

CÍNTIA DE SOUSA BEZERRA

ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES E GRUPOS DE
INCOMPATIBILIDADE MICELIAL DE *Monosporascus cannonballus*

RECIFE

2011

CÍNTIA DE SOUSA BEZERRA

ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES E GRUPOS DE
INCOMPATIBILIDADE MICELIAL DE *Monosporascus cannonballus*

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

RECIFE - PE

FEVEREIRO - 2011

ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES E GRUPOS DE
INCOMPATIBILIDADE MICELIAL DE *Monosporascus cannonballus*

CÍNTIA DE SOUSA BEZERRA

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

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

Prof. Dr. Sami Jorge Michereff (UFRPE) - Co-orientador

RECIFE - PE

FEVEREIRO – 2011

Ficha catalográfica

B574e Bezerra, Cíntia de Sousa
Estrutura genética de populações e grupos de
incompatibilidade micelial de *Monosporascus cannonballus* /
Cíntia de Sousa Bezerra. -- 2011.
73 f.: il.

Orientador: Marcos Paz Saraiva Câmara.
Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia,
Recife, 2011.
Inclui referências e anexos.

1. Diversidade genética 2. Declínio dos ramos do meloeiro
3. *Cucumis melo* 4. Patógenos radiculares I. Câmara, Marcos
Paz Saraiva, orientador II. Título

CDD 581.2

ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES E GRUPOS DE
INCOMPATIBILIDADE MICELIAL DE *Monosporascus cannonballus*

CÍNTIA DE SOUSA BEZERRA

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 25/02/2011

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara (UFRPE)

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Delson Laranjeira (UFRPE)

Prof. Dr. Péricles Albuquerque Melo Filho (UFRPE)

Dr. Domingos Eduardo G. Tavares de Andrade (IPA)

Dr. José Adriano Giorgi (PPGEA-UFRPE)

RECIFE - PE

FEVEREIRO – 2011

AGRADECIMENTOS

A Deus que me concedeu a vida, as oportunidades de crescimento e o apoio em todos os momentos;

A minha família, meu marido Thiago, meus pais Edmundo e Diana, minhas irmãs, sobrinhos, tios e avós pelo incentivo nesta caminhada, pelo porto seguro que me proporcionaram e por torcerem por mim;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco pelo apoio institucional e à Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo;

Aos meus orientadores Marcos Câmara e Sami Michereff pelos ensinamentos e por confiarem a mim a execução deste trabalho;

Aos professores Delson Laranjeira, Elineide Silveira, Rosa Mariano, Elvira Pedrosa, Sônia Oliveira, Gaus Lima, Gilvan Pio-Ribeiro por compartilharem seus conhecimentos;

Aos colegas de turma Alessandra, Frank, Isadora, Gustavo, Sarah, Janaína, Jeane, Patrícia e Waléria;

Aos colegas de laboratório Alba, Marcelo, Litervaldo, Yrlania, Leo e Valéria.

RESUMO

O declínio das ramas do meloeiro causado pelo fungo *Monosporascus cannonballus*, vem causando prejuízos nas áreas de cultivo de melão em todo o mundo. Para o desenvolvimento de estratégias de manejo é essencial conhecer a estrutura genética da população do patógeno. Os objetivos deste estudo foram descrever a estrutura genética e as forças evolutivas que atuam sobre a população de *M. cannonballus*, e comparar a população Brasileira a isolados coletados na Espanha. Os isolados utilizados foram coletados em sete áreas de plantio comercial nos municípios de Mossoró no Rio Grande do Norte, Quixeré e Icapuí no Ceará. Foi feita a extração do DNA genômico, seguida de uma reação ISSR para a análise genética da população. Testes de incompatibilidade micelial foram realizados em meio BDA pareando os isolados consigo e com os demais para formar grupos. Com base nas frequências de MCGs foram calculados índices de diversidade genotípica e seus componentes de riqueza e equitabilidade. Os dados obtidos foram analisados nos programas R, NTSYS e PopGen. As sete áreas coletadas apresentaram baixa distância genética entre si (G_{ST} 0,004-0,068), quando agrupadas em duas subpopulações CE e RN a diversidade genética (G_{ST} 0,105) entre elas ainda foi baixa refletindo num alto valor de fluxo gênico ($Nm=31$) e a diversidade genética dentro das sub-populações ($H_S = 0,2277$) representou 98% da diversidade genética total da população estudada ($H_T = 0,2314$). A diversidade genotípica estimada pelo índice G foi 10% do máximo possível. Foram formados 4 MCG entre os 58 isolados do Brasil, enquanto na Espanha 6 grupos foram formados entre apenas 11 isolados. Os isolados do Brasil não foram compatíveis com os da Espanha. Houve uma diferença significativa na diversidade entre as populações da Espanha e Brasil, enquanto que entre as subpopulações brasileiras não houve diferença.

ABSTRACT

Vine decline of melons caused by *Monosporascus cannonballus* is a destructive disease worldwide. To implement a meaningful management of plantation diseases, it is important to have an understanding of the population diversity of the pathogen. The aims of this study were assay de genetic structure of *M. cannonballus* isolates from Brazil and compare this isolates with isolates form Spain. The population genetic structure of *M. cannonballus* was examined by applying ISSR and mycelial compatibility tests. Based on the frequencies of MCGs, and ISSR were estimated the genotype diversity indexes, as well as its richness and evenness components. All analyses were performed by R, NTSYS and PopGen software. The isolate were from 7 plantations in Mossoró in state of Rio Grande do Norte, Quixeré and Icapuí in state of Ceará. The seven plantations showed low genetic distance between them (G_{ST} 0.004 to 0.068), when grouped into two subpopulations CE and RN genetic diversity (G_{ST} 0.105) between them was also low, reflecting a high amount of gene flow ($Nm = 31$), genetic diversity within subpopulations ($H_s = 0.2277$) was 98% of the total genetic diversity of the population ($H_T = 0.2314$). The genotypic diversity estimated by Sttodart and Taylor was 10% of the maximum possible. Four MC groups were found amongst 58 isolates from Brazil, whereas in Spain 6 MC were found in only 11 isolates. None Brazilian isolates was compatible with Spanish isolates. Genetic variability was low and similar in the subpopulations (Icapuí, Quixeré and Mossoró) from Brazil. The genotypic diversity for Brazilian population was lower compared with the Spanish population. Based on these data, the Spanish population was more diverse than the Brazilian population. No significant difference in diversity exists between Icapui, Quixere and Mossoró subpopulations. But significant difference in diversity exists between the Brazilian and Spanish populations of *M. cannonballus*.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
CAPÍTULO I	8
INTRODUÇÃO GERAL	8
IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA CULTURA DO MELOEIRO	9
DECLÍNIO DAS RAMAS DO MELOEIRO	10
ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES	12
GRUPOS DE COMPATIBILIDADE VEGETATIVA	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
CAPÍTULO II	23
AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA GENÉTICA DE <i>MONOSPORASCUS CANNONBALLUS</i> NO PRINCIPAL PÓLO PRODUTOR DE MELÃO DO BRASIL	23
INTRODUÇÃO	25
MATERIAL E METODOS	27
RESULTADOS	31
DISCUSSÃO	33
REFERÊNCIAS	37
CAPÍTULO III	47
ANALYSIS OF POPULATION STRUCTURE OF <i>MONOSPORASCUS CANNONBALLUS</i> IN NORTHEASTERN BRAZIL BASED ON MYCELIAL INCOMPATIBILITY GROUPS	47
INTRODUCTION	47
MATERIALS AND METHODS	50
RESULTS	53
DISCUSSION	55
REFERENCES	57
CONCLUSÕES GERAIS	66
ANEXO	67

Capítulo I

Introdução Geral

Importância econômica da cultura do meloeiro

O meloeiro situa-se atualmente como uma das olerícolas mais importantes no mundo, com área cultivada de 1.288.804 hectares e produção de 27.726.563 toneladas, no ano de 2009 (FAO, 2009). Entre os principais países produtores, destacam-se a China (14.322.480 t), Turquia (1.749.935 t), Estados Unidos da América (1.300.000 t) e Espanha (1.062.000 t). O Brasil é o 12º produtor mundial dessa olerícola e o 2º da América Latina, com produção de 402.959 toneladas e produtividade média de 12,4 toneladas por hectare (FAO, 2009; IBGE, 2009).

No Brasil, a produção de melão concentra-se na região Nordeste, sendo os maiores pólos produtores os estados do Rio Grande do Norte (201.259 t) e Ceará (124.157 t), destacando-se os municípios de Mossoró (RN) (168.000t) e Quixeré (CE) (61.500 t) como os maiores produtores nacionais no ano de 2009 (IBGE, 2009). Os estados da Bahia (32.337 t) e Pernambuco (15.970 t) são respectivamente o 3º e 4º maiores produtores nacionais de melão. O Nordeste brasileiro foi responsável, no ano de 2009, por mais de 80% da produção nacional (IBGE, 2009). A oferta de frutos de meloeiro oriundos dessa região tem alcançado posição de destaque tanto no mercado interno quanto para exportação (BRASIL, 2003). Além disso, essa atividade gera mais de 60 mil empregos diretos e indiretos (TAVARES, 2002).

A área plantada de meloeiro no Nordeste brasileiro aumentou de 9.800 hectares, em 1996, para 14.903 hectares no ano de 2009 (IBGE, 2009), o que corresponde a um aumento de 69,4% e demonstra o crescente interesse por esta cultura na região. O aumento da área cultivada, a elevação do rendimento de frutos por unidade de área e o desenvolvimento de novos materiais genéticos, têm demandado melhorias nas práticas de manejo da cultura (CRISÓSTOMO et al., 2002). O pólo RN/CE caracteriza-se pela existência de grandes e médias empresas com modernas tecnologias, como uso de irrigação localizada por gotejamento, da cobertura plástica de polietileno (“mulch”) e da manta térmica tecido não tecido (TNT), por proporcionarem o aumento no rendimento da cultura (SANTOS et al., 2001; MAROUELLI et al., 2002).

A expansão da cultura do meloeiro no Nordeste brasileiro, aliada ao cultivo intensivo e contínuo sem rotação de culturas durante todo o ano, tem contribuído para o aumento da incidência e severidade de várias doenças (SANTOS et al., 2000). As doenças são responsáveis pelas maiores perdas de produtividade e qualidade dos frutos comercializados (MENEZES et al., 2000), constituindo sério entrave ao

desenvolvimento da cultura, pois inibem iniciativas empresarias e de exportação, e sendo capaz de prejudicar investimentos que poderiam gerar capital e trabalho (VIANA et al., 2002).

Declínio das ramas do meloeiro

Nos últimos vinte anos, doenças causadas por patógenos habitantes do solo, tem se tornado o fator limitante de produção em muitas áreas de cultivo de curcubitáceas em todo o mundo (BRUTON, 1998). A doença conhecida por declínio das ramas do meloeiro, colapso do meloeiro, morte súbita (SALES JÚNIOR et al., 2003), murcha de monosporascus (VIANA et al., 2002) ou declino de monosporascus (SENHOR et al., 2010) tem se destacado por limitar a produção de melão em diversos países. Trata-se de uma complexa síndrome que se encontra associado a diversos agentes patogênicos como fungos, bactérias e vírus, ocorrendo com certa frequência o ataque conjunto de vários deles isolados ou em associação (SALES JÚNIOR et al., 2003). Os fungos fitopatogênicos associados ao colapso são diversos e, com frequência aparecem combinados (BRUTON, 1998; GARCÍA-JIMÉNEZ et al., 2000). Em função das características da infecção, os fungos causadores do declínio do meloeiro podem ser agrupados em três categorias (BRUTON, 1998; AEGERTER et al., 2000; COSTA et al., 2000; GARCÍA-JIMÉNEZ et al., 2000; SANTOS et al., 2000): a) causador de marchas vasculares: *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* Snyder e Hansen; b) causadores de podridões do colo: *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. e *Myrothecium roridum* Tode; c) causadores de podridões de raízes: *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae* Snyder e Hansen, *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Monosporascus cannonballus* Pollack e Uecker, *Rhizopycnis vagum* Farr e *Acremonium cucurbitacearum* Alfaro-García, Gams e García-Jiménez. Em levantamentos conduzidos na região Nordeste, o fungo *M. cannonballus* foi isolado de 30% das áreas apresentando declínio das ramas (ANDRADE et al., 2005)

O declínio das ramas do meloeiro é uma doença emergente no mundo todo, que vem, recentemente, ganhando atenção entre os fitopatologistas. A doença foi relatada pela primeira vez em Israel (REUVENI et al., 1983). Na década de 90 surgiram novos relatos da doença nos Estados Unidos (MERTELY et al., 1991), Espanha (LOBO-RUANO, 1990), Tunísia (MARTYN et al., 1994), Coréia (PARK et al., 1994), Taiwan, México (MARTYN et al., 1996), Arábia Saudita (KARLATTI et al., 1997), Guatemala

(BRUTON; MILLER, 1997a) e Honduras (BRUTON; MILLER, 1997b). Desde o início do milênio mais sete países reportaram a doença: Itália (INFANTINO et al., 2002), Iraque, Paquistão, Egito (EL DESOUKY, 2003) Brasil (SALES JÚNIOR et al., 2003, 2004), Irã (SARPELEH, 2008) e China (SUQIN; BIN, 2010). Em todos os relatos acima o fungo *M. cannonballus* foi descrito como o agente causal.

