



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

**Estrutura populacional de isolados de *Lasiodiplodia
theobromae* de mamão produzido no Nordeste brasileiro
baseada em grupos de compatibilidade micelial**

Tamiris Joana dos Santos Rêgo

**Recife – PE
2014**

TAMIRIS JOANA DOS SANTOS RÊGO

**ESTRUTURA POPULACIONAL ISOLADOS DE
LASIODIPLODIA THEOBROMAE DE MAMÃO PRODUZIDO
NO NORDESTE BRASILEIRO BASEADA EM GRUPOS DE
COMPATIBILIDADE MICELIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Prof. Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara (UFRPE) – Orientador

Prof. Dr. Sami Jorge Michereff (UFRPE) – Coorientador

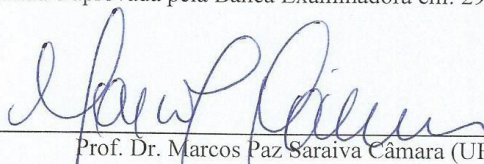
**RECIFE – PE
JULHO – 2014**

**ESTRUTURA POPULACIONAL DE ISOLADOS DE
LASIODIPLODIA THEOBROMAE DE MAMÃO
PRODUZIDO NO NORDESTE BRASILEIRO BASEADA
EM GRUPOS DE COMPATIBILIDADE MICELIAL**

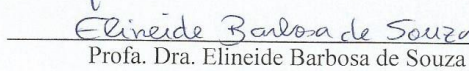
TAMIRIS JOANA DOS SANTOS RÊGO

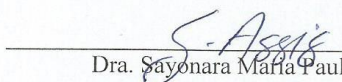
Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 29/07/2014.

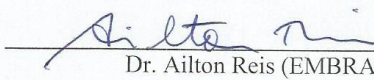
ORIENTADOR:


Prof. Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara (UFRPE)

EXAMINADORES:


Profa. Dra. Elineide Barbosa de Souza (UFRPE)


Dra. Sayonara Máfia Paulino de Assis (MAPA)


Dr. Ailton Reis (EMBRAPA Hortaliças)

**RECIFE – PE
JULHO – 2014**

“Quando eu era criança, falava como criança, pensava como criança, raciocinava como criança. Depois que me tornei adulta, deixei o que era próprio de criança. Agora vemos como espelho e de maneira confusa, mas depois veremos face a face. Agora o meu conhecimento é limitado, mas depois conhecerei como sou conhecido.”

(ICo 13:11-12)

Aos meus pais João Rodolfo Ferreira Rêgo e Teresa Rodrigues dos Santos Rêgo, aos meus irmãos Tarcito, Tarciana, Tarcila e Tarcisio, e à prof^a. Beatriz Meireles Barguil

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo o que tens realizado em minha vida, por cada passo dado nestes 25 anos de caminhada, pelo amparo nas horas em que tudo parecia perdido, e por fazer morada no meu coração. A Ti toda honra e toda glória;

À minha família pelo apoio e amor incondicional;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Prof. Marcos Paz Saraiva Câmara pela orientação e ensinamentos;

Ao Prof. Sami Jorge Michereff pela orientação, apoio e confiança;

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia pelos ensinamentos transmitidos;

À equipe Micologia, Waléria Guerreiro, Josiene Veloso, Christiane Costa, Willie Anderson, Mariote Netto, Eduardo Souza e Wilson Júnior, por todos os conhecimentos compartilhados e momentos de alegria;

À minha amiga-irmã Francisca Nívia Teixeira da Silva pela amizade, cumplicidade, dedicação, eficiência e apoio durante toda esta jornada.

À minha família Recife, Luana Silva, Carmem Abade, Geane Fontes, Isabel Silva, Emanuel Feitosa, Alain Dennis, José Garcete, Paulo Roberto e Guilherme Rolim, por todo carinho e amizade;

À Profª. Beatriz Meireles Barguil, pela cumplicidade, generosidade e ensinamentos;

Aos funcionários Darcy e Romildo pela colaboração nos momentos necessários;

Enfim, a todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	vi
RESUMO GERAL	viii
GENERAL ABSTRACT	ix
CAPÍTULO I – Introdução Geral	11
Referências Bibliográficas	22
CAPÍTULO II – Population structure of <i>Lasiodiplodia theobromae</i> associated with papaya stem-end rot in Northeastern Brazil based on mycelial compatibility groups	30
Abstract	32
Introduction	32
Materials and Methods	35
Results	38
Discussion	41
References	44
CONCLUSÕES GERAIS	58

RESUMO GERAL

A estrutura populacional de *Lasiodiplodia theobromae*, agente da podridão peduncular do mamão, foi avaliada com base na determinação de grupos de compatibilidade micelial (GCMs) em uma coleção de 102 isolados de 13 pomares de mamoeiro em cinco localidades do Nordeste brasileiro, representando tipos climáticos semiárido (Juazeiro) e tropical úmido (Amaraji, Goiana, Santa Rita e São José do Mipibú). Os GCMs foram determinados pela comparação de isolados pareados em meio de cultura ½ BDA (batata-dextrose-ágar) a 25°C sob condições 12/12 h luz/escuro. Os isolados foram distribuídos em sete GCMs: GCM I (n = 26 isolados), GCM II (n = 18), GCM III (n = 23), GCM IV (n = 6), GCM V (n = 8), GCM VI (n = 1) e GCMVII (n = 20). Os GCMs I e II foram os mais amplamente distribuídos, sendo identificados em cinco pomares. Os GCMs IV e VI foram distribuídos localmente em um pomar cada. Todos os sete GCMs foram constatados na população tropical úmida e quatro GCMs foram registrados na população semiárida. A estrutura genética foi determinada usando as frequências dos GCMs e índices de diversidade genotípica. A diversidade genotípica máxima na população total foi 5,1%. As populações de Juazeiro, Santa Rita e São José do Mipibú apresentaram valores similares para diversidade genotípica total, riqueza e equidade, diferindo das populações de Amaraji e Goiana, que apresentaram valores significativamente ($P \leq 0.05$) inferiores. A população tropical úmida demonstrou maior diversidade total e riqueza que a população semiárida, mas essas populações foram similares em equidade. O nível mais alto de sobreposição de GCMs foi observado entre as populações de Juazeiro e São José do Mipibú. A similaridade mais baixa de GCMs foi observada entre as populações de Amaraji e Juazeiro, Amaraji e Goiana, e Goiana e Santa Rita. Populações dos climas semiárido e tropical úmido apresentaram um elevado nível de sobreposição de GCMs. Todos os isolados de *L. theobromae* foram patogênicos a frutos de mamoeiro. Houve diferença significativa na virulência entre os GCMs. O isolado do GCM VI foi o mais virulento, enquanto que os isolados do GCM III foram os menos virulentos. As informações geradas por esse estudo podem orientar futuras pesquisas destinadas a encontrar estratégias adequadas de manejo da podridão peduncular do mamão no Nordeste brasileiro, com ênfase não no patógeno como uma entidade, mas sim sobre a sua biologia populacional.

Palavras-chave: *Carica papaya*, podridão peduncular, GCM, diversidade genética.

GENERAL ABSTRACT

The population structure of *Lasiodiplodia theobromae*, which causes stem-end rot in papaya, was assessed based on mycelial compatibility groups (MCGs) in a collection of 102 isolates obtained from 13 papaya orchards in five localities of Northeastern Brazil, representing semi-arid (Juazeiro) and tropical humid (Amaraji, Goiana, Santa Rita and São José do Mipibú) type climates. MCGs were determined through comparisons of paired isolates growing on ½ PDA (potato dextrose agar) media at 25°C under 12/12 h light/dark conditions. The isolates were assigned into seven MCGs: MCG I (n = 26 isolates), MCG II (n = 18), MCG III (n = 23), MCG IV (n = 6), MCG V (n = 8), MCG VI (n = 1) and MCG VII (n = 20). MCGs I and II were the most widely distributed, being found in five orchards. MCGs IV and VI were locally distributed in an orchard each. All seven MCGs were found in the tropical humid population and four MCGs were present in the semi-arid population. The genetic structure was determined using the frequencies of MCGs and genotypic diversity indices. The maximum genotypic diversity of total population was 5.1%. The populations of Juazeiro, Santa Rita and São José do Mipibú presented similar values for total genotypic diversity, richness and evenness, differing from populations of Amaraji and Goiana, which had significantly ($P \leq 0.05$) lower values. The tropical humid population showed higher total diversity and richness than semi-arid population, but these populations were similar for evenness. The highest level of MCGs overlap was observed between populations from Juazeiro and São José do Mipibú. The lowest MCGs similarity was observed between the populations from Amaraji and Juazeiro, Amaraji and Goiana, and Goiana and Santa Rita. Populations from semi-arid and tropical humid climates showed a high level of GCMs overlapping. All isolates of *L. theobromae* were pathogenic to papaya fruits. There were significant differences in virulence among the MCGs. Isolates from MCG VI were the most virulent, while of MCG III were the less virulent. The information generated by this study can guide future research aimed to find adequate management strategies for stem-end rot of papaya in Northeastern Brazil, with emphasis should not be on the pathogen as an entity, but rather on its population biology.

Key-words: *Carica papaya*, stem-end rot, MCG, genetic diversity.

Capítulo I

Introdução Geral

ESTRUTURA POPULACIONAL DE ISOLADOS DE *LASIODIPLODIA THEOBROMAE* DE MAMÃO PRODUZIDO NO NORDESTE BRASILEIRO BASEADA EM GRUPOS DE COMPATIBILIDADE MICELIAL

INTRODUÇÃO GERAL

1. O mamoeiro

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma das fruteiras mais cultivadas e consumidas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, que tem como provável centro de origem a América Tropical, na região compreendida entre o sul do México e o norte da Nicarágua. Após sua descoberta pelos espanhóis, o mamoeiro foi amplamente distribuído em várias regiões tropicais, estendendo-se a 32° de latitude norte e sul, com provável introdução no Brasil em 1587 (SERRANO; CATTANEO, 2010).

O mamoeiro é uma planta herbácea, que pode alcançar de 3 a 8 m de altura. Apresenta um sistema radicular pivotante, com raiz principal bastante desenvolvida e caule cilíndrico, com 10 a 30 cm de diâmetro. As folhas são grandes, 20 a 60 cm, com longos pecíolos fistulosos. As flores podem ser de três tipos bem diferenciados, flor pistilada, hermafrodita e estaminada. O fruto é uma baga que varia conforme o tipo de flor, podendo ser arredondado, oblongo, alongada, cilíndrico e piriforme. A casca é fina e lisa, de coloração amarelo-clara a laranja, protegendo a polpa que possui 2,5 a 5 cm de espessura. As sementes são pequenas, circulares, ásperas e revestidas por uma camada mucilaginosa, apresentando coloração diferente para cada variedade (DANTAS; CASTRO NETO, 2000).

O mamoeiro possui rápido crescimento, com florescimento precoce e contínuo em um intervalo relativamente curto, produzindo bem em locais onde a temperatura média anual situa-se em torno de 25°C, com limites extremos de 21° a 33°C (COSTA; PACOVA, 2003). Seu desenvolvimento é favorecido em solos ricos em matéria orgânica, com baixo teor de argila e bem drenados, sendo adequado para o seu cultivo solos com textura areno-argilosa, com pH entre 5,5 e 6,7 (OLIVEIRA et al., 2004). Dentre as características principais dessa cultura, destacam-se a alta densidade de plantas por hectare, rápido desenvolvimento, fácil propagação, produção o ano inteiro e elevada produtividade (BARRETO et al., 2010).

Em condições climáticas favoráveis e dependendo dos tratos culturais empregados na cultura, a primeira colheita do mamão ocorre entre 9 e 10 meses após o plantio. O ponto de

colheita é um dos principais fatores na qualidade do fruto. O mamão é classificado como um fruto climatérico e várias propriedades dos frutos têm sido usadas como índice de colheita e padronização para comercialização. Para o mamão, um aspecto importante é o teor de sólidos solúveis totais, propriedade que permite estimar o conteúdo de açúcar do fruto. No entanto, em termos práticos, tem sido usada a coloração da casca como parâmetro para estimar o estágio de amadurecimento do fruto, já que o teor de sólidos solúveis apresenta correlação com a evolução da cor da casca na colheita (BALBINO, 2003).

Comercialmente os frutos podem ser colhidos quando apresentam 6% da superfície externa da casca com coloração amarelada, pois possuem, neste ponto, teor de sólidos solúveis de aproximadamente 11,5%, considerado o mínimo aceitável para comercialização em vários países. No entanto, o estágio ideal para a colheita do mamão, em termos de teor máximo de sólidos solúveis, é quando o fruto apresenta pelo menos 33% da superfície da casca amarela. Portanto, dentro da faixa de 6 a 33% da superfície da casca amarelada, a definição do ponto ideal de colheita deverá considerar a distância entre a região produtora e o mercado consumidor, a infra-estrutura de transporte e de armazenamento, o tempo para a comercialização e para o consumo, bem como as exigências específicas de cada mercado no caso do fruto para exportação (BALBINO, 2003). Para auxiliar na colheita, existe uma escala de cores dos frutos variando de 0 a 5, onde 0 = fruto crescido e desenvolvido (100% verde), 1 = até 15% da superfície amarela, 2 = até 25% da superfície amarela (1/4 madura), 3 = até 50% da superfície amarela, 4 = 50 a 75% da superfície amarela e 5 = 76 a 100% da superfície amarela. Em geral, os frutos devem ser colhidos até que 1/4 da superfície da casca esteja amarelada (estádio 2). No entanto, o ponto de colheita pode variar com o mercado de destino. Na exportação para os Estados Unidos da América são aceitos frutos somente até o estágio 2, para a Europa até o estágio 4 e para o mercado interno o estágio varia conforme a distância do mercado consumidor e o tempo de comercialização da fruta (SAABOR et al., 2000).

As cultivares de mamoeiro mais exploradas no Brasil pertencem aos grupos Solo e Formosa. As cultivares do grupo Solo possuem alto potencial de endogamia, e seus frutos, de menor tamanho (\approx 0,35 a 0,70 kg), são destinados para o mercado interno e, principalmente, para o mercado externo. As principais cultivares do grupo Formosa são híbridas importadas que produzem frutos de maior tamanho ($>1,0$ kg), sendo destinados principalmente ao mercado interno (SERRANO; CATTANEO, 2010).

