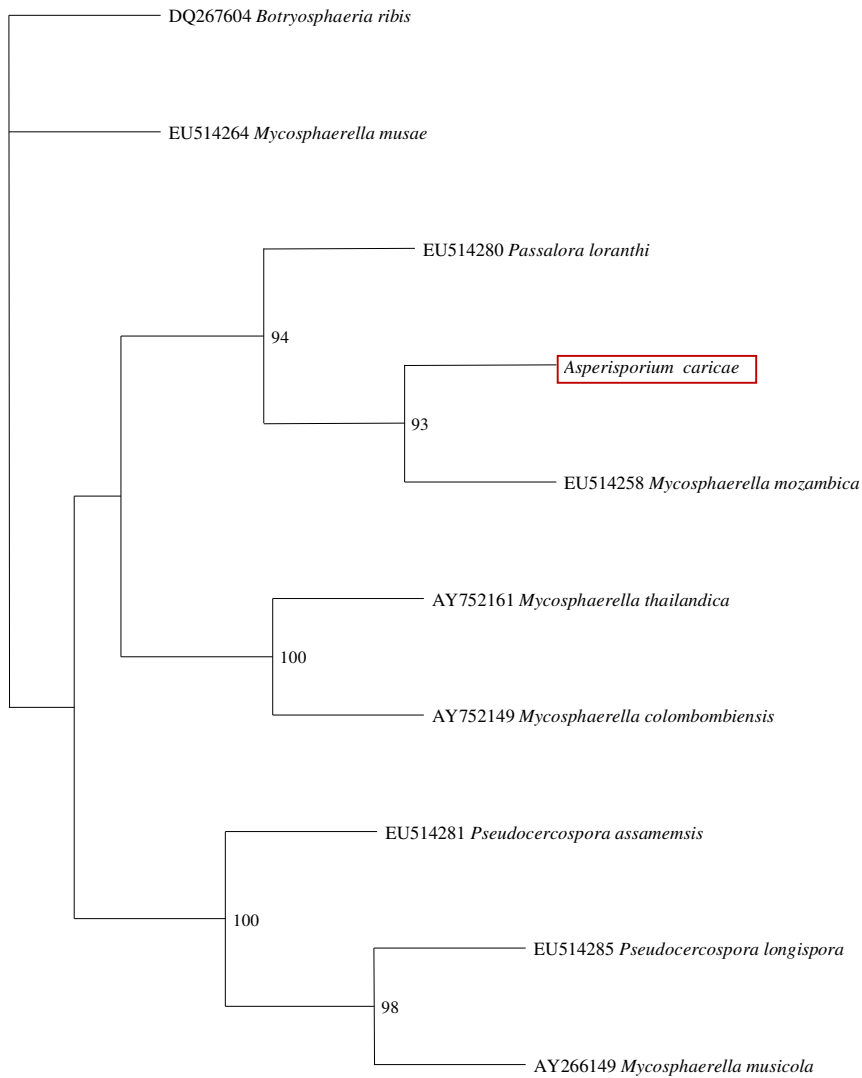


Figura 11. Árvore filogenética obtida do alinhamento combinado das sequencias ITS do rDNA e subunidade menor mitocondrial do rDNA (mtSSU) utilizando a análise de Neighbor Joining (Tamura-Nei). A barra de escalas mostra o número de substituições por sítio e valores do suporte de bootstrap (>70%) com 1000 repetições são exibidos nos nós. Utilizando como *outgroup* *Botryosphaeria ribis* Grossenb. & Duggar (1924).



10

Figura 12. Árvore filogenética obtida do alinhamento combinado das sequências ITS do rDNA e subunidade menor mitocondrial do rDNA (mtSSU) utilizando a análise de máxima parcimônia. A barra de escalas mostra as mudanças de nucleotídeos e os valores do suporte de bootstrap (>70%) com 1000 repetições são exibidos nos nós. A árvore foi enraizada utilizando como *outgroup* *Botryosphaeria ribis*.