M. cannonballus foi descrito 1974 por Pollack e Uecker, como um gênero *et species novus* com base em espécimes obtidos de raízes de melão necrosadas procedentes do Arizona, apresenta micélio de coloração branca a cinza, esparso a abundante, peritécios globosos, dentro dos quais emergem os ascos com ascósporos. Apesar dos ascomicetos em geral produzirem oito ascósporos por asco, *M. cannonballus* produz apenas um ou, muito raramente, dois ascósporos. O estágio assexual (anamorfo) desse fungo não tem sido observado (POLLACK; UECKER, 1974). Os ascósporos são escuros, esféricos, multinucleados com dupla camada, apresentam tamanhos variando de 40 a 50 µm de diâmetro, são extremamente resistentes a dessecação e constituem a fonte de inóculo primário entre as épocas de plantio (STANGHELLINI et al., 1996).

A infecção da planta por *M. cannonballus* pode ocorrer por propágulos (micélio ou ascosporos), que sobrevivem no solo ou em restos culturais, e que têm seu desenvolvimento estimulado por exsudados de raízes e pela microbiota no solo, para assim, invadir e colonizar os tecidos, levando a destruição do córtex das raízes (STANGHELLINI et al., 2000). Os sintomas de colapso são de fácil identificação, uma vez que as plantas afetadas apresentam principalmente necroses e podridões nas raízes e têm como consequência a murcha e morte na época próxima à formação dos frutos (GARCÍA-JIMÉNEZ et al., 2000). Os primeiros sintomas do colapso do meloeiro são amarelecimento gradual e seca das folhas mais velhas, o qual avança rapidamente para as folhas jovens, causando a seca completa e morte prematura das plantas (MARTYN; MILLER, 1996). O sintoma mais evidente do colapso causado por *M. cannonballus* é a presença de pontos negros sobre as raízes, alguns emergentes, observados a olho nú, que corresponde às frutificações (peritécios) do fungo (GARCÍA-JIMÉNEZ, et al., 1994; GARCÍA-JIMÉNEZ et al., 2000).

A gama de hospedeiros de *M. cannonballus* inclui as cucurbitáceas das quais os principais hospedeiros são melão e melancia (*Citrullus lanatus* Thunb. (Thunb.)

Matsum & Nakai), outras cucurbitáceas hospedeiras são a cabaça (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standl.) (UEMATSU et al., 1992), pepino (*Cucumis sativus* L.) (INFANTINO et al., 2002), abóbora (*Cucurbita pepo* L. e *Cucurbita moschata*) moranga (*Cucurbita máxima* Duch.) cabaça (*L. siceraria*), e bucha (*Luffaegyptiaca* Mill). Além destas existem evidências que trigo (*Triticum aestivum* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), milho (*Zea mays* L.), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e outras não cucurbitáceas também são hospedeiras desse fungo embora não causem danos de importância elas podem contribuir para a persistência do patógeno em períodos curtos ou prolongados de rotação de culturas (MERTELY et al., 1993).

A utilização de cultivares resistentes parece ser a forma mais interessante de controle do colapso do meloeiro, embora apresente algumas dificuldades, tais como a obtenção de cultivares que apresentem características agrônomicas desejáveis e o tempo necessário para sua obtenção (GARCÍA-JIMÉNEZ et al., 1994; BLANCARD et al., 1996).

Estrutura Genética de Populações

Estrutura genética pode ser definida como a quantidade e 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 (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). Entender a contribuição relativa de taxas de mutação, recombinação, seleção natural, fluxo gênico, deriva genética e migração para a geração e manutenção da variação genética nas populações de patógenos é importante, apesar de tais fatores permanecem pouco estudados e, portanto, pouco compreendidos (COOKE; LEES, 2004). Inexistem estudos sobre a estrutura genética de populações no caso de *M. cannonballus*.

A predição de estratégias sustentáveis de manejo de doenças é claramente dependente da compreensão do patógeno e da sua dinâmica populacional (COOKE; LEES, 2004), pois estes fatores podem prever como as populações irão desenvolver respostas a diferentes estratégias de controle (ALFONSO et al., 2000). Patógenos com maior diversidade genética impõem um maior risco de sobrepor os efeitos de genes de resistência ou o desenvolvimento para anular outros métodos de controle como aplicações de fungicida ou antibióticos (MCDONALD et al., 2002).

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, 2000). A estrutura genética pode ser usada para inferir o impacto relativo de diferentes forças que influenciam a evolução da população de patógenos. 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 no hospedeiro 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 et al, 1999).

O fluxo gênico pode ser quantificado a partir de medidas diretas e indiretas. As medidas diretas referem-se ao fluxo gênico contemporâneo, enquanto que as indiretas são baseadas na estrutura de populações e referem-se ao fluxo gênico histórico ou passado (ZUCHI, 2002). Entre os métodos indiretos estão aquele via F_{ST} (WRIGHT, 1951) que é rotineiramente utilizado para estimar o número de migrantes por geração (Nm). A estatística F de Wright se aplica a estudos de populações com dois alelos por loco, para estudar populações com múltiplos alelos Nei (1973) sugeriu um novo método de medir o grau de diferenciação gênica entre populações. No seu modelo a diferenciação gênica entre populações é dada pelo coeficiente G_{ST} que é equivalente ao F_{ST} de Wright. Mais tarde Nei (1987) propôs uma fórmula para calcular o G_{ST} com base no H_T e H_S .

A probabilidade de dois genes escolhidos aleatoriamente serem idênticos ou não idênticos é dada pela identidade gênica ou homozigosidade (J) e pela medida da variação gênica de uma população (H) geralmente chamada de heterozigosidade ou diversidade gênica. A diversidade gênica máxima é 1, o valor de H é dado pela fórmula: $H = 1 - J$, em que a variação gênica da população estudada é igual a 1 menos o valor da identidade gênica encontrada nesta população (NEI, 1973).

A diversidade genotípica é um dos vários componentes estimados durante a análise da estrutura genética das populações de microrganismos (GRÜNWARD, 2003). Dois índices de diversidade genotípica, Stoddart e Taylor G (1988) e Shannon-Wiener H' , têm sido usados com mais frequência na estimativa da diversidade genética de populações de fitopatógenos (GOODWIN, 1993).

A diversidade genotípica é composta por dois aspectos: a riqueza e a equitabilidade. A riqueza é o número de genótipos contidos na população, intuitivamente a diversidade aumenta com o aumento da riqueza. A equitabilidade mede como os genótipos são distribuídos dentro da população. Se um pequeno número de genótipos dominam a população, a equitabilidade é baixa e leva a uma baixa diversidade também. Mas se cada genótipo ocorre na mesma frequência então a equitabilidade e a diversidade chega ao máximo. Assim índices como Stoddart e Taylor G (1988) e Shannon-Wiener H' aumentam a medida que a riqueza (mais genótipos na população) ou equitabilidade (menor domínio de um ou poucos genótipos na população) aumentam (GRÜNWARD, 2003).

Os índices de diversidade têm sido utilizados na fitopatologia para medir a diversidade de fenótipos, por exemplo para a estrutura da raça (ou patótipo) do fungo da ferrugem e oomycetes (ANDRIVON, 1994) assim como a diversidade genotípica de isoenzimas (GOODWIN, 1993) ou outros marcadores moleculares (CHEN et al., 1994).

A diversidade gênica estimada através dos índices de diversidade genética total (H_T), a diversidade genética dentro das populações (H_S) e entre as populações (G_{ST}) é uma informação muito útil para a avaliação da estrutura genética da população e para isso são utilizados vários marcadores. Os marcadores moleculares são muito úteis para este tipo de análise, as primeiras foram feitas com RFLP analisando a estrutura de vários fitopatógenos como o *Rhynchosporium secalis* (Oudem.) J.J. Davis; após o desenvolvimento da técnica PCR os marcadores RAPD e AFLP são usados para estas análises em muitos fungos como *Erysiphe necator* Schwein. e *Botrytis cinerea* Persoon

ex Fries por serem mais rápidos e simples em sua execução (MCDONALD et al., 1999; NÚÑEZ et al., 2006).

Os marcadores ISSR (Inter -simple sequence repeat) surgiram como um sistema de análise molecular que apresenta a confiabilidade e reprodutibilidade dos marcadores SSR entretanto sem a necessidade de conhecimento prévio da sequência que consome mais tempo, fomento e trabalho. Além destas vantagens o ISSR possui a simplicidade do RAPD e como estes são marcadores dominantes. A técnica se baseia na amplificação de sequências localizadas entre dois microssatélites inversamente orientados. Os oligonuclotídeos iniciadores ISSR são sequências microssatélite como (CA)_n (ZIETKIEWICZ, 1994).

Grupos de compatibilidade vegetativa

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 - vegetative compatibility group (VCG). A compatibilidade vegetativa é estudada em muitos gêneros de fungos incluindo *Podospora*, *Aspergillus*, *Cryphonectria*, *Neurospora* (LESLIE, 1993) *Fusarium* (MCCALLUM et al., 2004). O controle genético da compatibilidade vegetativa mostrou ser condicionado por diversos loci nas espécies em que foi estudado (BEGUERET et al., 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 a incompatibilidade do heterocarion mediada por diferentes locos het (GLASS; KANEKO, 2003).

A compatibilidade micelial foi descrita como um dos vários eventos associados a 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. A formação de zona de barreira é bem descrita em espécies de fungos como *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr (ANAGNOSTAKIS, 1977), *Podospora anserina* (Ces.) Rehm (ESSER; BLAICH, 1973, BERGUERET, 1994), *Ophiostoma ulmi* (Buisman) Nannf. (BRASIER, 1984), *Fusarium graminearum* Schwabe (MCCALLUN et al., 2004).

Isolados incompatíveis vegetativamente formam uma zona de barreira na linha de junção das duas colônias, enquanto isolados compatíveis não formam a zona de barreira e crescem normalmente entre si sem qualquer alteração morfológica. A descrição da zona de barreira, ou interação antagonista, difere entre as espécies e vários tipos de barreiras têm sido descritos para algumas espécies como *O. ulmi* (BRASIER, 1984). 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 incompatibilidade micelial em *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (KOHN et al., 1990) e *Sclerotium cepivorum* (EARNSHAW; BOLAND, 1997) foi descrita como uma linha distinta de reação com micélio aéreo abundante ou, alternativamente, como uma zona de micélio fino. Kohn et al. (1991) definiu incompatibilidade micelial, evidenciada pela formação de uma linha de reação entre isolados em pareamentos em Agar, como a incapacidade de dois isolados se fundirem e formarem uma colônia.