O fruto do mamoeiro é consumido basicamente na forma *in natura*, sendo uma excelente fonte de cálcio, provitamina A e vitamina C (ácido ascórbico), com ampla utilização em dietas alimentares (CENTEC, 2004; SERRANO; CAETANO, 2010). Sua polpa possui

características sensoriais (textura, cor e aroma), químicas (teor de sólidos solúveis, acidez e bom equilíbrio entre açúcares e ácidos orgânicos) e digestivas que o tornam um alimento saudável. Além do aspecto alimentar, os frutos, folhas e sementes fornecem produtos de amplo uso medicinal e de utilização na indústria, nos segmentos alimentícios, têxtil e cosmético, como a papaína, uma enzima proteolítica, e a carpaína, um alcalóide empregado como ativador do músculo cardíaco (CENTEC, 2004).

2. Importância da cultura do mamoeiro

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, superado apenas pela China e pela Índia, com uma produção que ultrapassa os 759 milhões de toneladas. A base agrícola da cadeia produtiva das frutas no Brasil abrange 2,2 milhões de hectares, gerando 4 milhões de empregos diretos e um PIB agrícola de 11 bilhões de dólares (POLL et al., 2013).

Em 2012, o Brasil produziu 1,5 milhões de toneladas de mamão em 32,5 mil hectares, com valor da produção de 430,0 milhões de dólares. Essa situação coloca o Brasil como o segundo maior produtor mundial de mamão, representando aproximadamente 13% da produção total mundial e sendo superado apenas pela Índia, que produziu 5,2 milhões de toneladas (FAO, 2014). A quase totalidade da produção brasileira de mamão é destinada ao mercado interno, pois apenas 1,9% da produção foram exportadas em 2012, gerando uma receita de 36,4 milhões de dólares (POLL et al., 2013). A maior área plantada de mamoeiro concentra-se na região Nordeste, com 19,4 mil hectares cultivados e produção de 917,5 mil toneladas. Nessa região, o estado da Bahia destaca-se como principal produtor, com 683,5 mil toneladas produzidas em 2012 (IBGE, 2014).

O cultivo do mamoeiro, no Brasil, além de grande importância econômica e alimentícia, apresenta importância social como gerador de emprego e renda, absorvendo um elevado contingente de mão de obra durante o ano todo pela constante necessidade no manejo e comercialização, efetuada de maneira contínua nas lavouras, além da renovação dos plantios, em média, a cada três anos (BENASSI, 2006).

3. Doenças do mamoeiro

As doenças do mamoeiro têm destacada importância econômica, pois ocasionam severas perdas econômicas nos setores de produção, comercialização e exportação de frutas *in*

natura. No Brasil, as principais doenças na fase de produção são as viroses, com destaque para o mosaico causado por *Papaya ringspot virus* type P (PRSV-P) e a meleira causada por *Papaya meleira virus* (PMeV) (VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2004). Na pós-colheita, a antracnose, causada por espécies de *Colletotrichum*, é considerada a doença mais importante, seguida pela podridão peduncular (DANTAS; OLIVEIRA, 2006; NETTO et al., 2014; SANTANA et al., 2007; VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2004). As doenças foliares, quando não controladas adequadamente, podem causar grandes danos nos frutos, depreciando-os comercialmente, como ocorre com a varíola (*Asperisporium caricae* (Speg) Maulb), a mancha-de-aschochita (*Phoma caricae-papayae* (Tarr) Punith), o oídio (*Oidium caricae* Noack) e a mancha-de-corynespora (*Corynespora cassicola* (Berk & Curt) Wei). Outra doença de grande importância na cultura do mamoeiro é a podridão-do-pé e dos frutos causada por *Phytophthora palmivora* (Botler) Butler (VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2004).

4. Podridão peduncular

A podridão peduncular do mamoeiro é causada por um complexo de patógenos fúngicos, mas membros da família Botryosphaeriaceae são os mais importantes (CAVALCANTE et al., 2014; NETTO et al., 2014). As espécies dessa família são caracterizadas como cosmopolitas, com ampla gama de hospedeiros e extensa distribuição geográfica (PHILLIPS et al., 2013). Até recentemente, dentre as espécies de Botryosphaeriaceae, somente *L. theobromae* havia sido registrada causando podridão peduncular em mamão no Brasil (DANTAS et al., 2003; DANTAS; OLIVEIRA, 2006; FREIRE et al., 2003; PEREIRA et al., 2012; TAVARES, 2002; VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2004) e em nível mundial (FARR; ROSSMAN, 2014). No entanto, um estudo recente com 166 isolados de *Lasiodiplodia* obtidos de pomares do Nordeste brasileiro, combinando análises morfológicas e filogenéticas dos genes ITS e EF1- α , revelou que cinco espécies causavam podridão peduncular em mamão, sendo *L. brasiliense* M.S.B. Netto, M.W. Marques & A.J.L. Phillips, *L. hormozganensis* Abdollahzadeh, Zare & A.J.L. Phillips, *L. marypalme* M.S.B. Netto, M.W. Marques, A.J.L. Phillips & M.P.S. Câmara, *L. pseudotheobromae* A.J.L. Phillips, A. Alves & Crous e *L. theobromae*, com predominância desta última (69,9%) (NETTO et al., 2014).

A podridão peduncular é uma das doenças mais preocupantes do mamão no Brasil (NETTO et al., 2014; PEREIRA et al., 2012; SANTANA et al., 2007). Em épocas de grande intensidade pluviométrica, a incidência em frutos oriundos de lavouras que não adotam medidas de controle pode atingir 100% (REZENDE; MARTINS, 2005; SANTANA et al., 2007). Em estudo sobre o impacto das doenças fúngicas pós-colheita nas perdas de frutos de mamão durante a fase de comercialização, foram analisados quatro supermercados localizados na cidade de Recife (Estado de Pernambuco, Brasil), sendo constatado que a podridão peduncular causada por *L. theobromae* foi responsável por 17% das perdas de frutos do grupo Formosa e 24% de perdas de frutos do grupo Solo (SILVA et al., 2002). Em outro estudo, realizado em cinco pontos de comercialização na Central de Abastecimento de Recife, frutos foram amostrados durante seis meses quanto à incidência de doenças na pós-colheita. A podridão peduncular foi a principal doença constatada em mamão, sendo registrada em 39,7% dos frutos amostrados (DANTAS et al., 2003).

Os sintomas da podridão peduncular surgem após a colheita, na região do corte do pedúnculo, afetando a parte basal do fruto, geralmente no início do amadurecimento. As lesões inicialmente apresentam uma ampla margem de tecido encharcado, na base do pedúnculo, seguido de produção abundante de micélio esbranquiçado, de escurecimento posterior, com uma superfície rugosa, resultado da formação de picnídios em estromas e assim promovendo a podridão que vai tomando toda a fruta. A área infectada torna-se, aos poucos, desprovida do tecido parenquimatoso e os frutos perdem sua consistência e vigor (VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2004).

A disseminação de *L. theobromae* ocorre pelo vento, água, sementes, insetos, animais silvestres e pelo homem, via instrumentos agrícolas. No campo, o fungo pode penetrar na planta por ferimentos causados por insetos, pelo homem, por outros patógenos ou por aberturas naturais. Nos frutos ocorre a penetração pelo pedúnculo ou por ferimentos (TAVARES, 2002). Na infecção do pedúnculo, o fungo permanece quiescente mantendo baixo nível de metabolismo até o fruto amadurecer, quando são ativados os fatores de patogenicidade que resultam em parasitismo ativo nos tecidos do hospedeiro. Frutos em estágio fenológico mais avançado, que permanecem aderidos à árvore, quando infectados, apresentam necrose no pedúnculo, que pode provocar sua queda ou progredir até a base deste (ANGEL et al., 2006).

O manejo da podridão peduncular consiste em práticas para prevenir a infecção e retardar o desenvolvimento dos sintomas. Diante disso, para o controle eficiente da doença é necessário que as práticas de manejo se estendam desde o campo até a pós-colheita. As

medidas incluem evitar fermentos na superfície dos frutos durante a colheita, tratamento térmico, armazenagem a baixas temperaturas e tratamento químico com fungicidas na pós-colheita (DANTAS; OLIVEIRA, 2006; PEREIRA et al., 2012; SANTANA et al., 2007; VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2004). No Brasil, tiabendazole (grupo dos metil benzimidazol carbamatos - MBCs) é o único fungicida registrado para o controle de *L. theobromae* em mamão, com uso restrito ao tratamento em pós-colheita (MAPA, 2014). No entanto, vários outros princípios ativos são aplicados nos pomares do Nordeste brasileiro, com destaque para tiofanato metílico, difenoconazole, tebuconazole e azoxistrobina (CAVALCANTE et al., 2014; PEREIRA et al., 2012). O controle químico não tem demonstrado elevada eficácia contra a podridão peduncular, sendo então indicada a adoção de uma série de medidas adicionais de controle (PEREIRA; SILVA; RIBEIRO NETTO, 2006). Dentre essas medidas, o tratamento hidrotérmico pela imersão dos frutos em água quente a 48°C por 20 minutos, seguido de outra imersão em água fria a 8°C por igual período, tem sido utilizado nos frutos destinados à exportação com resultados variáveis em relação à podridão-peduncular, embora eficiente no controle da antracnose (VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2004).

5. *Lasiodiplodia theobromae*

Lasiodiplodia theobromae tem como teleomorfo *Botryosphaeria rhodina* (Berk.; Curtis) Arx., um ascomiceto pertencente à ordem Botryosphaeriales e família Botryosphaeraceae (MYCOBANK, 2014). Essa espécie produz conidiomatas estromáticos (picnídios), simples ou agregados, imersos no hospedeiro e tornando-se erupentes quando maduros, marrom escuros, uniloculares, de parede fina ou espessa. Paráfises hialinas, cilíndricas, septadas, ocasionalmente ramificadas, com extremidades arredondadas, até 55 µm de comprimento e 3-4 µm de largura. Conidióforos hialinos, simples, às vezes septados, raramente ramificados, cilíndricos, proveniente das camadas internas de células que revestem os lóculos. Células conidiogênicas hialinas, de parede fina, lisas, cilíndricas a subpiriformes, holoblásticas. Conídios subovoides a elipsoide-ovoides, ápices amplamente arredondadas, bases afinadas a truncadas, de paredes espessas, conteúdo granular, inicialmente hialino e asseptado, permanecendo hialino por um longo período de tempo, tornando-se castanho escuro e com um septo somente após um longo período de tempo depois da descarga do

conidiomata, com depósitos de melanina na superfície interna da parede disposta longitudinalmente dando uma aparência estriada aos conídios (PHILLIPS et al., 2013).

Lasiodiplodia theobromae ocorre principalmente em regiões tropicais e subtropicais (BURGUESS et al., 2006; PHILLIPS et al., 2013; PUNITHALINGAM, 1980), onde causa uma variedade de doenças em mais de 350 espécies de plantas hospedeiras (FARR; ROSSMAN, 2014). Além do mamoeiro, várias outras culturas de grande importância econômica são afetadas por *L. theobromae* no Brasil, especialmente abacateiro (*Persea americana* Mill.), aceroleira (*Malpighia glabra* L.), ateira (*Annona squamosa* L.), bananeira (*Musa* spp.), cacaueteiro (*Theobromae cacao* L.), cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), citrus (*Citrus* spp.), coqueiro (*Cocos nucifera* L.), goiabeira (*Psidium guajava* L.), gravioleira (*Annona muricata* L.), guaranazeiro (*Paullinia cupana* Ducke), mamoneira (*Ricinus communis* L.), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), mangueira (*Mangifera indica* L.), maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims), melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai), meloeiro (*Cucumis melo* L.) e videira (*Vitis* spp.) (FREIRE; CARDOSO; VIANA, 2003; FREIRE et al., 2004, 2011; MARQUES et al., 2013; NETTO et al., 2014; PEREIRA; SILVA; RIBEIRO NETTO, 2006; TAVARES, 2002).

Devido a sua importância como patógeno polífago e cosmopolita, torna-se indispensável para o manejo das doenças o conhecimento da diversidade genética e da distribuição das populações de *L. theobromae*.

6. Estrutura genética de populações

O sucesso evolutivo dos fitopatógenos pode ser atribuído a vários fatores, entre eles a alta capacidade em gerar diversidade, permitindo uma vantagem seletiva imediata dentro da população de patógenos (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000). A estrutura genética pode ser usada para inferir o impacto relativo de diferentes forças que influenciam na evolução da população do patógeno. O conhecimento da quantidade e distribuição da variação genética dentro e entre populações é um componente importante na compreensão da biologia populacional de fungos patogênicos. Uma grande quantidade de diversidade genética distribuída sobre uma pequena escala espacial sugere a possibilidade de rápida adaptação por um patógeno a mudanças ambientais (novos genes de resistência na planta hospedeira ou fungicidas). Um alto grau de similaridade genética entre populações coletadas de regiões

geográficas amplamente separadas sugere a ocorrência de dispersão a longa distância e fluxo gênico (MCDONALD; ZHAN; BURDON, 1999).

Conhecer a diversidade genética do patógeno e as resultantes mudanças na estrutura genética da população é de fundamental importância para o sucesso no manejo de doenças de plantas (MILGROOM; FRY, 1997; MCDONALD; LINDE, 2002). Estrutura genética pode ser definida como a quantidade e a distribuição da variação genética dentro e entre populações. A estrutura genética é uma consequência de interações entre as forças que afetam a evolução das populações dando uma visão dos processos evolutivos que formaram uma população no passado, levando-se à hipótese de que o conhecimento da estrutura genética também oferece uma visão sobre o futuro potencial evolutivo das populações de patógenos (MCDONALD, 1997).

Existem dois tipos de diversidade genética que contribuem para a estrutura genética de uma população: a diversidade gênica e a diversidade genotípica. A diversidade gênica refere-se ao número e frequência dos alelos de *loci* individuais na população. A diversidade genotípica refere-se ao número e frequência de genótipos multilocus ou a indivíduos geneticamente diferentes na população (MCDONALD; LINDE, 2002).

A diversidade genotípica é um dos vários componentes estimados durante a análise da estrutura genética das populações de microrganismos (GRUNWALD et al., 2003). Vários índices têm sido usados na estimativa da diversidade genética de populações de fitopatógenos (GOODWIN et al., 1993; ZAKK; WILIG, 1994). Esses índices buscam a estimativa de três aspectos da população: riqueza, equidade e dominância. A riqueza é o número de genótipos contidos na população, intuitivamente a diversidade aumenta com o aumento da riqueza. A equidade mede como os genótipos são distribuídos dentro da população. Se um pequeno número de genótipos domina a população, a equidade é baixa e leva a uma baixa diversidade. Mas se cada genótipo ocorre na mesma frequência, então a equidade e a diversidade chega ao máximo. A dominância é o oposto da riqueza e quanto maior a dominância de um ou poucos genótipos na população, menor a riqueza (KREBS, 1999; ZAKK; WILIG, 1994).