## 5. DISCUSSÃO

Apesar da enorme importância da varíola ou pinta preta na cultura do mamoeiro, estudos que norteiam a biologia de *A. caricae* são quase inexistentes. A grande maioria dos trabalhos referentes a esse fitopatógeno concentra-se no controle químico da doença por ele incitada (Celoto *et al.*, 2003; Santos e Barreto, 2003; Ventura *et al.*, 2003; Tatagiba *et al.*, 2005; Pratissoli *et al.*, 2007; Dianese *et al.*, 2008). Um dos trabalhos pioneiros referente ao crescimento deste fitopatógeno em meios de cultura sintéticos foi conduzido por Chambers & Rijkenberg (1987), em que 29 diferentes meios de cultivo foram testados com sucesso no crescimento vegetativo em apenas três destes meios e produção de conídios em apenas duas colônias crescidas no meio composto por minerais e dextrose. Diferentemente do observado por Chambers & Rijkenberg (1987), observou-se no nosso trabalho que *A. caricae* foi capaz de crescer em todos os sete meios de cultivo testados (BDA, CMA, OMA, CVA, BDA suplementado com aminoácidos, FMA, CFMA), com capacidade de esporulação em seis destes. Estes resultados contrapõem os resultados de Chambers (1978) da possível condição biotrófica desse fitopatógeno. Estudos futuros sobre a sobrevivência de *A. caricae* em restos culturais devem ser desenvolvidos no intuito de auxiliarem no manejo integrado da varíola do mamoeiro.

Outro ponto controverso a respeito de *A. caricae* é relativo à sua conexão com *M. caricae*. Maublanc (1913) ao descrever a espécie, considerou *A. caricae* anamorfo de *Sphaerella caricae* (= *M. caricae*). Apesar da presença concomitante de esporodóquios de *A. caricae* e peritécios de *M. caricae* no material tipo (Figura 13), tal conexão afirmada por Maublanc (1913) sempre foi fonte de controvérsia (Crous *et al.*, 2001, Crous e Braun, 2003).

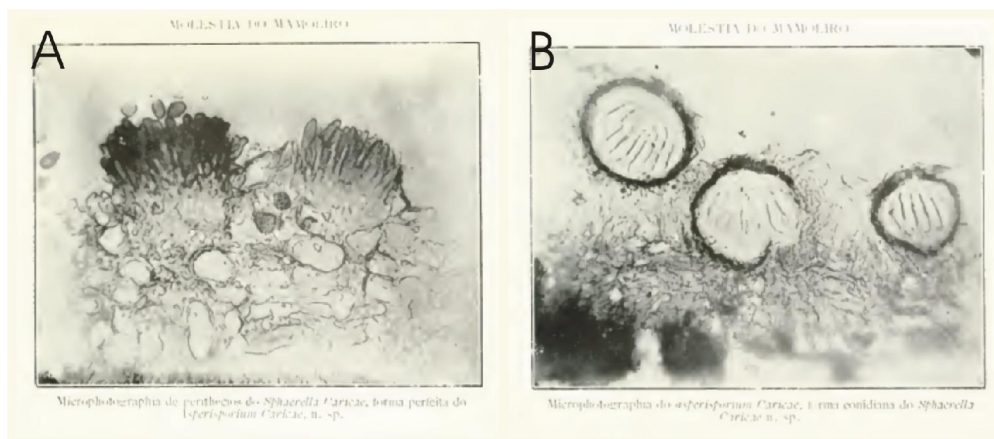


Figura 13. Ilustrações originais das espécies (A) *Asperisporium caricae*, conidióforos arranjados em esporodóquios e conídios. (B) *Sphaerella caricae* (= *Mycosphaerella caricae*), peritécios contendo ascas com ascósporos. Fonte: Maublanc, 1913.

Outros autores associam *M. caricae* ao anamorfo *Phoma caricae-papayae* (Tarr) Punith., agente etiológico da podridão peduncular (Punithalingam, 1980; Persley e Ploetz, 2003). O status taxonômico de *Phoma caricae-papayae* é considerado fonte de controvérsia, uma vez que a literatura fitopatológica muitas vezes se refere à essa espécie como sendo *Ascochyta caricae-papayae* Tarr ou *Ascochyta caricae* Pat. (Boerema *et al.*, 2004). *Phoma caricae-papayae* foi relacionada como anamorfo de *M. caricae* por Ullasa *et al.* (1974) através das observações de peritécios de *M. caricae* e picnídios de *P. caricae-papayae* presentes no mesmo material vegetal. Entretanto, do mesmo modo que em *A. caricae*, esta conexão nunca foi comprovada.