VCGs tem sido usados para estudar biologia de populações de muitos fungos como *Fusarium* spp.. VCGs podem ser determinados diretamente através da formação do heterocáron usando mutantes auxotróficos tais como os mutantes que não utilizam nitrato(nit)(LESLIE, 1993). Nesta técnica desenvolvida por Puhalla (1985) os mutantes nit ocorrem espontaneamente sobre o meio contendo clorato e tem sido um método

eficiente para caracterizar VCGs em muitas espécies de fungos (LESLIE, 1993). Embora esta técnica possa ser usada para forçar e detectar a formação do heterocarion, a geração e preservação de mutantes nit é um processo laborioso. Mutantes que não utilizam nitrato são muitas vezes difíceis de serem gerados em algumas espécies como *S. sclerotiorum* que tem um alto nível de resistência natural ao clorato (KOHN et al.,1990).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEGERTER, B.J.; GORDON, T.R.; DAVIS, R.M. Occurrence and pathogenicity of fungi associated with melon root rot and vine decline in California. **Plant Disease**, v.84, n.3, p.224-230, 2000.
- ALFONSO, C.R.; RAPOSO, R.E.; MELGAREJO, P. Genetic diversity in *Botrytis cinerea* populations on vegetable crops in greenhouses in south-eastern Spain, **Plant Pathology**, v.49, p.243–251, 2000.
- ANAGNOSTAKIS, S. L. Vegetative incompatibility in *Endothia parasitica*. **Exp. Mycol.**v.1, p.306-31, 1977.
- ANDRADE, D. E. G. T.; MICHEREFF, S. J.; BIONDI, C.M.; NASCIMENTO, C. W. A.; SALES JÚNIOR, R. Frequência de fungos associados ao colapso do meloeiro e relação com características físicas, químicas e microbiológicas dos solos. **Summa Phytopathologica**. v. 31, p. 327-333, 2005.
- ANDRIVON, D. Race structure and dynamics in populations of *Phytophthora infestans* **Can. J. Bot.** v.72, p.1681-1687, 1994.
- BEGUERET, J.; TURCQ, B.; CLAVE, C. Vegetative incompatibility in filamentous fungi: Het genes begin to talk. **TIG (Trends Genet.)** v.10,p.441-446, 1994.
- BLANCARD, D.; LECOQ, H.; PITRAT, M. **Enfermedades de las cucurbitáceas**. Paris: INRA, 1996. 301 p.
- BRASIER, C. M. Inter-mycelial recognition systems in *Ceratocystis ulmi*: Their physiological properties and ecological importance. Pages 451-497 in: *The Ecology and Physiology of the Fungal Mycelium*. D. H. Jennings and A. D. M. Rayner, eds. Cambridge University Press, London. 1984.
- BRASIL. Melão. Brasília: Ministério da Integração Nacional, Secretaria de Infra-Estrutura Hídrica, Departamento de Desenvolvimento Hidroagrícola, 2003. 12 p. (FrutiSéries. Ceará, 2).
- BRUTON, B.D. Soilborne diseases in cucurbitaceae: pathogen virulence and host resistance. In: McCreight, J. (Ed.). **Cucurbitaceae '98**. Alexandria: International Society of Horticultural Science, 1998. p.143-166.
- BRUTON, B.D.; MILLER. M. E. (a) Occurrence of Vine Decline Diseases of Melons in Guatemala. **Plant Disease** v.81, p.694, 1997.
- BRUTON, B.D.; MILLER. M. E. (b) Occurrence of Vine Decline Diseases of Melons in Honduras. **Plant Disease** v.81, p.696, 1997.
- CHEN, R. S.; BOEGER, J. M.; MCDONALD, B. A. Genetic stability in a population of a plant pathogenic fungus over time. **Mol. Ecol.** v.3, p.209-218, 1994.
- COOKE, D.E.L.; LEES, A.K. Markers, old and new, for examining *Phytophthora infestans* diversity, **Plant Pathology**, v.53, p.692-704. 2004

COSTA, N.D.; DIAS, R.C.S.; FARIA, C.M.B.; TAVARES, S.C.C.H.; TERAPO, D. **Cultivo do melão**. Petrolina: Embrapa Semi Árido, 2000. 67p. (Embrapa Semi Árido. Circular Técnica, 59).

CRISÓSTOMO, L. A.; SANTOS, A.A.; RAIJ, B.V.; FARIA, C.M.B.; SILVA, D.J.; FERNANDES, F.A.M.; SANTOS, F.J.S.; CRISÓSTOMO, J.R.; FREITAS, J.A.D.; HOLANDA, J.S.; CARDOSO, J.W.; COSTA, N.D. Adubação, irrigação, híbridos e práticas culturais para o meloeiro no Nordeste. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2002. 21 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Circular Técnica, 14).

EARNSHAW, D., AND BOLAND, G. J. Mycelial compatibility groups in *Sclerotium cepivorum*. **Plant Pathol.** v. 46, p.229-238, 1997.

EDELSTEIN, M.; COHEN, R.; BURGR, Y.; SHRIBER, S.; PIVONIA, S. Integrated management of sudden wilt in melons, caused by *Monosporascus cannonballus*, using grafting and reduced rates of methyl bromide. **Plant Disease**, v. 83, n. 12, p. 1142-1145, 1999.

EL DESOUKY SM. Occurrence of *Monosporascus* root rot and vine decline of cantaloupe and watermelon in Egypt. **Egypt J Phytopathol**; v.31, p. 141-50, 2003.

ESSER, K.; BLAICH, R. Heterogenic incompatibility in plants and animals. **Adv. Genet.** v.17, p.107-152, 1973.

FAO. **FAOSTAT** - Agricultural statistics database. [online]. Rome: World Agricultural Information Centre 2002. Disponível em: <http://www.fao.org/waicent/portal/statistics_en.asp>. Acesso em: 07 fev. 2011.

GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J.; MARTÍNEZ-FERRER, G. Puntos negros de las raíces de melón y sandía (*Monosporascus* spp.) In: DÍAS RUÍZ, J. R.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J. (Eds.). **Enfermedades de las Cucurbitáceas em España**. Madrid: Sociedad Española de Fitopatología, 1994. p. 38-41.

GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J.; SALES JR., R.; JORDÁ, C.; BRUTON, B.D. Fungal pathogens associated with melon plants collapse in Spain. **EPP0 Bulletin**, Paris, v.30, p.169-173, 2000.

GLASS N.L., KANEKO I., Fatal attraction: nonself recognition and heterokaryon incompatibility in filamentous fungi. **Eukaryotic Cell** v.2, p.1-8, 2003.

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. **Mycol. Res.** v.97, 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** v. 93, p.738-746, 2003.

HAMMOND-KOSACK, K.; JONES, J.D.G. Responses to plant pathogens In (Buchanan, B.; Gruissem, W.; Jones, R. eds) p 1102-1156, 2000.

HICKEY, P. C.; JACOBSON, D. J.; READ, N. D.; GLASS, N. L. Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. **Fungal Genet. Biol.** v.37, p.109–119, 2002.

IBGE. **Produção agrícola municipal**. [online]. Rio de Janeiro. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2011. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/acervo/acervo2.asp>>. Acesso em: 12 jan. 2011.

INFANTINO A, UCCELLETTI A, DI STEFANO G, CIUFFREDA G, FRISULLO S. First report of *Monosporascus cannonballus* on melon in Italy. **J Plant Pathol** v.84, p.140, 2002.

KARLATTI, R. S.; ABDEEN, F. M.; AL-FEHAID, M. S. First Report of *Monosporascus cannonballus* on Melons in Saudi Arabia. **Plant Disease** v.81, p. 1215, 1997.

KOHN, L. M., CARBONE, I.; ANDERSON, J. B. Mycelial interactions in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Exp. Mycol.** v.14, p. 255-267, 1990.

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** v.81, p.480-485, 1991.

LESLIE, J. F. Fungal vegetative compatibility. **Annu. Rev. Phytopathol.** v.31, p. 127-150, 1993.

LESLIE, J. F. Fungal vegetative compatibility—promises and prospects. **Phytoparasitica** v. 24, p. 3-6, 1996.

LOBO RUANO, M. **Colapso del melón producido por hongos del género *Monosporascus***. Boletín de sanidad vegetal. Plagas, 16: 701-707. 1990.

MARQUELLI, A. W. et al. Irrigação. In: SILVA, H. R.; COSTA, N. D. (Eds.). *Melão produção*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. p. 51-69. (Frutas do Brasil, 33).

MARTYN, R. D.; BATTEN, J. S. ;PARK, Y.-J.; MILLER. M. E. First Report of *Monosporascus* Root Rot/Vine Decline of Watermelon in Mexico. **Plant Disease** v.80, p. 1430, 1996.

MARTYN, R. D.; LOVIC, B. R.; MADDOX, D. A.; GERMASH, A.; MILLER M. E. First Report of *Monosporascus* Root Rot/Vine Decline of Watermelon in Tunisia. **Plant Disease** v. 78, p. 1220, 1994.

MARTYN, R. D.; MILLER, M. E. *Monosporascus* root rot and vine decline: an emerging disease of melon worldwide. **Plant Disease**, v. 80, n. 7, p. 716-725, 1996.

MCCALLUM, B. D.; TEKAUZ, A.; GILBERT, J. Barrage zone formation between vegetatively incompatible *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) isolates. **Phytopathology** v. 94, p.432-437, 2004.

MCDONALD B.A. The Population Genetics of Fungi: Tools and Techniques. **Phytopathology** v. 87, p.448-453, 1997.

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 349-379, 2002.

MCDONALD, B.A.; ZHAN, J.; BURDON, J.J. Genetic structure of *Rhynchosporium secalis* in Australia. **Phytopathology**, v.89, p.639-645, 1999.

MENEZES, J. B.; FILGUEIRAS, H. A. C.; ALVES, R. E.; MAIA, C. E.; ANDRADE, G. G.; ALMEIDA, J. H. S.; VIANA, F. M. P. Características do melão para exportação. In: ALVES, R.E. (Ed.). Melão pós-colheita. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2000. p. 13- 22. (Frutas do Brasil, 10).

MERTELY J. C.; MARTYN R. D.; MILLER M. E.; BRUTON B. D. The role of *Monosporascus cannonballus* and other fungi in a root rot disease of muskmelon. **Plant Disease**, v. 75, n. 11, p. 1133-1137, 1991.

MERTELY J. C.; MARTYN R. D.; MILLER M. E.; BRUTON B. D. An expanded host range for the muskmelon pathogens *Monosporascus cannonballus*. **Plant Disease**, v. 77, n. 7, p. 667-673, 1993.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.70, n.12, p.3321-3323. 1973.

NEI, M. Molecular evolutionary Genetics. New York USA Columbia University Press 1987.

NÚÑEZ, Y.; GALLEGO, J.; PONZ, F.; RAPOSO, R. Analysis of population of *Erysiphe necator* using AFLP markers, **Plant Pathology**, v. 55, p 650-656, 2006.

PARK, K.S.; NAM, S.H.; KIM, C. H. Root rot bottle gourd stock of watermelon caused by *monosporascus cannonballus* in Korea. **Korean Journal of plant Pathology** 10:175-180, 1994.

POLLACK, F.G.; UECKER, F.A. *Monosporascus cannonballus*, an unusual ascomycete in cantaloupe roots. **Mycologia**, v.66, n.3, p.346-349, 1974.

PUHALLA, J. E. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. **Can. J. Bot.** v. 63, p.179-183, 1985.

REUVENI, R.; KRIKUN J. E.; SHANI N. The role of *Monosporascus eutypoides* in a collapse of melon plants in an arid area of Israel. **Phytopathology**, v.73, n.9, p.1223-1226, 1983.

SALES JUNIOR, R.; OLIVEIRA, O. F.; SENHOR, R. F.; ALVES, M. Z. *Monosporascus cannonballus* agente causal do colapso em plantas de melão no Rio Grande do Norte, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 5, p. 567, 2003.

SALES JUNIOR, R.; NASCIMENTO, I. J. B. DO; FREITAS L. DE S.; BELTRÁN, R.; ARMENGOL, J.; VICENT, A.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J. First Report of *Monosporascus cannonballus* on Melon in Brazil. **Plant Disease**, v. 88, n. 1, p. 84, 2004.