A diversidade genética é influenciada pela contribuição relativa da reprodução assexual e sexual de uma espécie, onde indivíduos que se reproduzem sexualmente normalmente tem uma população geneticamente mais diversificada do que aqueles que se reproduzem assexuadamente (CORTESI; MILGROOM, 2001). A reprodução de espécies da família Botryosphaeriaceae é predominantemente assexuada no campo (PHILLIPS, 2002), com raros relatos de reprodução sexual (VAN NIEKERK et al., 2006).

A estrutura genética de um agente patogênico pode ser avaliada utilizando marcadores morfológicos, moleculares, seletivos ou neutros (BURDON, 1993). Compatibilidade micelial pode ser considerada como um marcador neutro, que fornece informações para a análise da diversidade genética das populações de fungos (LESLIE, 1993). Em muitas espécies de fungos filamentosos, indivíduos fisiologicamente distintos podem se fundir assexuadamente para formar um heterocarion estável (LESLIE, 1996). Esses indivíduos, capazes de sofrer fusão e formar um heterocarion estável, são ditos compatíveis vegetativamente e por isso pertencem ao mesmo grupo de compatibilidade vegetativa (GCV). O controle genético da compatibilidade vegetativa mostrou ser condicionado por diversos *loci* nas espécies em que foi estudado (BEGUERET; TURCQ; CLAVE, 1994). A incompatibilidade pode ser desencadeada por uma interação alélica ou não alélica entre os *loci het* (GLASS; KANEKO, 2003). A fusão de hifas entre indivíduos compatíveis (especificidade idêntica para todos os *loci het*) leva a formação de um heterocarion estável e geralmente está associada com mudanças no fluxo citoplasmático (HICKEY et al., 2002). A fusão de hifas entre indivíduos *het* incompatíveis resulta em uma rápida compartimentalização e morte da célula que se fundiu e das células adjacentes. Grânulos citoplasmáticos são formados poucos minutos após a fusão e os poros dos septos são fechados. A vacuolização do citoplasma é uma característica importante da incompatibilidade do heterocarion. Os vacúolos nos fungos filamentosos contêm várias proteases e enzimas degenerativas, que são liberadas no citoplasma após a lise dos vacúolos. A destruição da célula heterocariótica pode ser concluída dentro de 30 minutos após a fusão de hifa. A semelhança microscópica nos fenótipos sugere que os diferentes fungos podem compartilhar mecanismos comuns de morte celular devido à incompatibilidade do heterocarion mediada por diferentes *loci het* (GLASS; KANEKO, 2003).

A compatibilidade micelial foi descrita como um dos vários eventos associados à compatibilidade vegetativa, a capacidade de dois isolados de se fundirem e formarem um heterocáron estável (KOHN et al., 1991). A compatibilidade vegetativa pode ser avaliada indiretamente usando interações miceliais ou formação de zona de barreira na ausência de marcadores auxotróficos em muitas espécies de fungos. Em cultura, falha de anastomose é observada como uma linha grossa entre os dois isolados diferentes, enquanto que na ocorrência de anastomose bem sucedida, não formam a zona de barreira e crescem normalmente entre si sem qualquer alteração morfológica. Algumas características comuns das zonas de barreira são: 1) uma região central de células mortas ou morrendo; 2) uma área pigmentada mais escura que as demais, e 3) uma camada micelial mais alta ou mais espessa (LESLIE, 1993).

A compatibilidade micelial tem sido uma ferramenta útil em estudos para identificar a diversidade intraespecífica dentro de populações de muitos fungos fitopatogênicos, incluindo *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) S. Hughes (BEN-DANIEL et al., 2010; NITZAN et al., 2002), *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. (AHN et al., 2013), *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib. (CARVALHO; MENDES-COSTA, 2011), *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M. E. Barr (CORTESI; MILGROOM; BISIACH, 1996; GONZÁLEZ-VARELA; GONZÁLEZ; MILGROOM, 2011; MILGROOM; CORTESI, 1999), *Eutypa lata* (Pers.) Tul. & C. Tul. (CORTESI; MILGROOM, 2001), *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc. (HOLTZ et al., 2011), *Fusarium graminearum* Schwabe (MCCALLUM; TENAUZ; GILBERT et al., 2004), *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) Snyder & Hans. (JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ et al., 2013; KATAN; BERLINER; KATAN, 1994; SMITH-WHITE et al., 2001), *Monosporascus cannonballus* Pollack & Uecker (BEZERRA et al., 2013; CHILOSI et al. 2008), *Phomopsis subordinaria* (Desm.) Trav. (MEIJER; MEGNEGNEAU; LINDEN, 1994), *Rosellinia necatrix* Prillieux (ARMENGOL et al., 2010; IKEDA et al., 2011; LÓPEZ et al., 2008), *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (IRANI et al., 2011; KOHN et al., 1991; KULL et al., 2004; WU; SUBBARAO, 2006; WANG et al., 2014), *Sclerotium rolfsii* Sacc. (ADANDONON et al., 2005; HARLTON; LÉVESQUE; PUNJA, 1995; PUNJA; GROGAN, 1983; REMESAL et al., 2012), *Serpula lacrymans* (Wulfen: Fr.) S.F. Gray (KAUSERUD, 2004), *Stagonospora nodorum* (Berk.) E. Castell. & Germano (CATEN; NEWTON, 2000) e *Verticillium dahliae* Kleb. (ELENA, 2000; JIMÉNEZ-DÍAZ et al., 2011; PUHALLA; HUMMEL, 1983).

Relativamente poucos estudos de compatibilidade micelial foram realizados com espécies de Botryosphaeriaceae, com destaque para *Botryosphaeria dothidea* (Moug.:Fr.) Ces & De Not. de pistache (*Pistacia vera* L.) (MA; LUO; MICHAILIDES, 2004), *Diplodia mutila* (Fries) Montagne de carvalho (*Quercus* spp.) (RAGAZZI; MORICCA; DELLAVALLE, 1997), *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous et al. de eucalipto (*Eucalyptus* spp.) (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007) e videira (*Vitis* spp.) (BASKARATHEVAN et al., 2012), e *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyco & Sutton de pinheiro (*Pinus* spp.) (BURGESS; WINGFIELD; WINGFIELD, 2001; SMITH et al., 2000). Para estas espécies, diferentes números de GCVs foram identificados em diferentes espécies de Botryosphaeriaceae. Por exemplo, foram identificados 20 GCVs a partir de 378 isolados de *B. dothidea* obtidos de pistache na Califórnia (MA; LUO; MICHAILIDES, 2004) e 62 GCVs de 107 isolados de *S. sapinea* de pinho na África do Sul (SMITH et al., 2000). Em outro estudo, foram identificados 67 GCVs em 252 isolados de *S. sapinea* obtidos de pinho na Austrália, África

do Sul e Nova Zelândia. Este estudo mostrou que os níveis de diversidade genética medidos em diferentes populações de *S. sapinea* usando GCVs variaram de extremamente baixa na Austrália (1,6% - 7,4%) a muito alto na África do Sul (52,7% - 86,2%), com a Nova Zelândia apresentando uma diversidade genotípica intermediária (28,2%) (BURGESS; WINGFIELD; WINGFIELD, 2001; SMITH et al., 2000). Claramente, algumas populações de espécies Botryosphaeriaceae tiveram maior diversidade genética que outras. Até o momento, nenhum estudo de compatibilidade micelial foi realizado com espécies de *Lasiodiplodia*.

O estudo das populações de *L. theobromae* baseado em compatibilidade micelial torna-se relevante quando se considera que a reprodução desse fungo é predominantemente assexuada no campo (PHILLIPS, 2002), com raros relatos de reprodução sexual (VAN NIEKERK et al., 2006). Este fato sugeriria, a exemplo do verificado em outros gêneros de Botryosphaeriaceae, a predominância de uma estrutura clonal nas populações naturais do patógeno e assumiria que o fluxo de informação genética entre os componentes das mesmas só ocorreria por compatibilidade vegetativa (BASKARATHEVAN et al., 2012).

Portanto, o conhecimento sobre a estrutura populacional de *L. theobromae* é fundamental para o sucesso no manejo da podridão peduncular em frutos de mamoeiro. Mesmo sendo uma cultura de relevante importância no Nordeste brasileiro, inexistem estudos sobre a diversidade genética de *L. theobromae* associada ao mamoeiro. Dessa forma foram levantadas as seguintes hipóteses: (i) Não existem diferenças significativas na diversidade genotípica entre populações de *L. theobromae* obtidas de diferentes polos de produção de mamão no Nordeste brasileiro; (ii) Não existem diferenças significativas na diversidade genotípica entre populações de *L. theobromae* obtidas de áreas de produção de mamão localizadas em clima tropical úmido e semiárido no Nordeste brasileiro. Com base nas hipóteses acima, os objetivos dessa dissertação foram: (a) Analisar a estrutura populacional de *L. theobromae* obtido de frutos de mamão produzidos no Nordeste brasileiro baseada em grupos de compatibilidade micelial; (b) Comparar a diversidade genotípica entre populações de *L. theobromae* obtidas de diferentes polos de produção de mamão no Nordeste brasileiro; (c) Comparar a diversidade genotípica entre populações de *L. theobromae* obtidas de mamões produzidos em clima tropical úmido e semiárido no Nordeste brasileiro; (d) avaliar a diversidade na patogenicidade e agressividade de isolados representativos de diferentes grupos de compatibilidade micelial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADANDONON, A.; AVELING, T. A. S.; MERWE, N. A.; SANDERS, G. Genetic variation among *Sclerotium* isolates from Benin and South Africa, determined using mycelia compatibility and ITS rDNA sequence data. **Australasian Plant Pathology**, Canberra, v. 34, n. 1, p. 19-25, 2005.
- AHN, I-P.; KIM, S.; IM, K-H.; LEE, Y. H. Vegetative compatibility grouping and pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from different host plants. **Plant Pathology Journal**, Seoul, v. 19, n. 2, p. 269-273, 2003.
- ANGEL, N. D.; RAMOS, M. A.; ORTIZ, D. T.; JOSE A. R. Enfermidades del mango. In: OLIVEIRA, S. M. A.; TERAPO, M.; DANTAS, S. A. F.; TAVARES, S. C. C. H. (Eds.). **Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. p. 733-774.
- ARMENGOL, J.; VICENT, A.; LEÓN, M.; BERBEGAL, M.; ABAD-CAMPOS, P.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J. Analysis of population structure of *Rosellinia necatrix* on *Cyperus esculentus* by mycelial compatibility and inter-simple sequence repeats (ISSR). **Plant Pathology**, St. Paul, v. 59, n. 1, p. 179-185, 2010.
- BALBINO, J. M. S. Colheita, pós-colheita e fisiologia do amadurecimento do mamão. In: MARTINS, D. S.; COSTA, A. F. S. (Eds.). **A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção**. Vitória: INCAPER, 2003. p. 405-439.
- BARRETO, H. B. F.; COSTA, E. M.; OLIVEIRA, D. M.; SILVA, K. B.; ARAUJO, J. A. M. Custos de produção e rentabilidade do cultivo do mamão formosa (Tainung nº1) na cidade de Baraúna – RN. **Revista Verde**, Mossoró, v. 5, n. 2, p. 96-102, 2010.
- BASKARATHEVAN, J.; JASPERS, M. V.; JONES, E. E.; CRUICKSHANK, R. H.; RIDGWAY, H. J. Genetic and pathogenic diversity of *Neofusicoccum parvum* in New Zealand vineyards. **Fungal Biology**, Manchester, v. 116, n. 2, p. 276-288, 2012.
- BEGUERET, J.; TURCQ, B.; CLAVE, C. Vegetative incompatibility in filamentous fungi: het genes begin to talk. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 10, p. 441-446, 1994.
- BENASSI, A. C. **A economia do mamão: informes sobre a produção de mamão** [on line]. 2006. Disponível em: < [http:// www.todafruta.com.br/todafruta](http://www.todafruta.com.br/todafruta)>. Acesso em: 03 jun. 2014.
- BEN-DANIEL, B.; BAR-ZVI, D.; JOHNSON, R.; HAZANOVSSKY, M.; TSROR, L. Vegetative compatibility groups in *Colletotrichum coccodes* subpopulations from Australia and genetic links with subpopulations from Europe/Israel and North America. **Phytopathology**, St. Paul, v. 100, n. 3, p. 271-278, 2010.
- BEZERRA, C. S.; CORREIA, K. C.; CÂMARA, M. P. S.; SALES JÚNIOR, R.; ARMENGOL, J.; MICHEREFF, S.J. Population structure of *Monosporascus cannonballus* isolated from melons produced in Northeastern Brazil based on mycelial compatibility groups. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 35, n. 2, p. 161-167, 2013.

- BURDON, J. J. The structure of pathogen populations in natural plant communities. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 305-323, 1993.
- BURGESS, T. I.; BARBER, P. A.; MOHALI, S.; PEGG, G.; DE BEER, W.; WINGFIELD, M. J. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA comparisons and morphology. **Mycologia**, Bronx, v. 98, n. 3, p. 423-435, 2006.
- BURGESS, T. I.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Comparison of genotypic diversity in native and introduced populations of *Sphaeropsis sapinea* isolated from *Pinus radiata*. **Mycological Research**, London, v. 105, n. 11, p. 1331-1339, 2001.
- CARVALHO, C. R.; MENDES-COSTA, M. C. Vegetative compatibility and heterokaryon formation between different isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using the nit mutant system. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 42, n. 3, p. 346-353, 2011.
- CATEN, C. E.; NEWTON, A. C. Variation in cultural characteristics, pathogenicity, vegetative compatibility and electrophoretic karyotype within field populations of *Stagonospora nodorum*. **Plant Pathology**, London, v. 49, n. 2, p. 219-226, 2000.
- CAVALCANTE, R. D.; LIMA, W. G.; MARTINS, R. B.; TOVAR-PEDRAZA, J. M.; MICHEREFF, S. J.; CAMARA, M. P. S. Thiophanate-methyl sensitivity and fitness in *Lasiodiplodia theobromae* populations from papaya in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, 2014. (DOI 10.1007/s10658-014-0459-9)
- CENTEC - Instituto Centro de Ensino Tecnológico. **Produtor de mamão**. Fortaleza: Ministério da Ciência e Tecnologia, 2004. 72 p. (Cadernos Tecnológicos)
- CHILOSI, G.; REDA, R.; ALEANDRI, M. P.; CAMELE, I.; ALTIERI, L.; MONTUSCHI, C.; LANGUASCO, L.; ROSSI, V.; AGOSTEO, G. E.; MACRO, C.; CARLUCCI, A.; LOPS, F.; MUCCI, M.; RAIMONDO, M. L.; FRISILLO, S. Fungi associated with root rot and collapse of melon in Italy. **EPPO Bulletin**, Paris, v. 38, n. 1, p. 147-154, 2008.
- CORTESI, P.; MILGROOM, M. G. Outcrossing and diversity of vegetative compatibility types in populations of *Eutypa lata* from grapevines. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 83, n. 1, p. 79-86, 2001.
- CORTESI, P.; MILGROOM, M. G.; BISIACH, M. Distribution and diversity of vegetative compatibility types in subpopulations of *Cryphonectria parasitica* in Italy. **Mycological Research**, London, v. 100, n. 9, p. 1987-1093, 1996.
- COSTA, A. F. S.; PACOVA, B. E. V. Caracterização de cultivares, estratégias e perspectivas do melhoramento genético do mamoeiro. In: MARTINS, D. S.; COSTA, A. F. S. (Eds.). **A cultura do mamoeiro: tecnologia de produção**. Vitória: INCAPER, 2003. p. 59-102.
- DANTAS, J. L. L.; CASTRO NETO, M. T. Aspectos botânicos e fisiológicos. In: TRINDADE, V. A. (Org.). **Mamão – produção: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. p. 11-14.