De acordo com os agrupamentos filogenéticos estabelecidos, os isolados de *M. caricae* obtidos de folhas de mamoeiro sintomáticas, na região de Viçosa, agrupam-se com espécies de *Didymella* [próximo a *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm] corroborando a conexão de *M. caricae* com *P. caricae-papayae*. Entretanto, a diferença entre *Mycosphaerella* e *Didymella* é a presença de pseudoparáfises nesse último, característica não observada em nosso material de *M. caricae*. Talvez a conexão com o

respectivo anamorfo, seja um caractere taxonomicamente mais informativo do que a presença de pseudoparáfises para diferenciar *Mycosphaerella* de *Didymella*.

*Asperisporium caricae* agrupou-se no clado pertencente à família *Mycosphaerellaceae*, com espécies verdadeiras de *Passalora* (*P. brachycarpa*, *P. bellynchii* e *P. daleae*) e com espécies de *Mycosphaerella* no qual o anamorfo é desconhecido ou pouco conhecido (*M. africana*, *M. ellipsoidea*, *M. aurantia*, *M. keniensis*, *M. microsora* e *M. pini*). Este agrupamento corrobora a correlação anteriormente estabelecida entre os gêneros *Asperisporium* e *Passalora* inferindo uma relação filogenética próxima. Os gêneros compartilham diversas características morfológicas, como as células conidiogênicas ligeiramente geniculadas, com cicatriz conspícua, terminais ou laterais e protuberantes (Crous *et al.*, 2001). Contudo, *Asperisporium* spp. são facilmente distinguíveis de *Passalora* spp. pela presença de verrugosidade nos conídios, embora hajam espécies intermediárias como *Passalora scariolae* Syd. (Deighton, 1967) e *Passalora milii* (Syd.) de Vries (1952) com conídio verrugoso-rugoso.

Comparativamente com os clados estabelecidos para a família *Mycosphaerellaceae* (Crous *et al.*, 2009a; Crous, 2009b), futuramente uma nova família pode englobar os gêneros *Asperisporium* e *Passalora*, já que baseado nas análises filogenéticas de sequências de DNA, outros anamorfos anteriormente alocados dentro da família *Mycosphaerellaceae* já foram rearranjados em outras famílias. O gênero anamorfo *Cladosporium* foi alocado dentro de *Davidiella* (*Davidiellaceae*) (Braun *et al.*, 2003), *Schizothyrium* com o anamorfo *Zygophiala* (*Schizothyriaceae*) (Batzer *et al.*, 2008), *Teratosphaeria* abrangendo mais de 12 anamorfos (*Teratosphaeriaceae*) (Crous *et al.*, 2007a) e *Mycosphaerella* com mais de 20 gêneros anamorfos (*Mycosphaerellaceae*) (Crous e Braun, 2003), sendo todas essas famílias pertencentes à

ordem *Capnodiales* e classe *Dothideomycetes*. A obtenção futura de culturas de outras espécies do gênero *Asperisporium* auxiliará ainda mais no esclarecimento dos caracteres morfológicos que refletem a filogenia desse gênero cercosporóide.

## 6. CONCLUSÕES

- *Asperisporium caricae* é passível de ser cultivado e esporular *in vitro*, provavelmente sendo um fungo hemibiotrófico.
- *Asperisporium caricae* não é anamorfo de *Mycosphaerella caricae*, tratando-se de espécies distintas e não da conexão anamorfo-teleomorfo.
- *Asperisporium caricae* é pertencente à família *Mycosphaerellaceae*, filogeneticamente próximo de espécies de *Passalora*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alfenas, A.C. e Mafia, R.G. (2007). Isolamentos In: Métodos em Fitopatologia (eds. A.C. Alfenas e R.G. Mafia). Viçosa, Brasil: 63.

Agrianual - Anuário da Agricultura Brasileira. Mamão (2009). FNP Consultoria e Comércio. São Paulo, Brasil: 349-351.

Anuário Hortifruti Brasil 2008-2009. Oferta elevada e alto custo limitam rentabilidade – Mamão. Hortifruti Brasil. Edição especial. Ano 7. N°75: 41-42.

Arzanlou, M., Groenewald, J.Z., Gams, W., Braun, U., Shin, H.D. e Crous, P.W. (2007). Phylogenetic and morphotaxonomic revision of *Ramichloridium* and allied genera. *Studies in Mycology* 58: 57-93.

Arzanlou, M., Groenewald, J.Z., Fullerton, R.A., Abeln, E.C.A., Carlier, J., Zapater, M.-F., Buddenhagen, I.W., Viljoen, A. e Crous, P.W. (2008). Multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several novel species of *Mycosphaerella* and anamorphs on banana. *Persoonia* 20: 19: 37.