- SANTOS, A.A.; FREIRE, F. DAS C.O.; LIMA, J.A.A.; CARDOSO, J.E. Doenças do meloeiro em áreas irrigadas no Estado do Ceará. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2000. 11p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Boletim de Pesquisa, 35).
- SANTOS, F. J. DE S; LIMA, R. N.; CRSÓSTOMO, L.A.; SOUZA, F. Irrigação do melão: manejo a través do tanque classe “A”. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001. 7 p. (EMBRAPA. Circular Técnica,11).
- SARPELEH A. The role of *Monosporascus cannonballus* in melon collapse in Iran. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 3, p. 162–164, 2008.
- SENHOR, R.F., MICHEREFF, S.J., SALES JUNIOR, R. Declínio-de-Monosporascus. In: Del Ponte, E.M. (Ed.) Fitopatologia.net - herbário virtual. Departamento de Fitossanidade. Agronomia, UFRGS. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/agronomia/fitossan/herbariovirtual/ficha.php?id=211>. Acesso em: 26 de agosto de 2010.
- STANGHELLINI, M. E.; KIM, D. H.; RASMUSSEN, S. L. Ascospores of *Monosporascus cannonballus*: germination and distribution in cultivated and desert soils in Arizona. **Phytopathology**, v. 86, p. 509-514, 1996.
- STANGHELLINI, M. E.; KIM, D. H.; WAUGH, M. Microbe-mediated germination of ascospores of *Monosporascus cannonballus*. **Phytopathology**, v. 90, n. 3, p.243-247, 2000.
- STODDART, J. A.; TAYLOR, J. F. Genotypic diversity: Estimation and prediction in samples. **Genetics** v.118, p.705-711, 1988.
- SUQIN, H. E BIN, B. First report on *Monosporascus cannonballus* on melon in China Mainland. **Plant Protection**. v.36, p.116-119, 2010.
- TAVARES, S. C. C. H. (Ed.) Melão: fitossanidade. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. 87 p.(Frutas do Brasil, 25).
- UEMATSU, S.; HIROTA, K.; SHIRAISHI, T.; OOIZUMI, T.; SEKIYAMA, K.; ISHIKURA, H.; EDAGAWA Y. Monosporascus root rot of bottle gourd stock of watermelon caused by *Monosporascus cannonballus*. **Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.** v.20, p. 312-316, 1992.
- VIANA, F.M.P.; SANTOS, A. A.; SALES JÚNIOR, R.; CARDOSO, J.E.; FREIRE, F.DAS C.O. Monitoramento de Doenças na Produção Integrada do Meloeiro. Embrapa Agroindústria Tropical, 33p. 2002.
- WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v 15, p 395-420. 1951.
- ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, p. 176-183, 1994.
-

Capítulo II

Avaliação da estrutura genética de *Monosporascus cannonballus*
no principal pólo produtor de melão do Brasil

1 **AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA GENÉTICA DE**
2 ***MONOSPORASCUS CANNONBALLUS* NO PRINCIPAL PÓLO**
3 **PRODUTOR DE MELÃO DO BRASIL**

4
5 **C.S. Bezerra¹, K.C. Correia¹, M.P.S. Câmara¹, R. Sales Junior², J. Armengol³,**
6 **J.García-Jiménez³ and S.J. Michereff¹**

7
8 *¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, 52171-900*
9 *Recife, Pernambuco, Brasil*

10 *²Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Departamento de Ciências Vegetais,*
11 *59625-900 Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil*

12 *³Universitat Politècnica de Valencia, Instituto Agroforestal Mediterráneo, 46022*
13 *Valencia, Spain*

14 Titulo curto: Estrutura genética de *Monosporascus cannonballus*

15 Autor para correspondência: S.J. Michereff

16 Fax: +55 81 33206205

17 E-mail: sami@depa.ufrpe.br

18 **RESUMO**

19 O declínio das ramas do meloeiro causado pelo fungo *Monosporascus cannonballus*,
20 vem causando prejuízos nas áreas de cultivo de melão em todo o mundo. Para o
21 desenvolvimento de estratégias de manejo incluindo o melhoramento genético visando a
22 resistência é essencial conhecer a diversidade e estrutura genética da população do
23 patógeno. Os objetivos deste estudo foram estimar a diversidade genética de isolados de

24 *M. cannonballus*, descrever a estrutura genética e discutir as forças evolutivas que
25 atuam sobre a população deste patógeno. Os isolados foram coletados em sete áreas de
26 plantio comercial nos municípios de Mossoró no Rio Grande do Norte, Quixeré e Icapuí
27 no Ceará. Foi feita a extração do DNA genômico, seguida de uma reação ITS para a
28 identificação molecular dos isolados e uma reação ISSR para a análise genética da
29 população. As sete áreas coletadas apresentaram baixa distância genética entre si (G_{ST}
30 0,004-0,068), quando agrupadas em duas subpopulações CE e RN a diversidade
31 genética (G_{ST} 0,105) entre elas ainda foi baixa refletindo em um alto valor de fluxo
32 gênico ($Nm=31$) e a diversidade genética dentro das sub-populações ($H_S = 0,2277$)
33 representou 98% da diversidade genética total da população estudada ($H_T = 0,2314$). A
34 diversidade genotípica estimada foi 10% do máximo possível. A população apresentou
35 baixa diversidade genética e ampla distribuição de genótipos clonais.

36

37 *Palavras chave:* *Cucumis melo*, declínio dos ramos do meloeiro, diversidade
38 genética, seleção episódica.

39

40 **INTRODUÇÃO**

41

42 O Brasil ocupa a 12^a posição entre os países produtores de melão (*Cucumis melo*
43 L.) (FAO, 2011), porém destaca-se nas exportações, ocupando a 1^a posição em nível
44 mundial. Em 2008 foram exportadas aproximadamente 211.789 t da fruta fresca, sendo
45 a segunda fruta mais exportada pelo país, superada apenas pela uva (*Vitis* sp.) (IBRAF,
46 2008)

47 Nas principais regiões produtoras do mundo, o declínio dos ramos do meloeiro
48 causado pelo fungo *Monosporascus cannonballus* Pollack & Uecker (Ascomycota:

49 Sordariales) acarreta grandes perdas e limita o cultivo em muitas áreas (Martyn e Miller,
50 1996; Cohen *et al.*, 2000; Pivonia *et al.*, 2010; Armengol *et al.*, 2011). No Brasil, *M.*
51 *cannonballus* foi detectado pela primeira vez em 2002, em áreas de cultivo de melão
52 nos estados do Rio Grande do Norte e Ceará (Sales Junior et al. 2003, 2004). Nos
53 últimos anos, o declínio das ramas do meloeiro, tem se tornado especialmente
54 importante no nordeste do Brasil (Andrade, 2005).

55 No desenvolvimento de estratégias de manejo das doenças radiculares do
56 meloeiro, é essencial o conhecimento da variabilidade das populações dos patógenos. O
57 sucesso de programas de melhoramento visando a resistência depende do conhecimento
58 sobre a variabilidade do patógeno, motivo pelo qual esse aspecto deve ser investigado
59 antes da seleção de fontes de resistência no hospedeiro (Bruton, 1998).

60 A avaliação da diversidade genética é um componente importante das análises
61 de estrutura genética de populações de patógenos. Dentro da estrutura genética é útil
62 diferenciar entre dois tipos de diversidade genética a diversidade gênica e a diversidade
63 genotípica. A diversidade gênica refere-se ao número e frequência de alelos em um loco
64 individual na população. Enquanto que a diversidade genotípica corresponde ao número
65 de indivíduos geneticamente distintos na população (McDonald e Linde, 2002). A
66 estimativa da diversidade genotípica é uma função tanto do número de genótipos
67 observados na amostra (riqueza genotípica) quanto da igualdade da distribuição dos
68 genótipos dentro da amostra (Grünwald, 2003).

69 Entre os fatores que têm impacto sobre a estrutura genética de populações de
70 fungos estão o fluxo gênico, a deriva, o sistema de reprodução e a seleção (McDonald,
71 1997). Um caso particular de seleção a “seleção episódica” engloba qualquer
72 perturbação súbita do ambiente que possam conduzir a uma alteração significativa na
73 estrutura populacional de uma espécie. Tais alterações incluem transposição geográfica,

74 uma mudança na disponibilidade de substrato, a exposição a um novo hospedeiro ou um
75 novo vetor, as mudanças climáticas, poluição e estresse. Atualmente tais eventos podem
76 muitas vezes ser provocados pelo homem. Em algumas circunstâncias, a seleção
77 episódica pode resultar no surgimento de um clone altamente adaptado a partir de uma
78 população inicialmente heterogênea (Brasier, 1995). O papel da seleção episódica na
79 promoção da microevolução de fungos foi discutida em alguns trabalhos com
80 *Ophiostoma novo-ulmi* (Brasier e Buck, 2001) e *Discula destructiva* (Zhang e
81 Blackwell, 2002).

82 Os objetivos deste estudo foram descrever a estrutura genética da população de
83 *M. cannonballus* no principal pólo produtor de melão do Brazil, determinar quais forças
84 evolutivas são importantes na estrutura da população observada e estimar as relações
85 genéticas entre isolados de *M. cannonballus* de diferentes áreas de cultivo usando
86 marcadores Inter Simple Sequence Repeat-ISSR (Zietkiewicz et al, 1994).

87

88 MATERIAL E METODOS

89 **Isolados fúngicos.** Neste estudo foram utilizados 69 isolados de *M. cannonballus*,
90 obtidos junto à Coleção de Culturas de Fungos “Profª. Maria Menezes”, da
91 Universidade Federal Rural de Pernambuco, em Recife - PE. Os isolados foram
92 originalmente obtidos de plantas de meloeiro com sintomas de declínio e sinais do
93 patógeno, coletadas em plantios comerciais nos estados do Ceará (CE) e Rio Grande do
94 Norte (RN). A distância entre os plantios variou de 12 a 90 km.

95 **Extração de DNA.** Os isolados foram repicados para meio líquido BD (batata-
96 dextrose), mantidos sob agitação contínua em mesa agitadora por 14 dias. Após esse
97 período, o micélio foi filtrado em papel de filtro autoclavado, com o auxílio de bomba

98 de vácuo acoplada a kitasato. O micélio foi então congelado com nitrogênio líquido e
99 macerado em almofariz com um pistilo até formar um pó fino. Em seguida, procedeu-se
100 à extração de DNA genômico com o kit de extração da Quiagen® seguindo as
101 instruções do fabricante. A concentração dos DNAs extraídos foi estimada através de
102 eletroforese em gel de agarose 0,8% e TAE (Tris-borato 0,09 mM, EDTA 0,002 Mm,
103 pH 8,0) 1X por meio da comparação de massa de padrão comercial (Lambda DNA) de
104 concentração conhecida.

105 **Identificação molecular de isolados *Monosporascus cannonballus*.** Um fragmento da
106 região ITS foi amplificado usando os primers específicos A: 5'- GGT TTA GTG GCC
107 AGA AGC CAG CG-3' e D: 5'- GAG TAG CCT ACC CGG TAG CTA C-3' descritos
108 por Lovic *et al.* (1995) para *M. cannonballus*. As reações foram executadas em 25 µL
109 contendo tampão de PCR 1X, 2,5 mM MgCl₂, 200µM de cada dNTP, 0,4 µM de cada
110 primer, 1 U de *Taq polymerase* e 2 µL do DNA molde. As amplificações PCR foram
111 executadas em termociclador Eppendorf- Mastercycler Gradient. O programa consistiu
112 em um ciclo inicial de 5 minutos a 94°C, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C
113 por 1 minuto, anelamento a 58°C por 1 minuto e alongação a 72°C por 1 minuto. Uma
114 extensão final foi executada a 72°C por 7 minutos. Os produtos da reação PCR foram
115 visualizados em gel de agarose 1,3%. Um ladder de 100-bp foi usado como marcador de
116 peso molecular. DNA total de *Fusarium* foi usado como controle para a especificidade
117 do oligonucleotídeo iniciador e uma reação com todos os reagentes exceto o DNA como
118 controle negativo.

119 **Marcadores ISSR.** Para as análises dos 69 isolados foram utilizados 12
120 oligonucleotídeos iniciadores ISSR: GTG₅, GACA₄, (AC)₈G, (GA)₈C, (CT)₈G, (GA)₈A,
121 (GT)₈C, (AG)₈YT, (TG)₈RT, ACC₆, GAA₆, HBH(AG₇). As reações foram executadas
122 em volume total de 25 µL contendo tampão de PCR 10X, 2,5 mM de MgCl₂, 2 mM de

123 dNTP, 0.1 μ M do oligonucleotídeo iniciador, 0,6 unidades de Taq DNA polimerase, e
124 10 η g do DNA molde. Como controle negativo foi acrescentado uma amostra com
125 todos os reagentes, mas sem o DNA molde. As reações de PCR foram realizadas em
126 termociclador Eppendorf- Mastercycler Gradient, usando as seguintes condições de
127 ciclagem: 94°C por 5 minutos para desnaturação inicial do DNA, seguido por 40 ciclos
128 de desnaturação por 15 segundos a 94°C, anelamento por 45 segundos a temperatura
129 que variou de acordo com o primer de 50°C a 60,5°C e extensão a 72°C por 90
130 segundos. Estes ciclos foram seguidos por uma extensão final de 7 minutos a 72°C. Às
131 reações com volume de 25 μ l foram acrescentados 4 μ l de tampão de amostra (sacarose
132 4 g, azul de bromofenol 0,025 g) e, então, os produtos amplificados foram submetidos à
133 eletroforese horizontal, em gel de agarose (agarose 1,3%, tampão TAE 1X [Tris-borato
134 0,09 mM, EDTA 0,002 M, pH 8,0] a uma corrente elétrica de 100 V. Visualizados em
135 transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentado.