- DANTAS, S. A. F.; OLIVEIRA, S. M. A. Doenças do mamão. In: OLIVEIRA, S. M. A.; TERAQ, D.; DANTAS, S. A. F.; TAVARES, S. C. C. H. (Eds.). **Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. p. 695-728.
- DANTAS, S. A. F.; OLIVEIRA, S. M. A.; MICHEREFF, S. J.; NASCIMENTO, L. C.; GURGEL, L. M. S.; PESSOA, W. R. L. S. Doenças fúngicas pós-colheita em mamões e laranjas comercializados na Central de Abastecimento do Recife. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 528-533, 2003.
- ELENA, K. Vegetative compatibility among *Verticillium dahliae* isolates from watermelon in Greece. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 28, n. 1, p. 115-120, 2000.
- FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **FAOSTAT** [on line]. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2014. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/index.html>>. Acesso em: 05 jun. 2014.
- FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. **Fungus-host distribution database** [on line]. Beltsville: United States Department of Agriculture, 2014. Disponível em: <<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/fungushost/fungushost.cfm>>. Acesso em: 12 jun. 2014.
- FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P. (Eds.). **Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. 687 p.
- FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P.; MARTINS, M. V. V. Status of *Lasiodiplodia theobromae* as a plant pathogen in Brazil. **Essentia**, Sobral, v. 12, n. 2, p. 53-71, 2011.
- FREIRE, F. C. O.; VIANA, F. M. P.; CARDOSO, J. E.; SANTOS, A. A. **Novos hospedeiros do fungo *Lasiodiplodia theobromae* no Estado do Ceará**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2004. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 91).
- GLASS N. L., KANEKO I. Fatal attraction: nonself recognition and heterokaryon incompatibility in filamentous fungi. **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2003.
- GONZÁLEZ-VARELA, G.; GONZÁLEZ, A. J.; MILGROOM, M. G. Clonal population structure and introductions of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, in Asturias, northern Spain. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 131, n. 1, p. 67-79, 2011.
- GOODWIN, S. B.; SAGHAI MAROOF, M. A.; ALLARD, R. W.; WEBSTER, R. K. Isozyme variation within and among populations of *Rhynchosporium secalis* in Europe, Australia and the United States. **Mycological Research**, London, v. 97, n. 1, p. 49-58, 1993.
- GRÜNWARD, N. J.; GOODWIN, S. B.; MILGROOM, M. G.; FRY, W. E. Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, n. 6, p. 738-746, 2003.
- HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Eds.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1102-1156.

HARLTON, C. E.; LÉVESQUE, C. A.; PUNJA, Z. K. Genetic diversity in *Sclerotium (Athelia) rolfsii* and related species. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, n. 10, p. 1269-1281, 1995.

HICKEY, P. C.; JACOBSON, D. J.; READ, N. D.; GLASS, N. L. Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 37, n. 1, p. 109-119, 2002.

HOLTZ, M. D.; CHANG, K. F.; HWANG, S. F.; GOSSEN, B. D.; STRELKOV, S. E. Characterization of *Fusarium avenaceum* from lupin in central Alberta: genetic diversity, mating type and aggressiveness. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 33, n. q, p. 61-76, 2011.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTÁTISTICA. **Sistema IBGE de recuperação automática** [on line].. Banco de dados agregados. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2014. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp?t=2&z=t&o=11&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1>>. Acesso em: 02 jun. 2014.

IKEDA, K.; INOUE, K.; NAKAMURA, H.; HAMANAKA, T.; OHTA, T.; KITAZAWA, O.; KIDA, C.; KANEMATSU, S.; PARK, P. Genetic analysis of barrage line formation during mycelial incompatibility in *Rosellinia necatrix*. **Fungal Biology**, Manchester, v. 115, n. 1, p. 80-86, 2011.

IRANI, H.; HEYDARI, A.; JAVAN-NIKKHAH, M.; İBRAHIMOV, A. S. Pathogenicity variation and mycelial compatibility groups in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Plant Protection Research**, Poznań, v. 51, n. 4, p. 329-336, 2011.

JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M.; OLIVARES-GARCÍA, C.; LANDA, B. B.; JIMÉNEZ-GASCO, M. M.; NAVAS-CORTÉS, J. A. Region-wide analysis of genetic diversity in *Verticillium dahliae* populations infecting olive in southern Spain and agricultural factors influencing the distribution and prevalence of vegetative compatibility groups and pathotypes. **Phytopathology**, St Paul, v. 101, n. 3, p. 304-315, 2011.

JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ, D.; LANDA, B. B.; KANG, S.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M.; NAVAS-CORTÉS, J. A. Quantitative and microscopic assessment of compatible and incompatible interactions between chickpea cultivars and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* races. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 4, p. e61360, 2013 (DOI:10.1371/journal.pone.0061360).

KATAN, T.; BERLINER, R.; KATAN, J. Vegetative compatibility in populations of *Fusarium oxysporum* from wild carnation. **Mycological Research**, London, v. 98, n. 10, p. 1415-1418, 1994.

KAUSERUD, H. Widespread vegetative compatibility groups in the dry-rot fungus *Serpula lacrymans*. **Mycologia**, Brox, v. 96, n. 2, p. 232-239, 2004.

KOHN, L. M.; STASOVSKI, E.; CARBONE, I.; ROYER, J.; ANDERSON, J. B. Mycelial incompatibility and molecular markers identify genetic variability in field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, n. 4, p. 480-485. 1991.

KREBS, C.J. **Ecological methodology**. 2. ed. Menlo Park: Benjamin Cummings, 1999. 620 p.

- KULL, L. S.; PEDERSEN, W. L.; PALMQUIST, D.; HARTMAN, G. L. Mycelial compatibility grouping and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 88, n. 4, p. 325-332, 2004.
- LESLIE, J. F. Fungal vegetative compatibility. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 127-150. 1993.
- LESLIE, J. F. Fungal vegetative compatibility - promises and prospects. **Phytoparasitica**, Det Dagan, v. 24, n. 1, p. 3-6, 1996.
- LÓPEZ, M.; RUANO-ROSA, D.; LÓPEZ-HERRERA, C. J.; MONTE, E.; HERMOSA, R. Intraspecific diversity within avocado field isolates of *Rosellinia necatrix* from south-east Spain. **European Journal of Forest Pathology**, Weinheim, v. 121, n. 2, p. 201-205, 2008.
- MA, Z.; LUO, Y.; MICHAILIDES, T. J. Spatiotemporal changes in the population structure of *Botryosphaeria dothidea* from California pistachio orchards. **Phytopathology**, St. Paul, v. 94, n. 4, p. 326-332, 2004.
- MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **AGROFIT** - sistemas de agrotóxicos fitossanitários [on line]. Brasília: Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2014. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 05 mai. 2014.
- MARQUES, M. W.; LIMA, N. B.; MORAIS JUNIOR, M. A.; BARBOSA, M. A. G.; SOUZA, B. O.; MICHEREFF, S. J.; PHILLIPS, A. J. L.; CÂMARA, M. P. S. Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, Kunning, v. 61, n. 1, p. 181-193, 2013.
- MCCALLUM, B. D.; TENAUZ, A.; GILBERT, J. Barrage zone formation between vegetatively incompatible *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) isolates. **Phytopathology**, St. Paul, v. 94, n. 5, p. 432-437, 2004
- MCDONALD, B. A. The population genetics of fungi: tools and techniques. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n.4, p.448-453 1997.
- MCDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 349-379, 2002.
- MCDONALD, B. A.; ZHAN, J.; BURDON, J. J. Genetic structure of *Rhynchosporium secalis* in Australia. **Phytopathology**, St. Paul, v. 89, n. 8, p. 639-645, 1999.
- MEIJER, G.; MEGNEGNEAU, B.; LINDEN, E. G. A. Variability for isozyme, vegetative compatibility and RAPD markers in natural populations of *Phomopsis subordinaria*. **Mycological Research**, London, v. 98, n. 3, p. 267-276, 1994.
- MILGROOM, M. G.; CORTESI, P. Analysis of population structure of the chestnut blight fungus based on vegetative imcompatibility genotypes. **Proceedings of the National Academy Science of USA**, Washington, v. 96, n. 18, p. 10518-10523, 1999.

MILGROOM, M.G.; FRY, W.E. Contributions of population genetics to plant disease epidemiology and management. **Advances in Botanical Research**, London, v. 24, p. 1-29, 1997.

MYCOBANK. **Fungal databases**: nomenclature and species bank [on line]. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center, 2014. Disponível em: <http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&Page=200&ViewMode=Basic> > Acesso em: 05 jun. 2014

NETTO, M. S. B.; ASSUNÇÃO, I. P.; LIMA, G. S. A.; MARQUES, M. W.; LIMA, W. G.; MONTEIRO, J. H. A.; MICHEREFF, S. J.; PHILLIPS, A. J. L.; CÂMARA, M. P. S. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. **Fungal Diversity**, Kunning, 2014. (Aceito para publicação, DOI 10,1007/s13225-014-0279-4).

NITZAN, N.; HAZANOVSKY, M.; TAL, M.; TSOR LAHKIM, L. Vegetative compatibility groups in *Colletotrichum coccodes*, the causal agent of black dot on potato. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 8, p. 827-832, 2002.

OLIVEIRA, A. M. G.; SOUZA, L. F. S.; RAIJ, B. V.; MAGALHÃES, A. F. J.; BERNARDI, A. C. C. **Nutrição, calagem e adubação do mamoeiro irrigado**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 10 P. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Circular Técnica, 69).

PEREIRA, A. L.; SILVA, G. S.; RIBEIRO, V. Q. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 31, n. 6, p. 572-578, 2006.

PEREIRA, A. V. S.; MARTINS, R. B.; MICHEREFF, S. J.; SILVA, M. B.; CÂMARA, M. P. S. Sensitivity of *Lasiodiplodia theobromae* from Brazilian papaya orchards to MBC and DMI fungicides. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 132, n. 4, p. 489-498, 2012.

PHILLIPS, A. J. L. *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 41, n. 1, p. 3-18, 2002.

PHILLIPS, A. J. L.; ALVES, A.; ABDOLLAHZADEH, J.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 76, p. 51-167, 2013.

POLL, H.; KIST, B. B.; SANTOS, C. E.; REETZ, E. R.; CARVALHO, C.; SILVEIRA, D. N. **Anuário brasileiro da fruticultura**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2013. 136 p.

PUHALLA, J. E.; HUMMEL, M. Vegetative compatibility groups within *Verticillium dahliae*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 73, n. 9, p.1305-1308, 1983.

PUNITHALINGAM, E. **Plant diseases attributed to *Botryodiplodia theobromae***. Vaduz: Pat. J. Cramer, 1980. 123 p.

PUNJA, Z. K.; GROGAN, R. G. Basidiocarp induction, nuclear condition, variability, and heterokaryon incompatibility in *Athelia (Sclerotium) rolfsii*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 73, n. 9, p. 1273-1278, 1983.

RAGAZZI, A.; MORICCA, S.; DELLAVALLE, I. Vegetative compatibility and pathogenicity of *Diplodia mutila* isolates on oak. **European Journal of Forest Pathology**, Weinheim, v. 27, n. 6, p. 391-396, 1997.

REMESAL, E.; JORDÁN-RAMÍREZ, R.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M.; NAVAS-CORTÉS, J. A. Mycelial compatibility groups and pathogenic diversity in *Sclerotium rolfsii* populations from sugar beet crops in Mediterranean-type climate regions. **Plant Pathology**, London, v. 61, n. 6, p. 739-753, 2012.

REZENDE, J. A. M.; MARTINS, M. C. Doenças do mamoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 435-443.

SAABOR, A.; LOPES, L. H. S.; CUNHA, M. M.; FERNANDES, C. **FrutiSéries 7: mamão**. Brasília: Ministério da Integração Nacional, 2000. 8 p.

SANTANA, E. N.; MARTINS, M. V. V.; LIMA, I. M.; COSTA, H.; VENTURA, J. A.; VIEIRA, P. Manejo das doenças do mamoeiro. In: NÚCLEO DE ESTUDOS EM FITOPATOLOGIA - UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. (Ed.). **Manejo integrado de doenças de fruteiras**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2007. p. 107-127.

SERRANO, L. A. L.; CATTANEO, L. F. **Papaya culture in Brazil** [on line]. Jaboticabal: Revista Brasileira de Fruticultura, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbf/v32n3/en_a01v32n3.pdf>. Acesso em: 05 mar. 2014.

SILVA, C. F. B.; MICHEREFF, S. J.; ALBUQUERQUE, H. S.; SILVA, J. A.; OLIVEIRA, S. M. A.; DANTAS, S. A. F. Epidemiología de enfermedades fúngicas poscosecha en frutos de papaya. **Boletín Micológico**, Valparaíso, v. 17, n. 1, p. 1-7, 2002.

SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. **Fungal Biology Reviews**, Cambridge, v. 21, p. 90-106, 2007.

SMITH, H.; WINGFIELD, M. J.; DEWET, J.; COUTINHO, T. A. Genotypic diversity of *Sphaeropsis sapinea* from South Africa and Northern Sumatra. **Plant Disease**, St. Paul, v. 84, n. 2, p.139-142, 2000.