Badillo, V.M. (2000). *Carica* L. vs. *Vasconcella* St Hil. (*Caricaceae*): con la rehabilitacion de este ultimo. *Ernstia* 10: 74-79.

Batzer, J.C, Mercedes Diaz Arias, M., Harrington, T.C., Gleason, M.L., Groenewald, J.Z. e Crous, P.W. (2008). Four species of *Zygophiala* (*Schizotryiaceae*, *Capnnodeales*) are associated with the sooty blotch and flyspeck complex on apple. *Mycologia* 100: 232-244.

Bergamin F.A. e Kimati, H. (1997). Doenças do mamoeiro *Carica papaya* L. In: Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas (eds. F. Galli e H. Tokeshi). 2: 486-496.

- Boerema, G.H., de Gruyter, J., Noordeloos, M.E. e Hamers, M.E.C. (2004). *Phoma* Identification Manual: differentiation of specific and infra-specific taxa in culture. CABI Publishing: 235.
- Braun, U. (1995). *A monograph of Cercospora, Ramularia and Allied Genera (Phytopathogenic Hyphomycetes)*. Vol. 1. IHW-Verlag, Echting, Germany.
- Braun, U. (1998). *A Monograph of Cercospora, Ramularia and Allied Genera (Phytopathogenic Hyphomycetes)*. Vol. 2. IHW-Verlag, Echting, Germany.
- Braun, U., Crous, P.W., Dugan, F., Groenewald, J.G. e Hoog, S.G. de. (2003). Phylogeny and taxonomy of *Cladosporium*-like hyphomycetes, including *Davidiella* gen.nov., the teleomorph of *Cladosporium* s str. Mycological Progress 2:3-18.
- Celoto, M.I.B., Papa, M.F.S. e Correa, L.S. (2003). Efeito de fungicidas no controle da varíola (*Asperisporium caricae*) do mamoeiro. Summa Phytopathologica 29: 87.
- Chambers, K.R. (1978). Studies on *Asperisporium caricae*, the causal organism of papaw black spot M.Sc. Thesis. University of Natal Pietermaritzburg, South Africa.
- Chambers, K.R. e Rijkenberg, F.H.J. (1987). Culture of *Asperisporium caricae*, the papaya black spot organism. Phytophylactica 19:113.
- Costa, A.S., Carvalho, A.M. e Kamada, S. (1969). Constatado o mosaico do mamoeiro em São Paulo. In. O Agrônomo. Campinas, SP 21: 38-43.
- Crous, P.W. (2009b). Taxonomy and phylogeny of the genus *Mycosphaerella* and its anamorphs. Reviews, Critiques and New Ideas. Fungal Diversity: 1-24.
- Crous, P.W. e Braun, U. (2003). *Mycosphaerella* and its anamorphs. 1. Names published in *Cercospora* and *Passalora*. CBS Biodiversity Series 1: 1-571.
- Crous, P.W., Braun, U. e Groenewald, J.Z. (2007a). *Mycosphaerella* is polyphyletic. Studies in Mycology 58: 1-32.

Crous, P.W., Kang, J.C. e Braun, U. (2001). A phylogenetic redefinition of anamorph genera in *Mycosphaerella* based on ITS rDNA sequence and morphology. *Mycologia* 93: 1081-1101.

Crous, P.W., Braun, U., Schubert, K. e Groenewald, J.Z. (2007b). Delimiting *Cladosporium* from morphologically similar genera. *Studies in Mycology* 58: 33-56.

Crous, P.W., Groenewald, J.Z., Mansilla, J.P., Hunter, G.C. e Wingfield, M.J. (2004). Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on *Eucalyptus*. *Studies in Mycology* 50: 195-214.

Crous, P.W., Summerell, B.A., Carnegie, A.J., Wingfield, M.J., Hunter, G.C., Burgess, T.I., Andjic, V., Baber, J.Z. e Groenewald, P.A. (2009a). Unravelling *Mycosphaerella*: do you believe in genera? *Persoonia* 23: 99-118.

Dianese, A. de C., Blum, L.E.B., Dutra, J.B., Lopes, L.F., Sena, M.C. e Freitas, L. de F. (2008). Avaliação do efeito de fosfitos na redução da varíola (*Asperisporium caricae*) do mamoeiro (*Carica papaya*). *Revista Brasileira de Fruticultura* 30(3): 834-837.

Ellis, M. B. e Holliday, P. (1972). *CMI Descriptions of Fungi and Bacteria*: 35.