136 **Análise de dados.** Para a determinação da estrutura genética foram analisados 69
137 isolados de sete áreas de plantio comercial distribuídas entre o RN e CE. Os dados
138 obtidos nos géis de eletroforese foram transformados em dados binários – 1 para
139 presença de bandas e 0 para ausência de bandas. A análise de diversidade genética da
140 população foi realizada usando o programa PopGene (Population Genetic Analysis –
141 Version 1.32, University of Alberta) para executar a análise combinada dos dados
142 obtidos e gerar os valores de diversidade gênica (H), diversidade genética total (H_T),
143 diversidade genética intrapopulacional (H_S), diferenciação genética interpopulacional
144 (G_{ST}) e número de migrantes (N_m).

145 A análise de diversidade genotípica para cada população e para população total
146 difere em riqueza, igualdade e diversidade como descrito previamente (Grünwald, 2003)
147 e foi calculado com o índice de Hill (1973) N_1 e N_2 . $N_1 = e^{H'}$, onde H' refere-se ao

148 índice Shannon e Wiener (1949) $H' = \{-\sum_i [p_i \times \ln(p_i)]\}$, onde p_i é a frequência
149 observada do i th genótipo. $N1$ representa o número de genótipos comuns de forma
150 uniforme que podem produzir a mesma diversidade H' . $N2$ corresponde o índice de
151 diversidade genotípica presente em Stoddart e Taylor(1988): $G = 1/ \sum p_i^2$. $N1$ e G
152 medem quão eficazmente as concentrações populacionais proporcionais são distribuídas
153 entre os diferentes genótipos (Grünwald, 2003) G dá um peso maior ao número de
154 genótipos abundantes enquanto $N1$ dá um peso maior a genótipos raros. $N1$ geralmente
155 fica entre o número de genótipos observados (g) e o valor de G . Foi realizado um
156 bootstrapping usando 1.000 reamostragens com intervalo de confiança de 95% A riqueza
157 genotípica que expressa o número de patótipos esperados na amostra foi estimada
158 usando curvas de rarefação com base no tamanho da amostra da menor população, todas
159 as análises foram executadas usando o software R. O índice de equitabilidade, que
160 mede como os genótipos estão distribuídos na amostra, $E5$ foi calculado com a
161 fórmula $E5 = (G-1)/(N1-1)$ (Grünwald, 2003).

162 A análise foi realizada em três etapas: i) todos os 69 isolados representado a
163 população total foram avaliados segundo os critérios descritos acima, ii) as duas
164 subpopulações CE e RN foram analisadas separadamente comparadas para diversidade
165 genética e genotípica e iii) as sete áreas de cultivo foram analisadas quanto a identidade
166 e distância genética entre elas (C_i , C_q , C_a , R_n , R_s , R_c e R_d) onde C_i é representada
167 pelos isolados coletados na fazenda Agrícola Famosa, C_q - fazenda Delmonte, C_a -
168 fazenda Flamengo no Ceará, R_n - fazenda Norfruit, R_s - fazenda Santa Júlia, R_c -
169 fazenda Califórnia e R_d - fazenda Dinamarca situadas no Rio Grande do Norte.

170 Foi realizada uma avaliação da relação genética entre os isolados através de uma
171 análise de grupamento na qual foi construído um dendograma pelo método UPGMA

172 com base no coeficiente de similaridade de Dice, usando o programa NTSYS-pc versão
173 2.10.

174

175 **RESULTADOS**

176 **Identificação molecular dos isolados.** Todos os isolados testados foram identificados
177 como *M. cannonballus* a partir do fragmento de DNA amplificado por
178 oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gênero *Monosporascus*. O isolado de
179 *Fusarium* sp. não gerou nenhum fragmento de DNA (figura 1).

180 **Análise de agrupamento.** Dos 12 oligonucleotídeos iniciadores testados apenas dois
181 HBH(AG₇) e GTG₅ produziram polimorfismo. A similaridade genética entre os isolados
182 de *M. cannonballus* variou de 0,42 a 1,00 (figura 2). Com similaridade genética máxima
183 (1,00) foram formados 9 grupos com número de isolados que variou entre 2 e 18.
184 Constatou-se alta similaridade genética entre os isolados. Com base no dendograma não
185 houve formação de grupos com isolados da mesma área de plantio.

186 **Diversidade genética dentro da população.** A diversidade genética da população total
187 (H_T) foi de 0,231, com a estimativa da diversidade genética dentro das populações (H_S
188 = 0,227) muito próxima ao valor de H_T .

189 A subpopulação CE apresentou uma maior diversidade genética ($H_T=0,266$,
190 $H_S=0,253$, $H=0,269$) do que a RN ($H_T=0,198$, $H_S=0,173$, $H=0,197$). A diversidade
191 genética foi baixa em todas as sete áreas e variou de 0,093 a 0,280 (tabela 1) com média
192 de 0,207. A menor diversidade genética foi a da área Rc.

193 Vinte e quatro genótipos foram identificados entre os 69 isolados da população
194 Brasileira. Assim a diversidade genotípica da população total foi 34% do máximo

195 possível ($G=n$, todos os isolados tem um fingerprint de DNA diferente). Dos 24
196 genótipos encontrados 16 genótipos únicos (observados apenas uma vez na população
197 total), e 9 apareceram com diferentes frequências, genótipo mais freqüente foi
198 observado 18 vezes. Uma avaliação do padrão de distribuição espacial dos genótipos
199 freqüentes revelou uma ampla distribuição entre as subpopulações. A diversidade
200 genotípica das áreas foi de 3 a 7,142. A riqueza genotípica estimada pela rarefação com
201 menor tamanho de amostra ($n = 8$) foi baixa na área Rc e alta para Cd. A equitabilidade
202 genotípica foi alta em todas as áreas com valores entre 0,79 e 1, área Cd apresentou a
203 equitabilidade máxima 1 (quando cada genótipo ocorre na mesma freqüência)
204 diferenças significativas na diversidade genotípica não foram detectadas entre as áreas
205 de acordo com os intervalos de confiança com base no erro padrão de cada estimativa.
206 Apenas as áreas Ci e Rc apresentaram diferença significativa de diversidade.

207 **Diversidade genética entre as subpopulações.** A variação genética foi estimada entre
208 a população total, as duas subpopulações de *M. cannonballus* e as setes áreas usando o
209 parâmetro G_{ST} . O G_{ST} encontrado para a população total foi baixo ($G_{ST}=0,015$),
210 indicando pouca diferenciação genética entre as subpopulações de CE e RN. Na
211 subpopulação do CE ($G_{ST}=0,051$) a diferença genética foi mais baixa que na
212 subpopulação do RN ($G_{ST}=0,125$). Os valores de G_{ST} foram usados para calcular o
213 número de migrantes (N_m) que devem ser trocados entre as subpopulações a cada
214 geração para manter o nível de similaridade genética observada. Para a população total
215 o N_m foi igual a 31, para as subpopulações RN e CE foram 3,48 e 9,23
216 respectivamente.

217 O valor mais baixo de G_{ST} foi de 0,004 entre as áreas Rn e Cd, o maior valor foi
218 de 0,068 entre Rd com Rc e Ci (tabela 2). O valor G_{ST} para as duas áreas mais distantes
219 geograficamente Cq e Rn foi 0,017. Níveis baixos de variação genética populacional

220 foram observados entre todas as áreas de produção amostradas. A avaliação da
221 identidade genética de Nei para os pares de subpopulações sugere a mesma baixa
222 variação populacional que o G_{ST} de Wright. Estes valores N_m variaram de 6,8 a 124
223 entre os pares de subpopulações.

224 DISCUSSÃO

225 O primeiro passo em estudos de genética de populações de fungos é definir sua
226 estrutura genética porque esta reflete sua história evolutiva e seu potencial para evoluir
227 (McDonald, 1997). Estrutura genética se refere à quantidade e distribuição de variação
228 genética dentro e entre populações (McDonald e Linde, 2002). O valor estimado da
229 heterozigosidade que indica o nível de diversidade genética dentro das sub-populações
230 ($H_S = 0,2277$) representa 98% da diversidade genética total da população estudada ($H_T =$
231 $0,2314$) a heterozigosidade média das áreas foi de $H=0,207$. Um estudo da variação
232 genética de fungos com estratégias reprodutivas sexual *Ceratocystis eucalypti* Yuan &
233 Kile ($H= 0,249$) e assexual *Chalara australis* J. Walker & Kile ($H= 0,002$) (Harrington
234 *et al.*, 1998) demonstra que os valores encontrados para *M. Cannonballus* estão de
235 acordo com os valores de diversidade genética de fungos que se reproduzem
236 sexuadamente. O valor de diversidade encontrado representa uma diversidade baixa a
237 moderada como encontrado para *Mycosphaerella musicola* Leach $H = 0,142 - 0,369$
238 (Hayden *et al.*, 2005) e *Ceratocystis resinifera* Harrington & Wingfield $H_T = 0,275$
239 (Morin *et al.*, 2004) mas inferior aos valores encontrados para outros ascomicetos como
240 *Phaeosphaeria nodorum* (E. Müller) Hedjaroude $H_T 0,51$ (Keller *et al.*, 1997) e mesmo
241 para alguns fungos com reprodução assexual como *Rhynchosporium secalis* (Oudem.)
242 Davis $H = 0,505$ a $0,548$ (McDonald *et al.*, 1999) para os quais este é um indício de que
243 a reprodução sexual ocorre na natureza.

244 A estimativa da diversidade genética distribuída entre as subpopulações foi muito
245 baixa ($G_{ST} = 0,0156$). Esse resultado é consistente com a hipótese de alguns estudos
246 com *P. nodorum* (0,03) no qual valores baixos de G_{ST} revelaram que houve uma
247 composição genética quase idêntica entre o inóculo primário das áreas amostradas
248 (Keller *et al.*, 1997) e *R. secalis* nos quais os baixos índices de diversidade genética
249 interpopulacional também concordam com uma migração a partir de um centro de
250 origem comum seguida de uma especialização recente ou de um contínuo fluxo gênico
251 entre as subpopulações (Goodwin *et al.*, 1993), devido a ausência de barreiras ao fluxo
252 gênico. Outra hipótese seria a de que o fluxo gênico entre as subpopulações ocorre para
253 homogeneizar as frequências alélicas (Slatkin, 1987) como encontrada para uma
254 população de *Tapesia acuformis* (Boerema *et al.*) Crous em Washington, onde apesar da
255 alta diversidade genética encontrada, não havia diferença significativa entre as
256 subpopulações analisadas (Douhan *et al.*, 2003).

257 A estimativa de fluxo gênico ($Nm=31$) entre as subpopulações com base nos cálculos
258 G_{ST} em cada área amostrada indica que o fluxo gênico é um fator importante na
259 estrutura da população destes estados, como encontrado para *Fusarium*
260 *pseudograminearum* O'Donnell & Aoki (Bentley *et al.*, 2008). Segundo Wright (1951),
261 quando $Nm \geq 1,0$, ou seja, quando um ou mais indivíduos migram por geração, os
262 efeitos da migração são suficientes para contrapor os efeitos da deriva, e portanto o
263 número de migrantes por geração impede a divergência entre populações. Em
264 populações de fungos fitopatogênicos a extensão da migração ou do fluxo gênico pode
265 não ser determinado precisamente, porque estas populações provavelmente não estão
266 em equilíbrio evolucionário (Milgrom, 1996), que é um dos pressupostos teóricos para
267 determinar o fluxo gênico de estatísticas F. Fungos fitopatogênicos são susceptíveis a
268 eventos de quebra na estrutura da população original devido a práticas agrícolas que

269 tornam difícil distinguir o fluxo gênico atual do fluxo gênico passado, porque não houve
270 tempo suficiente para os efeitos da deriva e migração para alcançar o equilíbrio (Slatkin,
271 1987). Assim, melhor do que refletir exatamente o número de migrantes que são
272 trocados a cada geração, a estimativa de Nm fornece uma indicação do grau relativo de
273 fluxo gênico que foi trocado entre as populações durante o tempo (Keller *et al.*, 1997).
274 Neste caso, a média de Nm encontrado entre as subpopulações foi de 31, isto sugere que
275 no passado existiram poucas restrições ao fluxo gênico entre essas subpopulações.
276 Valores altos de Nm foram encontrados para outras populações de fungos como *Botrytis*
277 *cinerea* (Ma e Michailides, 2005) e *P. nodorum* (Keller *et al.*, 1997) ambos com
278 dispersão aérea de esporos. O inóculo primário de *M. Cannonballus* são os ascóporos
279 que ficam no solo (Stanghellini *et al.*, 1996, 2000) e a doença é monocíclica assim a
280 dispersão ocorre de forma mais lenta esta característica do patógeno aliada ao alto valor
281 de Nm sugere que houve um longo período de dispersão e adaptação para que o
282 patógeno alcançasse áreas de até 90 km de distância. Alternativamente o fluxo gênico
283 pode ter sido favorecido pela dispersão devido a atividades agrícolas, entretanto, faltam
284 estudos relacionando a dispersão de ascóporos com atividades humanas.