SMITH-WHITE, J. L.; GUNN, L. V.; SUMMERELL, B. A. Analysis of diversity within *Fusarium oxysporum* populations using molecular and vegetative compatibility grouping. **Australasian Plant Pathology**, Canberra, v. 30, n. 2, p. 153-157, 2001.

TAVARES S. C. C. H. Epidemiologia e manejo integrado de *Botryodiplodia theobromae* - situação atual no Brasil e no mundo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 46-52, 2002.

VAN NIEKERK, J. M.; FOURIE, P. H.; HALLEN, F.; CROUS, P. *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 45, n. 1, p. 43-54, 2006.

VENTURA, J. A.; COSTA, H.; TATAGIBA, J. S. Papaya diseases and integrated control. In: NAQVI, S. A. M. H. (Ed.). **Diseases of fruits and vegetables**. Dordrecht: Kluwer, 2004. v. 2, p. 261-268.

WANG, Y.; HOU, Y.; BO, H.; ZHOU, H.; JING, L.; ZHAO, J. Mycelial compatibility groups and microsatellite markers reveal genetic diversity within and among populations of sunflower *Sclerotinia sclerotiorum* in China. **International Journal of Phytopathology**, Islamabad, v. 3, n. 1, p. 21-31, 2014.

WU, B. M.; SUBBARAO, K. V. Analyses of lettuce drop incidence and population structure of *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 96, n. 12, p. 1322-1339, 2006.

ZAK, J. C.; WILLIG, M. R. Fungal biodiversity patterns. In: FOSTER, M.S.; BILLS, G.F.; MUELLER, G.M. (Eds.). **Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods**. San Diego: Academic Press, 2004. p. 59-75.

Capítulo II

Population structure of *Lasiodiplodia theobromae* associated with papaya stem-end rot in Northeastern Brazil based on mycelial compatibility groups

Submissão: **Journal of Phytopathology**
Berlim, Alemanha
Qualis CAPES (Ciências Agrárias I) = B1

Population structure of *Lasiodiplodia theobromae*

Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

Population structure of *Lasiodiplodia theobromae* associated with papaya stem-end rot in Northeastern Brazil based on mycelial compatibility groups

Tamiris Joana dos Santos Rêgo¹, Josiene Silva Veloso¹, Kamila Câmara Correia², Sami Jorge Michereff¹ and Marcos Paz Saraiva Câmara¹

¹ *Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 52171-900, Pernambuco, Brasil*

² *Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Cariri, Crato, 63133-610, Ceará, Brasil*

Correspondence

S.J. Michereff, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

E-mail: sami@depa.ufrpe.br

Abstract

The population structure of *Lasiodiplodia theobromae*, which causes stem-end rot in papaya, was assessed based on mycelial compatibility groups (MCGs) in a collection of 102 isolates obtained from 13 papaya orchards in five localities of Northeastern Brazil, representing semi-arid (Juazeiro) and tropical humid (Amaraji, Goiana, Santa Rita and São José do Mipibú) type climates. MCGs were determined through comparisons of paired isolates growing on ½ PDA media at 25°C under 12/12 h light/dark conditions. The isolates were assigned into seven MCGs: MCG I (n = 26 isolates), MCG II (n = 18), MCG III (n = 23), MCG IV (n = 6), MCG V (n = 8), MCG VI (n = 1) and MCG VII (n = 20). MCGs I and II were the most widely distributed, being found in five orchards. MCGs IV and VI were locally distributed in an orchard each. All seven MCGs were present in the tropical humid population and four MCGs were found in the semi-arid population. The genetic structure was determined using the frequencies of MCGs and genotypic diversity indices. The maximum genotypic diversity of total population was 5.1%. The populations of Juazeiro, Santa Rita and São José do Mipibú presented similar values for total genotypic diversity, richness and evenness, differing from populations of Amaraji and Goiana, which had significantly lower values. The tropical humid population showed higher total diversity and richness than semi-arid population, but these populations were similar for evenness. The highest level MCGs overlap was observed between populations from Juazeiro and São José do Mipibú. Populations from semi-arid and tropical humid climates showed a high level of MCGs overlapping. Isolates from MCG VI were the most aggressive, while of MCG III were the less aggressive. The information from this study can guide future research aimed to find adequate management strategies for stem-end rot of papaya in Northeastern Brazil, with emphasis should not on the pathogen as an entity, but rather on its population biology.

Keywords *Carica papaya*, stem-end rot, MCG, genetic diversity.

Introduction

Brazil is the second-largest producer of papaya (*Carica papaya* L.) worldwide, surpassed only by India. The annual production corresponds to about 13% of overall global production,

which in 2012 was equivalent to 1.52 million tons (Food and Agriculture Organization 2014). The Northeast region is responsible for 60.4% of the Brazilian papaya production (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2014). The balance of exports of papaya in Brazil in the first quarter of 2014 increased 14% over the previous year, while exporting about 7.9 thousand tons of fruit to other countries (Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada 2014). The nations of the European Union (EU) are Brazil's main export partners, and in the last 13 years the commercialization of papaya to the EU has grown 600% (Food and Agriculture Organization 2014).

Losses caused by postharvest diseases are one of the main problems in the commercialization channel, especially for fruit destined for export (Ritzinger and Souza 2000; Santana et al. 2007). Stem-end rot, caused by *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., is an important postharvest disease of papaya in Brazil and worldwide, as it causes production losses and reduction in the commercial value of the fruit (Paull et al. 1997; Ventura et al. 2004; Dantas and Oliveira 2006; Pereira et al. 2012). In periods of high rainfall, the disease incidence on fruits harvested from orchards that do not adopt any control measures may reach 100% (Rezende and Martins 2005; Santana et al. 2007).

Stem-end rot of papaya starts in the field, where the pathogen is established in immature fruit and remains in a quiescent stage without onset of symptoms until favorable conditions occur for the beginning of the infection process. Symptoms begin in the stem region and advance to the entire fruit. The pathogen causes dark lesions on fruit that with the progression of the disease have a wide margin of soaked tissue. *Lasiodiplodia theobromae* is a fast-growing fungus, usually promoting rot and mummification of a large part of the fruit. The parenchymal tissue of affected area of the fruit is gradually destroyed and the fruit loses its consistency and turgidity (Ventura et al. 2004; Rezende and Martins 2005; Dantas and Oliveira 2006).

Lasiodiplodia theobromae is a members of the Botryosphaeriaceae, a genus-rich family in the Dothideomycetes, containing numerous species with a cosmopolitan distribution that occur on a large variety of plant hosts, on which they are found as saprophytes, parasites, and endophytes (von Arx 1987; Slippers and Wingfield 2007; Liu et al. 2012; Wikee et al. 2013). *Lasiodiplodia* species are common, especially in tropical and subtropical regions (Punithalingam 1980; Burgess et al. 2006; Phillips et al. 2013) where they cause a variety of diseases in up to 350 plant hosts (Farr and Rossman, 2014).

Detailed knowledge of genetic diversity within a pathogen population can provide a basis for the selection of potential control strategies, being important feature by encompasses

dispersal and distribution of particular genotypes in different localities (Milgroom and Fry 1997; McDonald and Linde 2002).

The genetic structure of a pathogen can be assessed using morphological, molecular, selective, or neutral markers (Burdon 1993). Mycelial incompatibility can be considered as a neutral marker that provides information for the analysis of the genetic diversity of the fungal population (Leslie 1993). A subset of the micelial incompatibility reactions includes events that require hyphal fusion and heterokaryon formation, whereby genetically different nuclei coexist in a common cytoplasm. Non-self-recognition leading to the rejection of heterokaryon formation is referred as to ‘hererokaryon incompatibility’, which is a genetically regulated process and most often results in the death of the hyphal fusion cell (Glass et al. 2000; Glass and Kaneko 2003). Micelial incompatibility is a multilocus system capable of generating large numbers of unique micelial compatibility groups (MCGs) and has been a useful tool in studies to identify intraspecific diversity within populations of fungal plant pathogens (Kohn et al. 1991; Leslie 1993; Meijer et al 1994; Milgroom and Cortesi 1999; Cilliers et al. 2000; Kull et al. 2004; Wu and Subbarao 2006; Armengol et al., 2010; González-Varela et al. 2011; Ikeda et al. 2011; Remesal et al. 2012; Bezerra et al. 2013; Wang et al. 2014). This method is highly relevant for asexually reproducing fungi that can only exchange genetic material through parasexual recombination, a process that involves plasmogamy, when both genotypes are vegetatively compatible (Leslie 1993, 1996). Reproduction of the species of the Botryosphaeriaceae is believed to be predominantly asexual in the field (Phillips 2002), with only rare reports of sexual reproduction being observed (van Niekerk et al. 2006), MCG analysis was likely to provide information on the potential for genetic exchange in populations of *L. theobromae*.

Although MCG have been reported in many fungal species, this phenomenon has been reported for relatively few Botryosphaeriaceae species namely *Botryosphaeria dothidea* (Moug.:Fr.) Ces & De Not. from pistachio (Ma et al. 2004), *Diplodia mutila* (Fries) Montagne from oak (Ragazzi et al. 1997), *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous et al. from eucalyptus (Slippers and Wingfield 2007) and grapevine (Baskarathevan et al. 2012), and *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyco & Sutton from pinus (Smith et al. 2000; Burgess et al. 2001).

Knowledge of the population structure of *L. theobromae* is fundamental to the successful management of stem-end rot on papaya fruits. Although it is a culture of great importance in the Northeastern Brazil, there is no information concerning the genetic variation within the populations of *L. theobromae*. Therefore, the objectives of this study were (i) analyze the population structure of *L. theobromae* from papaya fruits produced in

Northeastern Brazil based on MCGs; (ii) compare the genotypic diversity among populations of *L. theobromae* from different papaya production locations; (iii) compare the genotypic diversity among populations of *L. theobromae* from papaya produced in tropical humid and semi-arid climate in Northeastern Brazil; (iv) evaluate the pathogenic and aggressiveness diversity of representative isolates from different MCGs.

Material and Methods

Isolate collection

One hundred and two isolates of *L. theobromae*, collected from 13 papaya orchards in Northeastern Brazil between 2006 and 2007 (Pereira et al. 2012), were used to study of MCGs and pathogenic diversity. The isolates were grouped into five papaya populations (Juazeiro, Amaraji, Goiana, Santa Rita and São José do Mipibú) based on their geographical location with at least 75 km distance between populations (Figure 1), representing semi-arid and tropical humid type climates (Table 1). The isolates were identified through phylogenetic inference based on the partial sequences of the elongation factor 1- α gene (EF1- α) and complete sequence of the internal transcript space (ITS) as described by Netto et al. (2014). The isolates were maintained at the Culture Collection of Phytopathogenic Fungi “Prof. Maria Menezes” (CMM) at the Universidade Federal Rural de Pernambuco (Recife, Pernambuco, Brazil) and stock cultures were stored in potato dextrose agar (PDA) slants at 5 °C in the dark.

Determination of mycelial compatibility groups

Lasiodiplodia theobromae isolates were initially transferred onto potato dextrose agar (PDA) (Acumedia Co., Lansing, USA) plates and grown at 25°C under 12/12 h light/dark conditions for 3 days. Mycelial incompatibility among the isolates was determined using cultures grown in pairwise combinations as described by Burgess et al. (2009). The isolates were initially paired in all possible combinations for a single population. Mycelial plugs (3-mm-diameter) of six isolates were taken from the edges of their colonies and were placed 2 cm apart in a predetermined order in a 15-cm Petri dish containing half-strength PDA (½ PDA). Six

isolates were paired by plate in all possible combinations. Each pairing was replicated three times and plates were incubated at 25°C under 12/12 h light/dark conditions. After 10 and 21 days of incubation, the plates were visually examined in both upper and reverse side and each isolate pair scored as vegetatively compatible (C), when mycelia of two isolates merged together uniformly, or vegetatively incompatible (I), when mycelia of two isolates grew to a meeting point on the agar but remained separated by a ‘barrage-like’ reaction formed along the line of contact between the paired isolates (Baskarathavan et al. 2012). After the initial comparisons were completed, representative MCGs isolates from each location were paired in all possible combinations. All pairings were conducted at least twice and photographed using a digital camera (Nikon D5000; Nikon Corporation, Tokyo, Japan).

Analysis of genotypic diversity based in MCG

The isolates of *L. theobromae* belonging to the same MCG were considered as having the same phenotype because the genetic background was unknown. Each MCG represented a genotype. The genotypic diversity of the *L. theobromae* population from each population sampled (Juazeiro, Amaraji, Goiana, Santa Rita and São José do Mipibú) from tropical humid and semiarid climate was determined in terms of total diversity, richness and evenness. Additionally, the degree of overlap between the MCGs in the papaya populations was quantified.

The total diversity was calculated as Stoddart and Taylor’s index G ($G = 1/\sum pi^2$) (Stoddart and Taylor 1988) and Hill’s index N_l (Hill 1973). The Hill’s index was calculated by the equation $N_l = e^{H'}$, where H' refers to the Shannon-Wiener index, $H' = \{-\sum i[pi \times \ln(pi)]\}$ (Shannon And Weaver 1949), and pi is the observed frequency of the i th genotype. The indices G and N_l measure the effective distribution of the proportional abundances among the different genotypes, and the values ranged between 1 and the total of the evaluated sample. The difference between the two indices is that G strongly considers the number of abundant genotypes, whereas N_l strongly considers the number of rare genotypes. The differences in the values of G and N_l among the populations were tested with bootstrapping, using 1,000 resamplings with a 95% confidence interval (Grünwald et al. 2003).

Richness is expressed by the number of genotypes expected in the sample and was evaluated using the rarefaction method (Grünwald et al. 2003). This method assumes that the number of expected genotypes in a random sample of n individuals out of a total sample of N

individuals, where n_i corresponds to the number of individuals per genotype is $E(gn)$. The value of $E(gn)$ is based on the sum of probabilities that each genotype is included in the sample. To contrast the richness of the populations of the different towns, N was estimated to be 8, which was the smallest sample size among the studied populations. The rarefaction estimates were obtained after compiling the algorithm <Rarefac.c> (Grünwald et al. 2003).

The evenness indicates how the genotype is distributed in a given sample and was calculated by the E_5 index of Ludwig and Reynolds (1988) using the formula: $E_5 = (G-1)/(N_1-1)$. The evenness index is calculated based on the number of observed genotypes, the richness and the values of G and N_1 . Because the evenness increases in constant richness, the G and N_1 indices also increase. The evenness index varies between 0 and 1, with a maximum at $N_1 = G = g = 1$ (Grünwald et al. 2003).