FAO 2006. Disponível em: <http://www.faostat.org.br>. Acesso em: 28 de janeiro de 2009.

Gascuel, O. e Steel, E.M. (2006). Neighbor-Joining Revealed. *Molecular Biology and Evolution* 23: 1997-2000.

Guarro, J., Gené, J. e Stchigel, A.M. (1999). Developments in fungal taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 454–500.

Hanlin, T.R. (1990). *Illustrated Genera of Ascomycetes*. St. Paul. Minnesota.

Hernández – Gutiérrez, A. (2000). Fungos cercosporóides em plantas nativas do cerrado. (Tese de doutorado – Universidade de Brasília). Brasília, DF. 272.

Huelsenbech, J.P. e Ronquist, F. (2001). Mr. Bayes: Bayesian inference of phylogenetic tree. *Bioinformatics Applications Notes* 17: 754-755.

Hunter, G.C., Wingfield, B.D., Crous, P.W. e Wingfield, M.J. (2006). A multi-gene phylogeny for species of *Mycosphaerella* occurring on *Eucalyptus* leaves. *Studies in Mycology* 55: 147–161.

IBGE. (2007). Produção Agrícola Municipal: 34.

Kimura, M. (1980). A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.

Kumar, S., Nei, M., Dudley, J. e Tamura, K. (2008). MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* 9: 299-306.

Liberato, J.R. e Zambolim, L. (2002). Controle das doenças causadas por fungos, bactérias e nematóides em mamoeiro. In: Controle de doenças de plantas: fruteiras (eds. L. Zambolim, F.X.R. do Vale, A.J.A. Monteriro e H. Costa). Suprema Gráfica e Editora. Viçosa, Brasil: 2: 1023-1138.

Maddison, D.R. (1991). The discovery and importance of multiple islands of most-parsimonious trees. *Systematic Zoology* 40(3): 315-328.

Martins, D.S. (2000). Exportação de mamão ‘Solo’ para os Estados Unidos- Procedimentos. In: Mamão: Fitossanidade (eds. C.H.S.P. Ritzinger e J.S. Souza). EMBRAPA. Brasília, Brasil: 15-22.

Massee, G.E. (1898). Bulletin of Miscellaneous Informations of the Royal Botanical Gardens Kew 1898: 133.

Mattos, C.R.R. (1999). Meios de cultura com água de coco verde para esporulação de *Microcyclus ulei*. *Tropical Plant Pathology* 24: 470.

Maublanc, A. (1913). Sur une maladie de feuilles du papayer "*Carica papaya*". *Lavoura* 16: 208-212.

Murray, M.G. e Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321-4325.

Nakasome, H.Y. e Paul, R.E. Papaya. (1998). In: *Tropical Fruits. Crop Production Science in Horticulture Series No.7*. CAB International, Wallingford, UK: 239-269.

Nishijima, W.T. (1994). *Cercospora* black spot. In: *Compendium of Tropical Fruit Diseases* (eds. R.C. Ploetz, G.A. Zentmyer, W.T. Nishijima, K.G. Rohrbach e H.D. Ohr). APS Press, St Paul, Minnesota: 59.

Noronha, A.C.S., Santos, F.H.P., Sanches, N., Lopes, F.F., Oliveira, A.M.G. e Santos, M.J. (2005). Procedimentos para o monitoramento de pragas em mamoeiro no extremo Sul do Estado da Bahia. In: *Papaya Brasil: Mercado e Inovações tecnológicas para o mamão* (eds. D.S. Martins) Incaper. Vitória, Brasil: 458-460.

Nylander, J.A.A. (2004). MrModelTest. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala.

O'Donnell, K. (1992). Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). *Current Genetics* 22: 213-220.

Oliveira, A.A.R. e Santos, F.H.P. (2000). Doenças. In: *Mamão: fitossanidade* (eds. C.H.S.P. Ritzinger, J.S. Souza). Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. Brasília, Brasil: 37-46.