285 A diversidade genotípica entre as subpopulações não é significativa, como mostrado
286 pelos valores dos intervalos de confiança de Stoddart e Taylor (G) que se sobrepõem
287 (Grünwald, 2003). Indicando que a mesma população de *M. Cannonballus* deu origem a
288 todas as subpopulações estudadas. A ocorrência de poucos genótipos com ampla
289 distribuição em *M. cannonballus* é semelhante a encontrada em um estudo com *Discula*
290 *destructiva* Redlin onde esta característica aliada a baixa diversidade genotípica revelou
291 que a população deste fungo estava sobre intensa pressão de seleção e sobre o efeito de
292 uma seleção episódica (Zhang e Blackwell, 2002).

293 Populações com baixa diversidade gênica podem ter sido afetadas por grande
294 redução no tamanho da população, o efeito gargalo de garrafa (bottlenecks) ou pelo
295 efeito do fundador que eliminou muitos alelos (McDonald, 1997), caso o número de
296 indivíduos se reproduzindo continue pequeno ocorre a deriva gênica e a diversidade
297 continuará baixa. Os valores de N_m e de G_{ST} e os dados de densidades de esporos no
298 solo que apontam uma população com grande número de indivíduos (Stanghellini *et*
299 *al.*, 1996; Medeiros *et al.*, 2006), favorecem o fluxo gênico e refutam a hipótese de
300 deriva.

301 O desenvolvimento da agricultura em períodos relativamente recentes provavelmente
302 alterou a pressão de seleção em solos cultivados suficientemente para selecionar
303 patógenos mais agressivos e talvez novos patógenos (Brasier, 1995). A população de *M.*
304 *cannonballus* no nordeste do Brasil apresenta um valor moderado de diversidade
305 gênica, que pode ser um reflexo da pressão de seleção imposta pelo plantio intensivo na
306 região onde o fungo ocorre naturalmente. A seleção é a principal força evolutiva que
307 direciona as mudanças nas frequências de alelos (McDonald, 2002), assim parte da
308 população original provavelmente teve seu desenvolvimento favorecido pelas condições
309 do ambiente alterado, como a introdução maciça de hospedeiros. Para elucidar esta
310 hipótese são necessários estudos comparativos da população patogênica com a
311 população encontrada em solos não cultivados.

312 Os resultados deste estudo fornecem uma melhor compreensão da biologia de *M.*
313 *cannonballus* no nordeste do Brasil. Foi mostrado um nível baixo de diversidade
314 genética mas ainda compatível com a reprodução sexuada. A maior parte da variação
315 genética está distribuída dentro das subpopulações com pouca diferenciação entre elas.
316 O fluxo gênico exerceu importante papel na história evolutiva passada deste fungo e
317 atualmente a seleção episódica é provavelmente a principal força evolutiva atuando

318 sobre esta população e sua estrutura genética. Os isolados são também intimamente
319 relacionados com pouca diferença entre eles e com distribuição em todas as áreas
320 amostradas.

321 REFERÊNCIAS

322

323 Andrade, D.E.G.T. de; Michereff, S.J.; Biondi, C.M.; Nascimento, C.W.A.; Sales Jr.,
324 R., 2005. Frequência de fungos associados ao colapso do meloeiro e relação com
325 características físicas, químicas e microbiológicas dos solos. *Summa Phytopathologica*,
326 **31**:327-333.

327 Armengol J., Alaniz S., Vicent A., Beltrán R., Abad-Campos P., Pérez-Sierra A.,
328 García-Jiménez J., Ben Salem I., Souli M., Boughalleb, N. 2011. Effect of dsRNA on
329 growth rate and reproductive potential of *Monosporascus cannonballus*. *Fungal Biology*
330 DOI:10.1016/j.funbio.2010.12.007.

331 Bentley, A. R., Leslie, J. F., Liew, E. C. Y., Burgess, L. W., and Summerell, B. A.
332 2008. Genetic structure of *Fusarium pseudograminearum* populations from the
333 Australian grain belt. *Phytopathology* **98**:250-255.

334 Brasier, C. M. 1995. Episodic selection as a force in fungal microevolution, with special
335 reference to clonal speciation and hybrid introgression. *Can. J. Bot.* **73**(S1): 1213–1221

336 Brasier, C. M. e K. W. Buck. 2001. Rapid evolutionary changes in a globally invading
337 fungal pathogen (Dutch elm disease). *Biological Invasions* **3**: 223-233, 2001.

338 Bruton, B.D., 1998. Soilborne diseases in cucurbitaceae: pathogen virulence and host
339 resistance. In: McCreight J. (ed.). Cucurbitaceae'98, pp.143-166. ASHS Press,
340 Alexandria, USA.

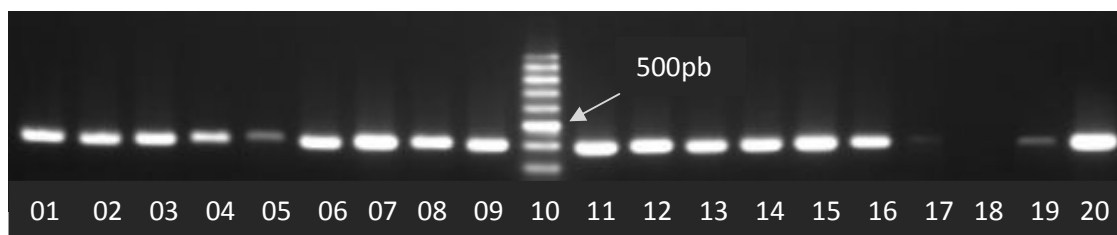
- 341 Cohen, R., Pivonia S., Burger Y., Edelstein M., Gamliel A., Katan J., 2000. Toward
342 integrated management of *Monosporascus* wilt of melons in Israel. *Plant Disease* **84**:
343 496-505.
- 344 Douhan, G. W., Murray, T. D., e Dyer, P. S. 2003. Population genetic structure of
345 *Tapesia acuformis* in Washington State. *Phytopathology* **93**:650-656.
- 346 FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION). FAOSTAT. Homepage:
347 <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>. Acesso em 02 de fevereiro de 2010.
- 348 Goodwin, S. B., Saghai Maroof, M. A., Allard, R. W., e Webster, R. K. 1993. Isozyme
349 variation within and among populations of *Rhynchosporium secalis* in Europe,
350 Australia, and the United States. *Mycol. Res.* **97**:49-58.
- 351 Grünwald N.J., Goodwin S.B., Milgroom M.G., Fry W.E., 2003. Analysis of genotypic
352 diversity data for populations of microorganisms. *Phytopathology* **93**: 738-746.
- 353 Harrington, T. C., Steimel, J., e Kile, G. 1998. Genetic variation in three *Ceratocystis*
354 species with outcrossing, selfing and asexual reproductive strategies. *Eur. J. For.*
355 *Pathol.* **28**:217-226.
- 356 Hayden, H. L., Carlier, J., e Aitken, E. A. B. 2005. The genetic structure of Australian
357 populations of *Mycosphaerella musicola* suggests restricted gene flow at the
358 continental scale. *Phytopathology* **95**:489-498.
- 359 Hill M.O., 1973. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences.
360 *Ecology* **54**: 427-432.
- 361 IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), 2010. Sidra: sistema IBGE de
362 recuperação automática. site: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric>.
- 363 IBRAF (INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS). Estatísticas. São Paulo: Instituto
364 Brasileiro de Frutas, 2010. Homepage:

- 365 http://www.ibraf.org.br/estatisticas/Exportação/Comparativo_das_Exportações_Brasilei
366 [ras_e_Frutas_frescas_Jan_Out_2008.pdf](#)
- 367 Lovic, B. R., Martyn, R. D. and Miller, M. E. 1995. Sequence analysis of the ITS
368 regions of the rDNA in *Monosporascus* spp. to evaluate its potential for PCR-mediated
369 detection. *Phytopathology* **85**:665-661.
- 370 Keller, S. M., Wolfe, M. S., McDermott, J. M., e McDonald, B. A. 1997. High genetic
371 similarity among populations of *Phaeosphaeria nodorum* across wheat cultivars and
372 regions in Switzerland. *Phytopathology* **87**:1134-1139.
- 373 Ma, Z., e Michailides, T. J. 2005. Genetic structure of *Botrytis cinerea* populations from
374 different host plants in California. *Plant Disease*. **89**:1083-1089.
- 375 Martyn R.D., Miller M.E.,1996. *Monosporascus* root rot and vine decline: an emerging
376 disease of melons worldwide. *Plant Disease* **80**: 716-724.
- 377 McDonald B.A., Linde C., 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential,
378 and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **40**: 349-379.
- 379 McDonald, B.A.; Linde, C. 2002, The population genetics of plant pathogens and
380 breeding strategies for durable resistance, *Euphytica*, **124**:163-180.
- 381 McDonald, B.A.; Zhan, J.; Burdon, J.J. 1999, Genetic structure of *Rhynchosporium*
382 *secalis* in Australia. *Phytopathology*, **89**:639-645.
- 383 McDonald, B.A., 1997. The population genetics of fungi: tools and techniques.
384 *Phytopathology* **87**: 448–453.
- 385 Medeiros, E. V.; Sales Jr., R.; Michereff, S.J.; Barbosa, M.R. 2006.Quantificação de
386 ascósporos de *Monosporascus cannonballus* em solos não cultivados de Caatinga e em

- 387 áreas de cultivo de melão do Rio Grande do Norte e Ceará. *Fitopatologia Brasileira*,
388 **31**:500-504,
- 389 Milgroom, M. G. 1996. Recombination and the multilocus structure of fungal
390 populations. *Annu. Rev. Phytopathol.* **34**:457-477.
- 391 Morin, C., Breuil, C., e Bernier, L. 2004. Genetic variability and structure of Canadian
392 populations of the sapstain fungus *Ceratocystis resinifera*. *Phytopathology* **94**:1323-
393 1330.
- 394 Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the*
395 *National Academy of Science of the United States of America*, **70**:3321-3323.
- 396 Pivonia S., Gerstl Z., Maduel A., Levita R., Cohen R., 2010. Management of
397 *Monosporascus* sudden wilt of melon by soil application of fungicides. *European*
398 *Journal of Plant Pathology* **128**: 201-209.
- 399 Sales Jr. R., Nascimento I.J.B., Freitas L.S., Beltrán R, Armengol., J., Vicent A.,
400 García-Jiménez J., 2004. First Report of *Monosporascus cannonballus* on melon in
401 Brazil. *Plant Disease* **88**: 84.
- 402 Sales Jr. R. et al. 2003. *Monosporascus cannonballus* agente causal do colapso em
403 plantas de melão no Rio Grande do Norte, Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, **28**:567
- 404 Shannon C.E., Weaver W., 1949. The Mathematical Theory of Communication.
405 University of Illinois Press, Urbana, USA.
- 406 Slatkin, M. 1987. Gene flow and geographic structure of natural populations. *Science*
407 **236**:787-792.