To quantify the degree of overlap between the MCGs in the *L. theobromae* populations, a measure of the similarity between pairs of samples was calculated by the Jaccard's index $JI = a/(a+b+c)$ (Jaccard 1908), where a represents the number of MCGs occurring in both samples, b represents the number of MCGs restricted to sample 1, and c represents the number of MCGs restricted to sample 2. The JI values ranges from 0 (no MCG shared) 1 (all MCGs shared). All indices were calculated using the R 3.1.0 software (The R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria).

Pathogenic and aggressiveness diversity

The variation in pathogenicity and aggressiveness among MCGs was determined by inoculation of *L. theobromae* isolates in papaya fruits. A total of 31 isolates representing each of the seven identified MCGs were tested, including five isolates of each of the most abundant MCGs (I, II, III, IV, V and VII) and one isolate from MCG VI, the only observed in this group.

Papaya fruits (cv. Golden) at stage four of maturation (Ministério da Integração Nacional 2000), without visible symptoms and signs of disease, which were not treated with fungicides, were washed in running water, surface disinfested in 70% ethanol for 1 min and 1% NaOCl for 5 min, then rinsed in sterile distilled water. Since non-wounded treatment caused no lesions of *Lasiodiplodia* (unpublished data), after drying, the epidermis of each fruit was punctured at four equidistante points. Lesions were 3 mm in depth and made with a sterilized pin. A mycelial plug (5 mm in diameter) was removed from the margin of a 5-day-

old PDA culture of each selected isolate and was immediately transferred to each lesion site. For the control, a non-colonized agar plug was used. Inoculated fruits were placed in plastic trays. Before, the bottom of each tray was lined with four paper towel layers wetted in distilled water to maintain humidity. Each fruit was put on a sterilized Petri dish to avoid direct contact with water. The plastic trays were partially sealed with plastic bags and incubated at 28°C in the dark. The plastic bag and paper towel were removed after 24 h, and papaya fruits were kept at the same temperature for an additional 48-h period. Isolates were considered pathogenic when the lesioned area advanced beyond the 5-mm diameter initial injury. The aggressiveness of the isolates was evaluated by lesion diameter (mm), measured 72 h after inoculation in two perpendicular directions and averaged. The experiment was arranged in a completely randomized design with five replicates per treatment (isolate) and six fruits per replicate. The experiment was conducted twice. Differences in aggressiveness caused by MCGs were determined by one-way analyses of variance (ANOVA) and means were compared by Fisher's LSD (least significant difference) test at the 5% significance level using the Statistix[®] 9.0 software (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA).

Results

Mycelial compatibility grouping

After pairing the 102 *L. theobromae* isolates from papaya on ½ BDA, two types of reactions were observed at the interaction zone: the vegetative compatibility reaction (C) showed intermingling mycelia, where the two colonies grew together with a uniform surface, without formation of a barrier line at the interaction zone on the reverse side of the Petri dish; the vegetative incompatibility reaction (I) showed a dark black line in the interaction zone, very obvious on the reverse side of the Petri dish and also visible through the aerial mycelium on the upper surface (Figure 2). All 102 isolates were self-compatible, showing a reaction similar to that described for compatible isolates. Replicated experiments and triplicated pairings within each experiment produced identical results.

Seven MCGs were identified among the 102 isolates of *L. theobromae* from papaya orchards, and were designated in roman numerals from I to VII (Tables 1 and 2). There were differences between the MCGs regarding the frequency and distribution. The number of

isolates in each MCG ranged from 1 to 26. The most prevalent MCGs were I and III, representing 25.5% and 22.5% of the isolates, respectively. MCGs II and VII comprised 17.6% and 19.6% of the isolates, respectively (Table 2). MCGs I and II were the most widely distributed, being identified in five of the 13 sampled papaya orchards. MCG III and VII were identified in three and four orchards, respectively (Table 1). These four MCGs (I, II, III and VII) were observed in different orchards, localities and climate types, which were more than 500 km apart in some cases (Juazeiro and Goiana, Juazeiro and Santa Rita, and Juazeiro and São José do Mipibú) (Table 1). MCG V comprised 7.8% of the isolates and was restricted to two distant orchards located in Juazeiro (semi-arid climate) and São José do Mipibú (tropical humid climate). MCG IV comprised 5.9% of the isolates and was locally distributed in an orchard in Santa Rita (tropical humid climate). MCG VI consisted of a single isolate, identified in an orchard in São José do Mipibú (Table 1).

Among the 13 sampled orchards, six (B-1, C-1, D-1, D-3, E-2 and E-4) presented high uniformity with the occurrence of only one MCG in each (Tabela 1). Regarding sampled localities, four, one, one, four and five MCGs were identified in Juazeiro (MCGs I, II, III and V), Amaraji (MCG VII), Goiana (MCG III), Santa Rita (MCGs I, II, IV and VII) and São José do Mipibú (MCGs I, II, III, V and VI) (Tabela 1).

Genotypic diversity based in MCG analysis

Seven different genotypes (MCG I to VII) were observed in a total population of 102 *L. theobromae* isolates from Northeastern Brazil papaya orchards representing five local populations. A total of six (85.7%) of the seven genotypes had frequencies greater than one and represented 101 of the 102 isolates studied. Three genotypes (MCGs I, III and VII) were found in three locality populations, two genotypes (MCGs II and V) were found in two populations, and two genotypes (MCGs IV and VI) were found only in a population each (Table 2).

The genotypic diversity for the total population was 5.1% of the possible maximum, where every isolate had a unique genotype (Table 3). The populations of Juazeiro, Santa Rita and São José do Mipibú presented similar values for total genotypic diversity ($G = 3.0-3.7$; $N_I = 3.4-3.8$) because the estimated confidence intervals for the indices of these three populations overlapped, differing significantly ($P \leq 0.05$) from populations of Amaraji and Goiana, which had lower values ($G = 1.0$, $N_I = 1.0$) (Table 3).

When the G diversity index was scaled to the number of expected genotypes [$E(gn)$], a lower richness was estimated for the Amaraji and Goiana populations (1.0), while a higher richness was estimated for the Santa Rita (3.6), Juazeiro (3.4) and São José do Mipibú (3.3) populations. Regarding the evenness index (E_5), the Santa Rita (0.95) and Juazeiro (0.92) populations had the higher values, while the Amaraji and Goiana populations showed a lower values (0.00) (Table 3).

Four genotypes (MCGs I, II, III and V) were found in the semi-arid population and all seven genotypes were found in the tropical humid population. When the populations of these climate types were compared, the bootstrapped confidence intervals of the diversity indices G and N_I did not overlap, suggesting the occurrence of significant differences between them. The tropical humid population showed the highest values of the total diversity ($G = 5.2\%$; $N_I = 5.7\%$) compared to semi-arid population ($G = 3.3\%$; $N_I = 3.5\%$). The semi-arid population had the lower richness index value [$E(gn) = 4.0$] compared to tropical humid [$E(gn) = 5.8$], but these populations presented similar values for evenness index ($E_5 = 0.92$ and 0.89 , respectively) (Table 3).

The comparison between the *L. theobromae* MCGs recovered from different papaya populations was computed using a Jaccard's index for possible pairs of populations. The highest overlap ($JI = 0.50$) was observed for the MCGs from Juazeiro and São José do Mipibú populations. The lowest value of similarity ($JI = 0.00$) was observed between the populations from Amaraji and Juazeiro, Amaraji and Goiana, and Goiana and Santa Rita. All other combinations of locality populations showed intermediate values of MCGs overlapping, ranging from 0.20 to 0.33. Populations from semi-arid and tropical humid climates showed a high level of MCGs overlapping ($JI = 0.67$).

Pathogenic and aggressiveness diversity

All isolates of *L. theobromae* were pathogenic to papaya fruits, resulting in visible lesions 72 h after inoculation. Observed symptoms on the fruit surface were dark brown necrotic lesions with roughly circular shape around the inoculation sites. There were significant ($P \leq 0.05$) differences in aggressiveness among the MCGs. The MCG VI was the most aggressive, causing the largest lesion (15.1 mm), while the MCG III was the less aggressive, causing the smaller lesion (4.00 mm). The others MCGs (I, II, IV, V and VII) showed intermediate aggressiveness, causing lesions ranged from 5.6 mm to 8.6 mm (Figure 3).

Discussion

This is the first study on the genotypic diversity of *L. theobromae* from papaya in Northeastern Brazil. The MCG analyses of *L. theobromae* isolates showed two different reactions: compatible and incompatible. These results are similar to those observed in MCG analyzes performed with other Botryosphaeriaceae species, including *B. dothidea* from pistachio (Ma et al. 2004), *D. mutila* from oak (Ragazzi et al. 1997), *N. parvum* from eucalyptus (Slippers and Wingfield 2007) and grapevine (Baskarathevan et al. 2012), and *S. sapinea* from pinus (Smith et al. 2000; Burgess et al. 2001). The mycelial compatibility reaction allows the transfer of genetic material by exchange of nuclei and therefore it is important for the generation of genetic diversity (Baskarathevan et al. 2012). On the other hand, the mycelial incompatibility has been proposed as a self-defense mechanism in filamentous fungi, and functions as a recognition system of different genotypes to limit invasion by harmful cytoplasmic elements (Caten 1972) and/or prevent the exploitation of maladaptive nuclei (Hartl et al. 1975). These hypotheses suggest that selection would act on *het loci* for the maintenance of polymorphism in fungal populations (Glass et al. 2000).

Seven MCGs were identified among the 102 isolates of *L. theobromae* from papaya in Northeastern Brazil. Varying numbers of MCGs were reported in studies with different Botryosphaeriaceae species from other hosts. Twenty MCGs were identified and 94% of the isolates assigned into one of two MCGs among 390 *B. dothidea* isolates from pistachio (Ma et al. 2004). Sixty two MCGs were identified in 107 *S. sapinea* isolates from three plantations of exotic *Pinus patula* in South Africa and four MCGs among 83 isolates from three plantations of the same species in Northern Sumatra (Smith et al. 2000). In another study, 67 MCGs were identified in 252 *S. sapinea* isolates from *Pinus* plantations in Australia, South Africa and New Zealand (Burgess et al. 2001). This suggests that the number of MCGs found in a population can vary considerably, and may depend on species, host, location, time under cropping, and sample size (Baskarathevan et al. 2012).

The MCG analysis of *L. theobromae* from papaya showed that 48% of the isolates belonged to two major MCGs (I and III), regardless of the orchard locality or climate type. The high distribution of some MCGs (I, II, III and VII) indicates that that they were widely disseminated between papaya orchards and localities. Such dissemination may have occurred through the planting material infected with *L. theobromae* since species of Botryosphaeriaceae have been found in nonsymptomatic propagation materials (Billones et al.

2009). As the propagation of papaya is done by seed and *L. theobromae* is seed-borne, disease can commonly be found in nurseries and dissemination can occur by infected seedlings (Freire et al. 2011). Dissemination of spores has also been shown to occur by splash dispersal of wind-blown rainwater (Amponsah et al. 2009; Ridgway et al. 2011; Eskalen et al. 2013) but there is no indication of airborne dispersal within orchards (Amponsah et al. 2009; Eskalen et al. 2013).

The relative number of MCGs in the fungal populations has previously been used to indicate whether a pathogen has recently been introduced into an area or has been present for a longer time (Adams et al. 1990). The number of MCGs depends not only on the length of time that the pathogen was introduced but also on the diversity of the source population, the frequency with which the pathogen was introduced and the ability to outcross (Milgroom and Cortesi 1999).

The fact that isolates of *L. theobromae* originate from the same orchard or local population (as example, in Juazeiro, Santa Rita and São José do Mipibú) have been allocated in different MCGs suggests the occurrence of genetic differences within subpopulations, which indicates that the distinct subpopulations are multiple introductions of isolates from different infested areas that are established in the form of new MCG (Burgess et al. 2001). On the other hand, the occurrence of a single MCG in an orchard or local population, as found in Amaraji and Goiana, may be indicative that this MCG was introduced in the area and then spread vegetatively (Carlile 1986), and/or that the MCG was recently introduced (Harlton et al. 1995). In addition, the occurrence of a single MCG in an area may indicate that the MCGs or clones became adapted to specific microclimates or hosts, and are unlikely resulted from genetic exchange and recombination (Ben-Yephet and Bitton 1985; Hambleton et al. 2002; Kull et al. 2004).

The total genotypic diversity of the *L. theobromae* populations from papaya in Northeastern Brazil was low (5.12% of the maximum possible). This low genotypic diversity may be related to the productive period of the papaya crop (not more than three years) (Benassi 2006). This reduced productive period may result in a smaller number of genotypes that could infect the plant and coexist as pathogen or endophyte when we compare with perennial crops with longer productive life span, such as *Pinus* (Burgess et al. 2001; Smith et al. 2000) and pistachio (Ma et al. 2004). Another hypothesis is that this low diversity is related to the reproduction type of *L. theobromae*, which is predominantly asexual in the field (Phillips 2002), with rare reports of sexual reproduction (van Niekerk et al. 2006). This fact would suggest, as observed in other genus of Botryosphaeriaceae, the predominance of clonal

structure in natural populations of the fungus and assume that the flow of genetic information between components of the populations only occur by vegetative compatibility (Baskarathevan et al. 2012).

The highest genotypic diversity (total diversity, richness and evenness) of GCMs in *L. theobromae* populations from Juazeiro, Santa Rita and São José do Mipibú may be related to the fact that these are the largest papaya producers among localities in this study, with orchards intensively cultivated and long history of production (Ruggiero et al. 2011). Furthermore, in these localities, several tropical fruit species are cultivated for export, all hosts are seriously affected by this fungus (Correia et al. 2013; Marques et al. 2013; Netto et al. 2014). On the other hand, the low genetic diversity in populations of *L. theobromae* from Amaraji and Goiana may be related to the fact that these localities initiate papaya production a few years ago and the populations could have resulted from a founder effect, resulting in very few introductions into orchards (McDonald and Linde 2002).

The highest total diversity and richness of MCGs in tropical humid population in relation to semi-arid population may be associated with smaller geographic coverage of sampling in semi-arid region, since in the tropical humid region 10 orchards in four localities were sampled, while in semi-arid were only three orchards were sampled in a single locality.