- Pereira, J.M., Barreto, R.W., Ellison, C.A. e Maffia, L.A. (2003). *Corynespora cassicola* f. sp. *lantanae*: a potential biocontrol agent from Brazil for *Lantana camara*. *Biological Control* 26: 21-31.
- Persley, D.M. e Ploetz, R.C. (2003). Diseases of Papaya. In: Diseases of Tropical Fruit crops (eds. R.C. Ploetz). CABI Publishing: 379-382.
- Peterson, R.A., Coates, L.M. e Persley, D.M. (1993). Papaw Diseases. In: Diseases of Fruits Crops (eds. D.M. Persley). Department of Primary Industries, Queensland, Australia: 70-76.
- Philips, A.J., Alves, A., Burgess, T., Barber, P. e Groenewald, J.Z. (2006). Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Studies in Mycology* 55: 235-253.
- Posada, D. e Crandall, K.A. (1998). MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics Applications Notes* 14(9): 817.
- Pratissoli, D., Almeida, G.D. de, Jesus, W.C.J., Vicentini, V.B., Holtz, A.M. e Cochetto, J.G. (2007). Fertilizante organomineral e argila silicatada como indutores de resistência à varíola do mamoeiro. *Idesia, Chile* 25(2): 63-67.
- Punithalingam, E. (1980). A combination in *Phoma* for *Ascochyta caricae-papayae*. *Transactions of the British Mycological Society* 75(2): 340-341.
- Ross, P. e Chay-Prove, P. M. (2000). Papaw Information Kit. Agrilink Series, Queensland Horticulture Institute, Department of Primary Industries. Queensland, Australia.
- Saitou N. e Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstruction of phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-25.
- Santos, M.C. e Barreto, M. (2003). Estudo epidemiológico da varíola do mamoeiro em cultivares submetidas a tratamentos com fungicidas. *Summa Phytopathologica* 29 (2): 141-146.

Santos Filho, H.P., Oliveira, A.A.R., Noronha, A.C.S., Sanches, N.F., Lopes, F.F.; Andrade, P.R.O., Osorio, A.C.B., Souza, J.A., Oliveira, A.M.G. e Santos, M.J. (2007). Monitoramento e controle da Pinta Preta do mamoeiro *Asperisporium caricae* (Speg.) Maubl. In: Papaya Brasil: Manejo, Qualidade e Mercado e inovações tecnológicas para o mamão (eds. D.S. Martins). Incaper. Vitória, Brasil: 472-475.

Sheen, J., Kho, Y.H. e Bae, K.S. (1993). Genomic sequence of mitochondrial genes coding for ATPase subunit 6 and small subunit ribosomal RNA from *Penicillium chrysogenum*: a key for molecular systematics on fungi. *Nucleic Acids Research* 21: 4393.

Simon, U.K., Groenewald, J.Z. e Crous, P.W. (2009). *Cymathodea trifolii*, an obligate biotrophic leaf parasite of *Trifolium*, belongs to *Mycosphaerellaceae* as shown by nuclear ribosomal DNA analyses. *Persoonia* 22: 49-55.

Souza, JR. (2000). M.T. Mamão Transgênico - Uso da engenharia genética para obter resistência ao vírus da mancha anelar. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 13: 132-137.

Souza, V.C. e Lorenzi, H. (2005). Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII. Instituto Plantarum, Nova Odessa.

Staden, R., Beal, K.F. e Bonfield, J.K. (1999). The Staden Package, 1998. *Methods in Molecular Biology* 132: 115-130.

Steward, C.B. (1993). The powers and pitfalls of parcimony. *Nature* 361: 603-607.

Steward, E.L., Liu, Z., Crous, P.W. e Szabo, L. (1999). Phylogenetic relationships among some cercosporoid anamorphs of *Mycosphaerella* based on rDNA sequence analysis. *Mycological Research* 103(11): 1491-1499.

Swofford, D.L. (2002). PAUP\*: phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Tatagiba, J.S. e Aguilar, M.A.G. (2005). Eficiência do Midas BR no controle da pinta preta (*Asperisporium caricae*) do mamoeiro (*Carica papaya* L.). In: Papaya Brasil: mercado e inovações tecnológicas para o mamão (eds. D.S. Martins). Incaper. Vitória, Brasil: 405-408.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. e Kumar, S. (2007). MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24(8): 1596-1599.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. e Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.

Ullasa, B.A., Sohi, H.S. e Ganapathy, K.M. (1974). *Ascochyta* leaf spot of papaya and its perfect state. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology* 4(2): 218-219.

Ventura, J.A., Costa, H. e Tatagiba, J.S. (2003). Manejo das doenças do mamoeiro. In: A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção (eds. D.S. Martins e A.F.S. Costa). Incaper. Vitória, Brasil: 229-308.

Winton, L.M., Stone, J.K., Hansen, E.M. e Shoemaker, R.A. (2007). The systematic position of *Phaeocryptopus gaeumannii*. *Mycologia* 99(2): 240-252.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. e Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (eds. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky e T.J. White): 315-322.