- 408 Stanghellini, M. E., Kim, D. H., e Rasmussen, S. L. 1996. Ascospores of
409 *Monosporascus cannonballus*: Germination and distribution in cultivated and desert
410 soils in Arizona. *Phytopathology* **86**:509-514.
- 411 Stanghellini, M. E., Kim, D. H., e Waugh, M. 2000. Microbe-mediated germination of
412 ascospores of *Monosporascus cannonballus*. *Phytopathology* **90**:243-247.
- 413 Stoddart, J.A., Taylor, J.F., 1988. Genotypic diversity: estimation and prediction in
414 samples. *Genetics* **118**: 705-711.
- 415 Wright, S. The genetical structure of populations. 1951. *Annals of Eugenics*, **15**:395-
416 420.
- 417 Zhang, N., e Blackwell, M. 2002. Population structure of dogwood anthracnose fungus.
418 *Phytopathology* **92**:1276-1283.
- 419 Zietkiewicz, E.; Rafalski, A.; Labuda, D. Genome fingerprinting by simple sequence
420 repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, **20**: 176-
421 183. 1994
- 422

423



424

425 **Fig. 1.** Identificação de *Monosporascus cannonballus* por fragmento específico da
426 região ITS de 430pb. 10- marcador de 100pb, 18-*Fusarium*; 1-9, 11-17, 19 e 20 *M.*
427 *cannonballus*

428

437 **Tabela1:** Parâmetros de diversidade genética para a população de *Monosporascus*
 438 *cannonballus* em sete áreas de cultivo comercial de meloeiro dentro de duas
 439 subpopulações nos estados do Rio Grande do Norte e Ceará.

Sub população	Tamanho da amostra (n)	Diversidade gênica (H^a)	Genótipos observados (g_{obs})	Riqueza genotípica $E(g_n)^b$	Diversidade genotípica (G^c)	Equitabilidade genotípica (E_s)
Ci	11	0,261	9	6,8	7,117 (4,84-9,38) ^d	0,855
Cd	8	0,218	8	8	8 (6,16-9,83)	1
Cq	10	0,280	8	6,7	7,142 (5,24-9,03)	0,933
Rn	13	0,194	8	5,6	5,451 (3,44-7,46)	0,796
Rs	10	0,173	6	5,2	4,166 (2,5-5,83)	0,791
Rc	9	0,093	4	3,7	3 (1,88-4,11)	0,844
Rd	8	0,232	6	6	4,571 (2,82-6,31)	0,830
TOTAL	69	0,231	24	24	7,869 (5,3-10,4)	0,576

440 ^a Diversidade genética de Nei(1973)

441 ^b $E(g_n)$ é o número de genótipos esperados ou estimativa da riqueza para amostras de menor tamanho.

442 ^c Diversidade genotípica de Stoddart e Taylor

443 ^d Números entre parênteses indicam os intervalos de confiança calculados por uma abordagem
 444 bootstrapping para 1000 repetições.

445

446 **Tabela 2 :** Estimativa da identidade e distância genética de isolados de *Monosporascus*
 447 *cannonballus* entre sete áreas de cultivo comercial de meloeiro nos estados do Rio
 448 Grande do Norte e Ceará.

Subpopulação	Ci	Cd	Rc	Rd	Rn	Rs	Cq
Ci	-	0,975	0,973	0,934	0,976	0,961	0,969
Cd	0,025	-	0,958	0,941	0,995	0,978	0,974
Rc	0,027	0,041	-	0,934	0,973	0,975	0,959
Rd	0,068	0,060	0,068	-	0,941	0,959	0,982
Rn	0,024	0,004	0,027	0,060	-	0,980	0,974
Rs	0,039	0,022	0,025	0,041	0,019	-	0,979
Cq	0,031	0,026	0,041	0,017	0,026	0,021	-

449 Identidade genética de Nei (acima da diagonal) e distancia genética (abaixo da diagonal).

450 O valor máximo de 1,0 ocorre quando os mesmos alelos estão nas mesmas freqüências nas populações

451

Capítulo III

Analysis of population structure of *Monosporascus cannonballus*
in Northeastern Brazil based on mycelial incompatibility groups

1 **ANALYSIS OF POPULATION STRUCTURE OF**
2 ***MONOSPORASCUS CANNONBALLUS* IN NORTHEASTERN**
3 **BRAZIL BASED ON MYCELIAL INCOMPATIBILITY GROUPS**

4
5 **C.S. Bezerra¹, K.C. Correia¹, M.P.S. Câmara¹, R. Sales Junior², J. Armengol³,**
6 **J.García-Jiménez³ and S.J. Michereff¹**

7
8 ¹*Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, 52171-900 Recife,*
9 *Pernambuco, Brasil*

10 ²*Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Departamento de Ciências Vegetais, 59625-900*
11 *Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil*

12 ³*Universitat Politècnica de Valencia, Instituto Agroforestal Mediterráneo, 46022 Valencia,*
13 *Spain*

14
15 Running Title: Population structure of *Monosporascus cannonballus*

16 Corresponding author: S.J. Michereff

17 Fax: +55 81 33206205

18 E-mail: sami@depa.ufrpe.br

19

20 SUMMARY

21 Vine decline of melons caused by *Monosporascus cannonballus* is a destructive disease
22 worldwide. To implement a meaningful management of plantation diseases, it is
23 important to have an understanding of the population diversity of the pathogen. The
24 aims of this study were assay de genetic structure of *M. cannonballus* isolates from
25 Brazil and compare this isolates with isolates from Spain. The population genetic
26 structure of *M. cannonballus* was examined by applying mycelial compatibility tests.
27 Based on the frequencies of MCGs were estimated the genotype diversity indexes, as
28 well as its richness and evenness components. All analyses were performed by R
29 software. The isolate were from 7 plantations in Mossoró in state of Rio Grande do
30 Norte, Quixeré and Icapuí in state of Ceará. The genotypic diversity estimated was 10%
31 of the maximum possible. Four MC groups were found amongst 58 isolates from Brazil,
32 whereas in Spain 6 MC were found in only 11 isolates. None Brazilian isolates was
33 compatible with Spanish isolates. Genetic variability was low and similar in the
34 subpopulations (Icapuí, Quixeré and Mossoró) from Brazil. Based on these data, the
35 Spanish population was more diverse than the Brazilian population. No significant
36 difference in diversity exists between Icapui, Quixere and Mossoró subpopulations. But
37 significant difference in diversity exists between the Brazilian and Spanish populations
38 of *M. cannonballus*.

39

40 *Key words:* *Cucumis melo*, *Monosporascus* root rot and vine decline, soilborne
41 disease, genetic diversity.

42

43 INTRODUCTION

44

45 *Monosporascus cannonballus* Pollack & Uecker (Ascomycota: Sordariales) is a
46 destructive root pathogen causing vine decline of muskmelon (*Cucumis melo* L.) and
47 watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) in the arid, semi-arid and
48 subtropical regions worldwide (Martyn and Miller, 1996; Cohen *et al.*, 2000; Pivonia *et*
49 *al.*, 2010; Armengol *et al.*, 2011). Disease symptoms include yellowing and death of the
50 crown leaves and a gradual decline of the vine as the plant approaches maturity. Root
51 systems become necrotic, with numerous discrete lesions and lack most of the
52 secondary and tertiary feeder roots. *M. cannonballus* produces ascospores in perithecia
53 formed on affected roots at the end of the cropping season (Martyn and Miller, 1996).

54 In 2002, *M. cannonballus* was first detected in Northeastern Brazil causing root rot
55 and vine decline of muskmelon plants (Sales Jr. *et al.*, 2004). Currently, the disease is
56 widespread in this region (Silva *et al.*, 2010), which accounts for 85% of muskmelon
57 Brazilian production and covers approximately 14,900 ha. The main producing areas are
58 located in the states of Ceará (CE) with 4,880 ha and production of 124,157 t, and Rio
59 Grande do Norte (RN) with 6,806 ha and production of 201,259 t (IBGE, 2010).

60 The success of muskmelon breeding programs for resistance to soilborne diseases
61 depends on the strength of knowledge about the pathogen variability, which is why this
62 aspect should be investigated before selecting sources of resistance in the host (Bruton,
63 1998). Understanding the genetic diversity of the pathogen and spatiotemporal changes
64 in population structure is vital to the success of any breeding program (McDonald and
65 Linde, 2002).

66 The genetic structure of a pathogen population can be assessed by morphological,
67 molecular, selective, or neutral markers (Burdon, 1993). Therefore, a selectively neutral
68 marker, which does not affect fitness components, should be used to better reflect
69 variation in the population. Mycelial compatibility can be considered a neutral marker

70 that provides information for the analysis of genetic diversity of the fungal population
71 (Leslie, 1993).

72 Mycelial compatibility is a common phenomenon in filamentous fungi, including
73 ascomycetes, which has been a useful tool in studies to identify intraspecific diversity
74 within field populations of fungal plant pathogens (Kohn *et al.*, 1991; Leslie, 1993;
75 Cilliers *et al.*, 2000; Kauserud, 2004; Kull *et al.*, 2004; Wu and Subbarao, 2006;
76 Armengol *et al.*, 2010; Ikeda *et al.*, 2011). A subset of vegetative compatibility
77 reactions includes events that require hyphal fusion and heterokaryon formation,
78 whereby genetically different nuclei coexist in a common cytoplasm. Nonself
79 recognition leading to rejection of heterokaryon formation is referred as to
80 ‘heterokaryon incompatibility’, which is a genetically regulated process and most often
81 results in death of the hyphal fusion cell (Glass *et al.*, 2000; Glass and Kaneko, 2003).

82 In *M. cannonballus* there are only two studies on mycelial incompatibility, one
83 conducted in the USA and another in Italy. The first study (Alcantara, 1998) used fifty-
84 four isolates from USA (Arizona, California and Texas), Israel and Spain, and assessed
85 the formation of barriers between isolates on potato dextrose agar (PDA) media.
86 Thirteen mycelial compatibility groups (MCGs) were identified and each of the isolates
87 from Israel and Spain were incompatible with all other isolates. The largest group
88 consisted of 32 isolates from Arizona, California and Texas. All California isolates
89 belong to this group as well as most of the isolates from Arizona. There were five
90 MCGs identified in a local field in Arizona. The Italian study (Chilosi *et al.*, 2008) used
91 fourteen isolates from Italy, Spain and USA, and the vegetative compatibility was
92 determined by *nit* mutants. Given the self-incompatibility of these isolates it was
93 impossible to ascertain vegetative compatibility groups and consequently genetic
94 relatedness cannot be studied.

95 Genotypic diversity is one of several components estimated during analysis of the
96 genetic structure of populations of microorganisms. Diversity is composed of two
97 aspects: richness and evenness. Richness is the number of genotypes contained in a
98 population; intuitively, diversity increases with increasing richness. Evenness measures
99 how genotypes are distributed within a population. If a small number of genotypes
100 dominate the population, evenness is low and, intuitively, so is diversity. If each
101 genotype occurs at an equal frequency then evenness (and diversity) is maximal
102 (Grünwald *et al.*, 2003).

103 Although the importance of *Monosporascus* vine decline in Northeastern Brazil has
104 increased, there is no information about the genetic variation in populations of *M.*
105 *cannonbalus* in this region. Therefore, this research was conducted to determine the
106 population structure of *M. cannonbalus* associated with muskmelon root rot and vine
107 decline in Northeastern Brazil based in MCGs and to compare this with isolates of the
108 fungus collected in Spain.

109

110 MATERIALS AND METHODS

111

112 **Fungal isolates.** Sixty-nine isolates of *M. cannonballus* were included in this study, 58
113 from Brazil and 11 from Spain (Table 1). All Brazilian isolates were obtained from
114 diseased muskmelon plants collected in 2009 in seven growing areas of the Northeast
115 region, located in agricultural poles of Icapuí and Quixeré (Ceará state), and Mossoró
116 (Rio Grande do Norte state). The other isolates were obtained from diseased
117 muskmelons, watermelons and cucurbit rootstock (*Cucurbita maxima* x *C. moschata*),
118 and were provided by the Fungal Culture Collection of the Instituto Agroforestal
119 Mediterráneo (IAM-UPV, Valencia, Spain). Stock cultures were maintained on V8 agar

120 [20 ml of V8 juice (Campbell Soup Company, Toronto, ON, Canada), 3 g of CaCO₃, 20
121 g of agar, and 1000 ml of H₂O] slants at 25 °C in darkness. All isolates were deposited
122 in the Culture Collection of Phytopathogenic Fungi “Prof. Maria Menezes” (CMM) of
123 the Universidade Federal Rural de Pernambuco (Recife, Brazil).