The level of the overlapping of MCGs among populations was estimated by the Jaccard's index. The high overlapping of MCGs observed among populations from Juazeiro and São José do Mipibú, more than 500 km apart, suggests the occurrence of long-distance dispersal of the MCGs, probably by propagation materials (seeds and/or seedlings). Furthermore, high overlapping of MCGs among semi-arid and tropical humid climate populations confirms the ability of *L. theobromae* to adapt to many different climates (Mohali et al. 2005).

The different lesion lengths produced by the *L. theobromae* isolates in papaya fruits reflect the high degree of variation in aggressiveness among MCGs populations. The MCG VI, with a single isolate identified in an orchard in São José do Mipibú, was the most aggressive. In the same orchard was also identified the MCG III, with seven isolates, which showed low aggressiveness. This results contrasts with the observation of Burgess et al. (2001), in which if *vic* loci are linked to a trait such as pathogenicity, then selection pressure would favour more aggressive genotypes. This would result in the more aggressive MCG groups becoming dominant in a population, while the less aggressive MCG groups would be lost. The results of this study do not allow consistent correlations between aggressiveness and frequency or distribution of MCGs of *L. theobromae* from papaya orchards.

The information obtained in this study can guide future research aimed to find adequate management strategies for stem-end rot of papaya in Northeast region. The analysis of the *L. theobromae* populations showed, in general, a low genotypic diversity, which suggests that a breeding program for resistant cultivars may be successful in this region. However, there are differences in the levels of genotypic diversity among the studied populations. As this fungus has predominantly asexual reproduction, different genotypes in a population represent separate introductions. Our results suggest there have been very few introductions into Amaraji and Goiana populations and multiple introductions into Juazeiro, Santa Rita and São José do Mipibu populations. Therefore, every effort must be made to avoid the introduction of new genotypes of *L. theobromae* in new planting areas by restriction of the transit of infected seedlings and seeds.

References

- Adams G, Hammar S, Proffer T. (1990) Vegetative compatibility in *Leucostoma personii*. *Phytopathology* 80:287-291.
- Amponsah NT, Jones EE, Ridgway HJ, Jaspers MV. (2009) First report of *Neofusicoccum australe* (*Botryosphaeria australis*), a cause of grapevine dieback in New Zealand. *Australasian Plant Disease Notes* 4:6-8.
- Armengol J, Vicent A, León M, Berbegal M, Abad-Campos P, García-Jiménez J. (2010) Analysis of population structure of *Rosellinia necatrix* on *Cyperus esculentus* by mycelial compatibility and inter-simple sequence repeats (ISSR). *Plant Pathology* 59:179-185.
- Baskarathevan J, Jaspers MV, Jones EE, Cruickshank RH, Ridgway HJ. (2012) Genetic and pathogenic diversity of *Neofusicoccum parvum* in New Zealand vineyards. *Fungal Biology* 116:276-288.
- Benassi AC. (2006) A economia do mamão: informes sobre a produção de mamão. Internet Resource: [http:// www.todafruta.com.br/todafruta](http://www.todafruta.com.br/todafruta) (verified Jun 03, 2014).
- Ben-Yephet Y, Bitton S. (1985) Use of a selective medium to study the dispersal of ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytoparasitica* 13:33-40.

Bezerra CS, Correia KC, Câmara MPS, Sales R Jr, Armengol J, Michereff SJ. (2013) Population structure of *Monosporascus cannonballus* isolated from melons produced in Northeastern Brazil based on mycelial compatibility groups. *Acta Scientiarum Agronomy* 35:161-167.

Billones R, Jones EE, Ridgeway HJ, Jaspers MV. (2009) Distribution of of *Botryosphaeria* spp. infection in different grapevine nursery materials in New Zealand (abstract). *Plant Protection* 62:406.

Burdon JJ. (1993) The structure of pathogen populations in natural plant communities. *Annual Review of Phytopathology* 31:305-323.

Burgess TI, Barber PA, Mohali S, Pegg G, De Beer W, Wingfield MJ. (2006) Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA comparisons and morphology. *Mycologia* 98:423-435.

Burgess T, Bihon W, Wingfield MJ, Wingfield BD. (2009) A simple and rapid method to determine vegetative compatibility groups in fungi. *Inoculum* 60:1-2.

Burgess TI, Wingfield BD, Wingfield MJ (2001). Comparison of genotypic diversity in native and introduced populations of *Sphaeropsis sapinea* isolated from *Pinus radiata*. *Mycological Research* 105:1331-1339.

Carlile MJ. (1986) Genetic exchange and gene flow: their promotion and prevention. In: Rayner ADM, Braiser CM, Moore D (eds). *Evolutionary biology of the fungi*. Cambridge University Press, New York, pp 203-204.

Caten CE. (1972) Vegetative incompatibility and cytoplasmic infections of fungi. *Journal of General Microbiology* 72:221-229.

Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. (2014). Internet Resource: <http://www.cepea.esalq.usp.br/hfbrasil/edicoes/130/mamao.pdf> (verified Jun 03, 2014).

Cilliers AJ, Herselman L, Pretorius ZA. (2000) Genetic variability within and among mycelial compatibility groups of *Sclerotium rolfsii* in South Africa. *Phytopathology* 90:1026-1031.

Correia KC, Câmara MPS, Barbosa MAG, Sales R Jr, Agustí-Brisach C, Gramaje D, García-Jiménez J, Abad-Campos P, Armengol J, Michereff SJ. (2013) Fungal trunk pathogens

associated with table grape decline in Northeastern Brazil. *Phytopathologia Mediterranea* 52:380–387.

Dantas, SAF, Oliveira SMA. (2006) Doenças do mamão. In: Oliveira SMA, Terao D, Dantas SAF, Tavares SCCH (eds). *Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais*. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, pp 695-728.

Eskalen A, Faber B, Bianchi M. (2013) Spore trapping and pathogenicity of fungi in the Botryosphaeriaceae and Diaporthaceae associated with avocado branch canker in California. *Plant Disease* 97:329-332.

FAO. (2014) FAOSTAT. World Agricultural Information Centre, 2014. Internet Resource: <http://faostat.fao.org> (verified Jun 01, 2014).

Farr DF, Rossman AY. (2014) Fungal databases: Fungos-host distributions, Beltsville: Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS-USDA, 2014. Internet Resource: <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/fungushost/fungushost.cfm> (verified Jun 03, 2014).

Freire FCO, Cardoso JE, Viana FMP, Martins MVV. (2011) Status of *Lasiodiplodia theobromae* as a plant pathogen in Brazil. *Essentia* 12:53-71.

Glass NL, Jacobson DJ, Shiu PKT. (2000) The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. *Annual Review of Genetics* 34:165-186.

Glass NL, Kaneko I. (2003) Fatal attraction: nonself recognition and heterokaryon incompatibility in filamentous fungi. *Eukaryotic Cell* 2:1-8.

González-Varela G, González AJ, Milgroom MG. (2011) Clonal population structure and introductions of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, in Asturias, northern Spain. *European Journal of Plant Pathology* 13: 67-79.

Grünwald NJ, Goodwin SB, Milgroom MG, Fry WE. (2003) Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. *Phytopathology* 93:738-746.

Hambleton S, Walker C, Kohn LM. (2002) Clonal lineages of *Sclerotinia sclerotiorum* previously known from other crops predominate in 1999-2000 samples from Ontario and Quebec soybean. *Canadian Journal of Plant Pathology* 24:309-315.

Harlton CE, Uvesque CA, Punja ZK. (1995) Genetic diversity in *Sclerotium (Athelia) rolfsii* and related species. *Phytopathology* 85:1269-1281.

Hartl D, Dempster E, Brown S. (1975) Adaptive significance of vegetative incompatibility in *Neurospora crassa*. *Genetics* 81:553-569.

Hill MO. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology* 54:427-432.

IBGE. (2014) Sistema IBGE de recuperação automática. Internet Resource: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp?t=2&z=t&o=11&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1> (verified Jun 02, 2014).

Ikeda K, Inoue K, Nakamura H, Hamanaka T, Ohta T, Kitazawa O, Kida C, Kanematsu S, Park P. (2011) Genetic analysis of barrage line formation during mycelial incompatibility in *Rosellinia necatrix*. *Fungal Biology* 115:80-86.

Jaccard P. (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bul Soc Vaudoise Sci Nat* 44:223-270.

Kohn LM, Stasovski E, Carbone I, Royer J, Anderson JB. (1991) Mycelial incompatibility and molecular markers identify genetic variability in field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 81:480-485.

Kull LS, Pedersen WL, Palmquist D, Hartman GL. (2004) Mycelial compatibility grouping and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease* 88:325-332.

Leslie JF. (1993) Fungal vegetative compatibility. *Annual Review of Phytopathology* 31:127-150.

Leslie JF. (1996) Fungal vegetative compatibility – promises and prospects. *Phytoparasitica* 24:3-6.

Liu JK, Phookamsak R, Doilom M, Wikee S, Li YM, Ariyawansa H, Boonmee S, Putarak CP, Dai DQ, Bhat JD, Romero AI, Zhuang WY, Monkai J, Jones EBG, Chukeatirote E, Ko Ko TW, Zhao YC, Wang Y, Hyde KD. (2012) Towards a natural classification of Botryosphaerales. *Fungal Diversity* 57:149–210.

- Ludwig JA, Reynolds JF. (1988). Statistical ecology: a primer on methods and computing. New York: John Wiley & Sons.
- Ma Z, Luo Y, Michailides TJ. (2004) Spatiotemporal changes in the population structure of *Botryosphaeria dothidea* from California pistachio orchards. *Phytopathology* 94:326-332.
- Marques MW, Lima NB, Morais MA Jr, Barbosa MAG, Souza BO, Michereff SJ, Phillips AJL, Câmara MPS. (2013) Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. *Fungal Diversity* 61:181-193.
- Mcdonald BA, LINDE C. (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40:349-379.
- Meijer G, Megnegneau B, Linden EGA. (1994) Variability for isozyme, vegetative compatibility and RAPD markers in natural populations of *Phomopsis subordinaria*. *Mycological Research* 98:267-276.
- Milgroom MG, Cortesi P. (1999) Analysis of population structure of the chestnut blight fungus based on vegetative incompatibility genotypes. *Proceedings of the National Academy Science of USA* 96:10518-10523.
- Milgroom MG, Fry WE. (1997) Contributions of population genetics to plant disease epidemiology and management. *Advances in Botanical Research* 24:1-29.
- Ministério da Integração Nacional. (2000) Frutiséries. Internet Resource <http://www.mi.gov.br/infrastrukturahidrica/publicacoes/frutiserias.asp>. (verified Jul 10, 2014).
- Mohali S, Burgess TI, Wingfield MJ. (2005) Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. *Forest Pathology* 35:385–396.
- Netto MSB, Assunção IP, Lima GSA, Marques MW, Lima WG, Monteiro JHA, Michereff SJ, Phillips AJL, Câmara MPS. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. *Fungal Diversity*, 2014. (Accepted for publication, DOI 10,1007/s13225-014-0279-4).
- Paull RE, Nishijima W, Reyes M, Cavaletto CC. (1997) Postharvest handling and losses during marketing of papaya (*Carica papaya* L.). Postharvest Biology and Technology 11:165–179.

- Pereira AVS, Martins RB, Michereff SJ, Silva MB, Câmara MPS. (2012) Sensitivity of *Lasiodiplodia theobromae* from Brazilian papaya orchards to MBC and DMI fungicides. *European Journal of Plant Pathology* 132: 489-498.
- Phillips AJL. (2002) *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* 41:3-18.
- Phillips AJL, Alves A, Abdollahzadeh J, Slippers B, Wingfield MJ, Groenewald JZ, Crous PW. (2013) The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. *Studies in Mycology* 76:51-167.
- Punithalingam E. (1980). Plant diseases attributed to *Botryodiplodia theobromae* . Vaduz: Pat. J. Cramer.
- Ragazzi A, Moricca S, Dellavalle I. (1997) Vegetative compatibility and pathogenicity of *Diplodia mutila* isolates on oak. *European Journal of Forest Pathology* 27:391-396.
- Remesal E, Jordán-Ramírez R, Jiménez-Díaz RM, Navas-Cortés JA. (2012) Mycelial compatibility groups and pathogenic diversity in *Sclerotium rolfsii* populations from sugar beet crops in Mediterranean-type climate regions. *Plant Pathology* 61:739-753.
- Rezende JAM, Martins MC. (2005) Doenças do mamoeiro. In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA (eds.). *Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. 4th ed. São Paulo, Agronômica Ceres, pp 435-443.
- Ridgway HJ, Amponsah NT, Brown DS, Baskarathevan J, Jones EE, Jaspers MV. (2011) Detection of botryosphaeriaceous species in environmental samples using a multispecies primer pair. *Plant Pathology* 60:1118-1127.
- Ritzinger CHSP, Souza JS. (2000) Fitossanidade na exportação de mamão. In: Ritzinger CHSP, Souza JS (eds). *Mamão fitossanidade*. Embrapa, Brasília, pp 9.
- Ruggiero C, Marin SLD, Durigan JF. (2011) Mamão, uma história de sucesso. *Revista Brasileira de Fruticultura* 33:76-82.
- Santana EM, Martins MVV, Lima IM, Costa H, Ventura JA, Vieira P. (2007) Manejo das doenças do mamoeiro. In: Núcleo de Estudos em Fitopatologia - Universidade Federal de

- Lavras (ed.). Manejo integrado de doenças de fruteiras. Brasília, Sociedade Brasileira de Fitopatologia, pp 107-127.
- Slippers B, Wingfield MJ. (2007) Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* 21:90–106.
- Smith H, Wingfield MJ, Dewet J, Coutinho TA. (2000) Genotypic diversity of *Sphaeropsis sapinea* from South Africa and Northern Sumatra. *Plant Disease* 84:139-142.
- Stoddart JA, Taylor JF. (1988) Genotypic diversity: estimation and prediction in samples. *Genetics* 118:705-711.
- Van Niekerk JM, Fourie PH, Hallen F, Crous P. (2006) *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea* 45:43-54.
- Ventura JA, Costa H, Tatagiba JS. (2004) Papaya diseases and integrated control. In: Naqvi SAMH (ed). *Diseases of fruits and vegetables*, vol 2, Kluwer, Dordrecht, pp 201–268.
- Von Arx JA. (1987) *Plant pathogenic fungi*. J. Cramer, Berlin, 288 p.
- Wang Y, Hou Y, Bo H, Zhou H, Jing L, Zhao J. (2014) Mycelial compatibility groups and microsatellite markers reveal genetic diversity within and among populations of sunflower *Sclerotinia sclerotiorum* in China. *International Journal of Phytopathology* 3:21-31.
- Wikey S, Lombard L, Nakashima C, Motohashi K, Chukeatirote E, Cheewangkoon R, McKenzie EHC, Hyde KD, Crous PW. (2013) A phylogenetic re-evaluation of *Phyllosticta* (Botryosphaeriales). *Studies in Mycology* 76:1–29.
- Wu BM, Subbarao KV. (2006) Analyses of lettuce drop incidence and population structure of *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor*. *Phytopathology* 96:1322-1339.

Table 1 Geographic origin, climate type and populations of 102 *Lasiodiplodia theobromae* isolates from papaya produced in Northeastern Brazil used in this study

Geographic origin		Climate type	Population	Orchard code	No. of isolates	MCG ^b (no. isolates)
State	Locality					
Bahia	Juazeiro	Semi-arid	A	A-1	8	I (4), II (3), V (1)
				A-2	4	I (1), II (3)
				A-3	7	II (1), III (6)
Pernambuco	Amaraji	Tropical humid	B	B-1	8	VII (8)
	Goiana	Tropical humid	C	C-1	10	III (10)
Paraíba	Santa Rita	Tropical humid	D	D-1	6	IV (6)
				D-2	10	II (8), VII (2)
				D-3	9	VII (9)
				D-4	9	I (6), II (3)
Rio Grande do Norte	São José de Mipibú	Tropical humid	E	E-1	8	V (7), VII (1)
				E-2	9	I (9)
				E-3	8	III (7), VI (1)
				E-4	6	I (6)

^a Determined in this study.

Table 2 Mycelial compatibility groups (MCG) identified among 102 isolates of *Lasiodiplodia theobromae* from Northeastern Brazil papaya orchards

MCG	Isolates		Orchard ^a (number of isolates)
	Number	Frequency (%)	
I	26	25.5	A-1 (4), A-2 (1), D-4 (6), E-2 (9), E-4 (6)
II	18	17.6	A-1 (3), A-2 (3), A-3 (1), D-2 (8), D-4 (3)
III	23	22.5	A-3 (6), C-1 (10), E-3 (7)
IV	6	5.9	D-1 (6)
V	8	7.8	A-1 (1), E-1 (7)
VI	1	1.0	E-3 (1)
VII	20	19.6	B-1 (8), D-2 (2), D-3 (9), E-1 (1)

^aAccordinging the Table 1.

Table 3 Genotypic diversity indices based on mycelial compatibility groups for isolates of *Lasiodiplodia theobromae* from Northeastern Brazil papaya orchards representing five populations (Juazeiro, Amaraji, Goiana, Santa Rita and São José do Mipibú) based on their geographical location and two type climates (semi-arid and tropical humid)

Indices	Populations							
	Locality						Climate	
	Juazeiro	Amaraji	Goiana	Santa Rita	S.J. Mipibú	Total	Semi-arid	Tropical humid
Sample								
n^a	19	8	10	34	31	102	19	83
Diversity								
G^b	3.3 (2.5-4.0) ^g	1.0 (1.0-1.0)	1.0 (1.0-1.0)	3.7 (3.1-4.3)	3.0 (2.2-3.8)	5.1 (4.5-5.8)	3.3 (2.5-3.0)	5.2 (4.4-5.9)
N_I^c	3.4 (2.8-4.1)	1.0 (1.0-1.0)	1.0 (1.0-1.0)	3.8 (3.4-4.2)	3.5 (2.7-4.3)	5.6 (5.0-6.1)	3.5 (2.7-4.2)	5.7 (5.0-6.3)
Richness								
g_{obs}^d	4	1	1	4	5	7	4	7
$E(g_n)^e$	3.4	1.0	1.0	3.6	3.3	4.4	4.0	5.8
Evenness								
E_5^f	0.92	0.00	0.00	0.95	0.79	0.90	0.92	0.89

^a Number of isolates.

^b Stoddart and Taylor's diversity index (Stoddart and Taylor 1988).

^c Hill's diversity index (Hill 1973).

^d Number of observed genotypes (MCGs).

^e Expected number of genotypes (MCGs) estimated by the rarefaction method (Grünwald et al. 2003).

^f Ludwig and Reynold's evenness index (Ludwig and Reynolds 1988).

^g Numbers in parenthesis indicates 95% confidence interval calculated by bootstrapping (1.000 resamples) using the accelerated bootstrap method (Grünwald et al. 2003).

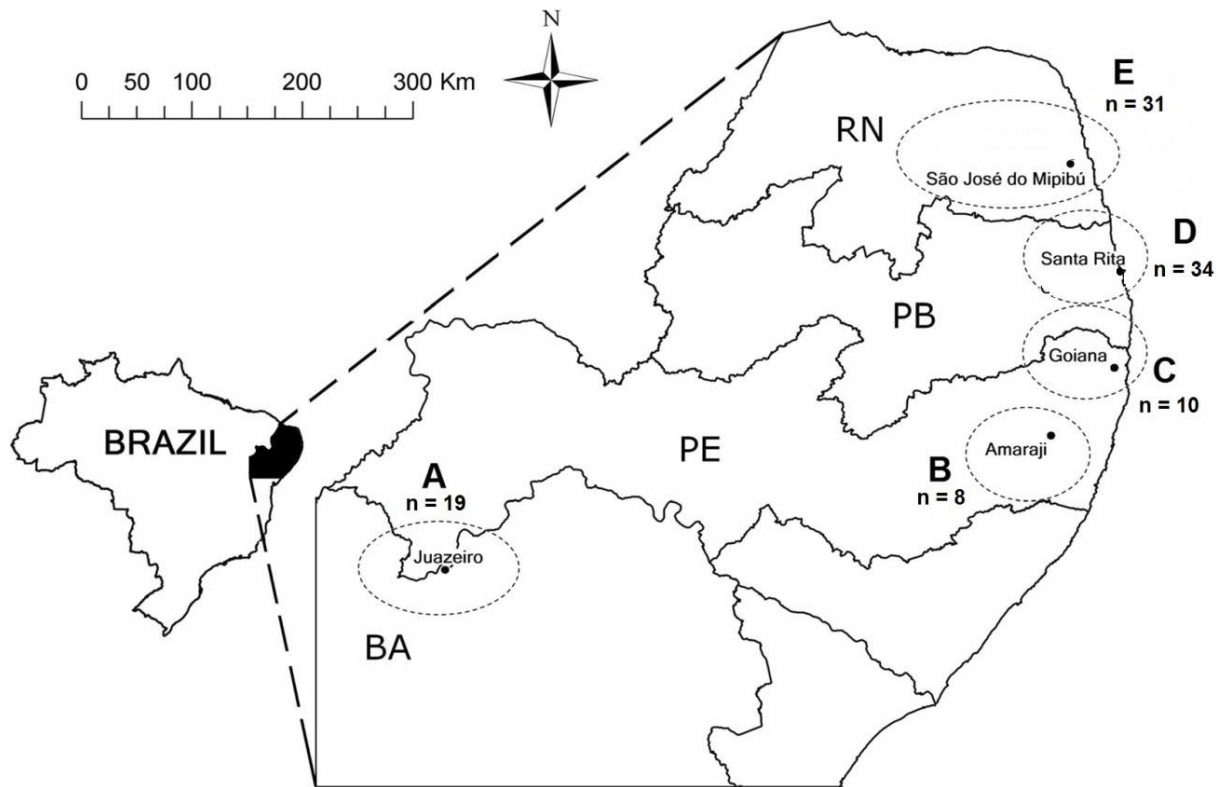


Fig. 1 Collection sites of *Lasiodiplodia theobromae* isolates from Northeastern Brazil papaya orchards, located in the states of Bahia (BA), Pernambuco (PE), Paraíba (PB) and Rio Grande do Norte (RN). The names next to the dots correspond to the localities corresponding to the sampled orchards. Dotted semicircles represent the populations defined for this study; the letter beside each semi-circle corresponds to the coding attributed to the population; n = number of isolates in each population.

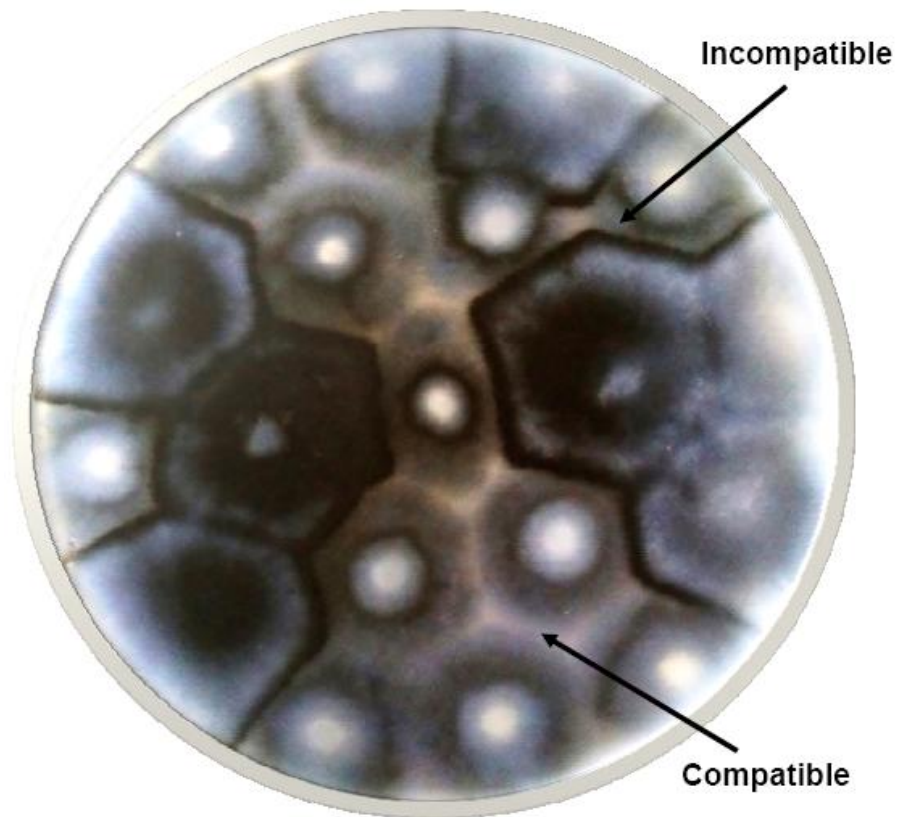


Fig. 2 Dark barrage lines (arrow) formed among incompatible isolates of *Lasiodiplodia theobromae* belonging to different mycelial compatibility groups (MCGs) and confluent mycelium among compatible isolates belonging to the same MCG.

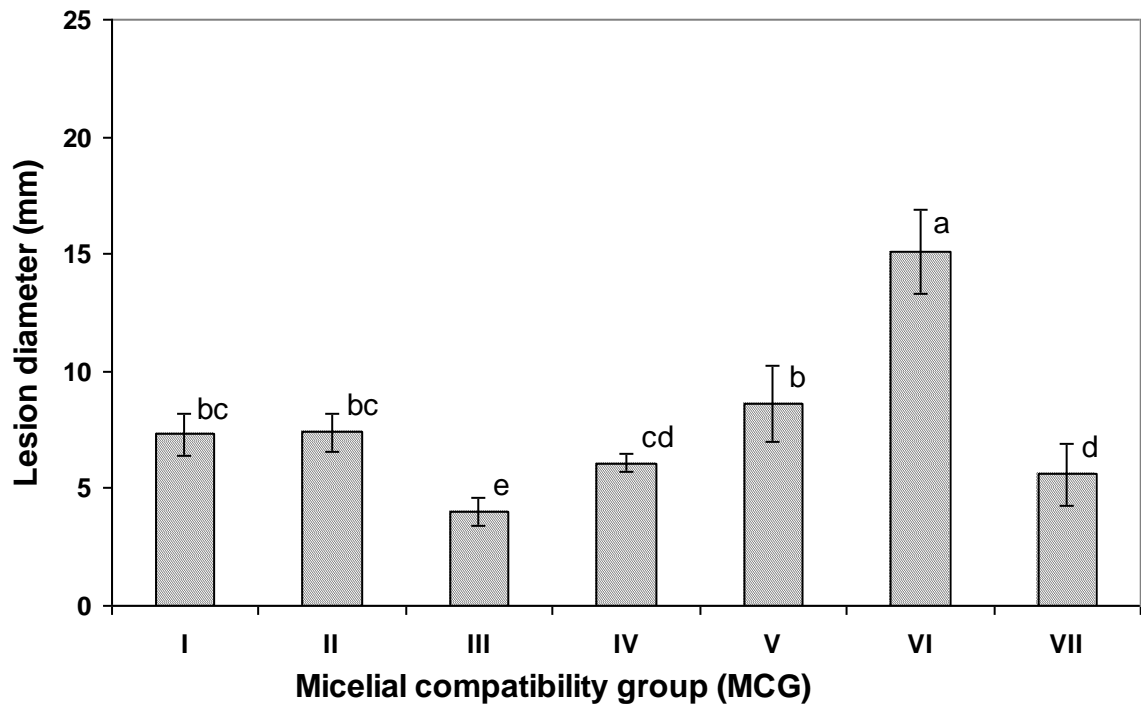


Fig. 3 Mean lesion diameter (mm) caused by seven MCGs of *L. theobromae* associated with papaya stem-end rot in Northeastern Brazil, 72 h after inoculation with mycelium colonized agar plugs onto wounded fruits of Golden cultivar. Bars above columns are the standard error of the mean. Columns with same letter do not differ significantly according to Fisher's LSD test ($P \leq 0.05$).

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

1. Os isolados de *Lasiodiplodia theobromae* obtidos de mamão produzido no Nordeste do Brasil podem ser distribuídos em sete grupos de compatibilidade micelial (GCMs), indicando a existência de diversidade genotípica;
2. As populações de *L. theobromae* de mamão produzidos no Nordeste do Brasil têm baixo nível de diversidade genotípica;
3. Alguns genótipos (GCMs) de *L. theobromae* estão amplamente distribuídos entre as localidades e pomares de mamoeiro do Nordeste do Brasil, enquanto outros estão restritos a pomares específicos.
4. Existe diferença na diversidade genotípica entre as populações de *L. theobromae* de mamão oriundas de diferentes localidades no Nordeste do Brasil;
5. Maior diversidade genotípica nas populações de *L. theobromae* ocorre em localidades com histórico antigo de produção de mamão e extensas áreas cultivadas;
6. A população de *L. theobromae* do clima tropical úmido tem maior diversidade genotípica que a população do clima semiárido;
7. Os isolados pertencentes aos diferentes GCMs têm diferenças nos níveis de agressividade a frutos de mamoeiro.