124

125 **Mycelial compatibility grouping.** Isolates of *M. cannonballus* were transferred to PDA
126 media (Acumedia Co., Lansing, EUA) plates and grow at 25 °C in the dark for 10 days.
127 Mycelial incompatibility among isolates was determined by pairing of the cultures in
128 combinations as described by Burges *et al.* (2009). Isolates were initially compared in
129 every possible combination for each location. Agar plugs (6-mm-diameter) with
130 mycelia from the colony margin of six isolates were placed 2 cm apart in a
131 predetermined order using a template on PDA in a 9-cm-diameter Petri dish (Figure 1).
132 Cultures were incubated at 30 °C in the dark for three weeks. Cultures were examined at
133 15 and 21 days to detect zones of mycelial interaction (barrages) characteristic of
134 vegetative incompatibility reactions. Those isolates that did not form a barrage were
135 considered compatible. After the initial comparisons, representative MCGs from each
136 population were compared in all possible combinations. All pairings were conducted at
137 least twice.

138

139 **Analysis of genetic structure based on MCGs.** Isolates within each population of *M.*
140 *cannonballus* belonging to the same MCG were treated as individual phenotypes, since
141 the genetic background was unknown. Each MGC represent a genotype. Genotype
142 diversity analysis for each population distinguished total diversity, richness and
143 evenness. The indices of genotypic total diversity were calculated as Hill’s index N_1
144 (Hill, 1973) and Stoddart and Taylor’s index G (Stoddart and Taylor, 1988), as

145 recommended by Grünwald *et al.* (2003). The index $N_1 = e^{H'}$, where H' refers to
146 Shannon-Wiener's index $H' = \{-\sum[p_i \times \ln(p_i)]\}$ (Shannon and Weaver, 1949), in which
147 p_i is the frequency of the i th genotype. N_1 represents the number of equally common
148 genotypes which would produce the same diversity. The index $G = 1/\sum p_i^2$. N_1 and
149 measure how effectively proportional abundances are distributed among the different
150 genotypes. The two indices differ in that N_1 weights rarer genotypes more strongly,
151 whereas G weights the number of abundant genotypes more strongly (Grünwald *et al.*,
152 2003). Differences in the N_1 and G among populations were tested based on a 90%
153 confidence interval constructed after bootstrapping conducted with 1,000 resamples
154 using the accelerated bootstrap method (Grünwald *et al.*, 2003). To estimate the
155 genotypic richness was used the rarefaction method (Grünwald *et al.*, 2003). This
156 method assumes that the number of expected genotypes $E(g_n)$ in a random sample of n
157 individuals out of a total sample of N individuals, where n_i corresponds to the number of
158 individuals per genotype. $E(g_n)$ expectation is based on the sum of the probabilities that
159 each genotype will be included in the sample. To contrast richness between different
160 agricultural poles, the expected number of MCGs $E(g_n)$ was estimated for samples of
161 sizes $N = 10$, the smallest sample size of the population. The rarefaction estimates were
162 obtained after compiling the algorithm <Rarefac.c> (Grünwald *et al.*, 2003). To
163 estimate evenness, was calculated the Ludwig and Reynolds's index E_5 (Ludwig and
164 Reynolds, 1988), which is the ratio of the number of abundant genotypes to the number
165 of rarer genotypes, and can be calculated as $E_5 = G - 1/N_1 - 1$. All analyses were performed
166 by using the R software.

167 Analyses were conducted in two steps: (i) all Brazilian isolates independent of the
168 agricultural pole origin-the total Brazilian population compared with total population of
169 Spain; and (ii) all isolates from a single agricultural pole were considered as a

170 subpopulation within Brazil and were compared. The indexes of genotypic diversity
171 were used for this haploid fungus to measure and statistically compare the diversity of
172 different phenotypes in different populations. Thus, the null hypothesis is that no
173 significant difference in genotypic diversity exists between the Brazilian and Spanish
174 populations of *M. cannonballus* and within Brazilian population among agricultural
175 pole subpopulations.

176

177 **RESULTS**

178

179 **Mycelial compatibility grouping.** After pairing the *M. cannonballus* isolates on PDA,
180 two types of mycelial interactions were observed: intermingling mycelia, where the two
181 colonies grew together with a uniform surface, identified as a vegetative compatibility
182 reaction; and a barrage zone formed at the interaction between the colonies, considered
183 a vegetative incompatibility reaction (Fig. 1). Among incompatible reactions the
184 intensity of the barrage varied from slight to strong. Slight intensity reactions were
185 characterized by narrow lines of mycelia formed at the point of contact among the
186 paired isolates. In contrast, reactions of strong intensity were characterized by wide
187 strips of dense mycelia, from light to dark brown.

188 Among the 69 isolates of *M. cannonballus*, 10 MCGs were identified (Table 1). The
189 Brazilian isolates were assigned in four MCGs: MCG-1 with 35 isolates, MCG-2 with
190 20 isolates, MCG-3 with two isolates and MCG-4 with one isolate. MCG-1 and MCG-2
191 consist of isolates from all Brazilian growing areas, and until three MCGs were
192 identified in one single growing area. The isolates from Quixeré and Mossoró
193 agricultural poles belonged to MCG-1, MCG-2 and MCG-3, while isolates from Icapuí
194 belonged to MCG-1, MCG-2 and MCG-4. The 11 Spanish isolates were assigned in six
195 different MCGs. No Spanish isolate was compatible with Brazilian isolates (Table 1).

196

197 **Genetic structure based in MCG analysis.** Four different genotypes of *M.*
198 *cannonballus* were found among 58 isolates in the Brazilian population examined.
199 Genotypic diversity for the total population was thus at 6.8% of the possible maximum,
200 where every isolate has a unique genotype. One of the genotypes was observed only
201 once in the total population, while the most frequent genotype was present thirty five
202 times. Genotypes with a frequency greater than one accounted for 3 (75%) of the 4
203 genotypes detected and represented 57 of the 58 isolates studied. Two genotypes were
204 found in the three agricultural pole subpopulations, one genotype was found only in
205 Icapuí, and another genotype was found in Quixeré and Mossoró.

206 The indexes N_1 and G of total genotype diversity for the subpopulations of Icapuí,
207 Quixeré and Mossoró were similar. The estimated confidence intervals for these indexes
208 for all three agricultural poles overlapped, suggesting the lack of significant differences
209 between them (Table 2). When the diversity index G was scaled by the number of
210 expected genotypes [$E(g_n)$], lower value for richness was obtained to Mossoró
211 subpopulation (2.27). The subpopulations of Icapuí and Quixeré showed values very
212 close for this parameter with 2.83 and 3.00, respectively. In relation to evenness,
213 Quixeré had the higher value (0.96), while Icapuí showed the lower value (0.60) (Table
214 2).

215 In the Spanish population six different genotypes were found among 11 isolates,
216 54.5% of the possible maximum of genotypic diversity. Three genotypes were observed
217 only once in the total population, while the two most frequent genotypes were present
218 three times. No one genotype was found between Brazilian and Spanish populations.
219 When populations of these countries were compared, bootstrapped confidence intervals

220 of diversity indices N_I and G do not overlap. Lower values for total genotypic diversity,
221 richness and evenness were obtained by the Brazilian population (Table 2).

222

223 **DISCUSSION**

224

225 This is the first study to consider genotypic diversity of the *M. cannonballus* isolates
226 from Brazilian muskmelon pole productions. In this study, MCG analysis provided
227 valuable information about the genetic diversity in the pathogen. The results
228 demonstrate that the 94.8% of the Brazilian isolates belong to two major MCGs,
229 regardless of growing area or agricultural pole. The relative number of MCGs in
230 populations of ascomycetes has been used in several studies as an indicator of whether a
231 pathogen has been recently introduced to an area or whether it has been present there for
232 a longer time (Adams *et al.*, 1990). However, the number of MCGs found would not
233 only depend on the period of time the pathogen was introduced, but also on the diversity
234 of the source population, the frequency with which the pathogen was introduced and the
235 ability to outcross (Milgroom and Cortesi, 1999). The emergence of new genotypes
236 localized in single fields may be also an indication of MCGs or clones adapted to
237 specific field microclimates or hosts, and is less likely the result of genetic exchange
238 and recombination (Kull *et al.*, 2004). The wide distribution of the largest MCGs in
239 Brazilian *M. cannonballus* isolates suggested an initial broad introduction.

240 The *M. cannonballus* subpopulations from Brazil have low levels of genetic
241 diversity, because the bootstrapped confidence intervals of diversity overlap for all
242 indices assayed between subpopulations, confirming the null hypothesis which no
243 significant difference in diversity exists between Icapui, Quixere and Mossoró
244 subpopulations.

245 The homogeneity in the *M. cannonballus* subpopulations derived from different
246 muskmelon growing areas in Brazil, in some cases separated by more than 90 km
247 (Icapuí and Quixeré), suggests that fungi populations have undergone little genetic
248 change since the disease was first detected in 2002 (Sales Jr. *et al.*, 2004). This result is
249 in agreement with studies conducted in Italy where this pathogen was first reported in
250 2001 (Infantino *et al.*, 2002). Chilosi *et al.* (2008) reported little variation among *M.*
251 *cannonballus* isolates from Italy based on RFLP studies. In the contrary, in Spain,
252 where the disease was first described in 1990 (Lobo-Ruano, 1990) our work detected
253 high genotypic diversity.

254 The low diversity in the Brazilian populations of *M. cannonballus* may result from a
255 founder effect. It seems to have been introduced into muskmelon orchards relatively
256 recently, when a limited number of individuals, most likely native, started to infect
257 muskmelon plants established a new population able to cause disease in a new host;
258 therefore, this limited population might show reduced genotypic diversity compared
259 with original populations. There is evidence that *M. cannonballus* was not introduced in
260 Brazil by propagation material, but is possibly a natural inhabitant of the Caatinga soils
261 (Medeiros *et al.*, 2006), as in USA where the fungus is an indigenous soil inhabitant
262 (Stanghelini *et al.*, 1996). Probably, the Brazilian *M. cannonballus* population
263 pathogenic to muskmelon most likely emerged from a natural population by selection
264 pressure due to intense muskmelon melon cultivation. This selection pressure
265 established a new population from few individuals more adapts to muskmelon melon
266 and spread easily within the cultivated area.

267 Although little genetic variation was detected in the *M. cannonballus* subpopulations
268 in Brazil, we observed significant genetic variation among Brazilian and Spanish
269 populations. All isolates from Brazil were incompatible with isolates from Spain. A

270 study with *M. cannonballus* isolates from USA pairing together and with isolates from
271 Israel and Spain no isolate was compatible between isolates of other country. The
272 incompatibility of these isolates can be explained by their geographical isolation,
273 different environment and cultural practices (Alcantara, 1998).

274 The interactions of a genetically uniform and virulent pathogen population and the
275 monoculture of susceptible cultivars may pose a serious threat to the Brazilian
276 muskmelon industry. The results showed little genetic variation in *M. cannonballus*
277 populations from Brazilian melon which may suggest that a program to breed resistant
278 melon cultivars has a high chance of success.

279

280 **ACKNOWLEDGEMENTS**

281

282 This research was partially funded by CAPES (Project 203/2009 - International
283 Cooperation CAPES-Brazil/DGU-Spain). We are thankful CAPES for the research
284 fellowships granted to C.S. Bezerra, and CNPq for the research fellowships granted
285 M.P.S. Câmara, R. Sales Junior and S.J. Michereff. We thank Prof. Eduardo S.G.
286 Mizubuti, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil, for your advice on the
287 analyses of the data.

288

289 **REFERENCES**

290

- 291 Adams G., Hammar S., Proffer T., 1990. Vegetative compatibility in *Leucostoma*
292 *persoonii*. *Phytopathology* **80**: 287-291.
- 293 Alcantara T.P., 1998. *Monosporascus cannonballus*-melon pathosystem: mechanism of
294 vine decline, phenotypic characterization and mycelial incompatibility, and ascospore

295 germination and sources of resistance. Ph.D. Thesis. The University of Arizona,
296 Tucson, USA.

297 Armengol J., Vicent A., León M., Berbegal M., Abad-Campos P., García-Jiménez J.,
298 2010. Analysis of population structure of *Rosellinia necatrix* on *Cyperus esculentus* by
299 mycelial compatibility and inter-simple sequence repeats (ISSR). *Plant Pathology* **59**:
300 179-185.

301 Armengol J., Alaniz S., Vicent A., Beltrán R., Abad-Campos P., Pérez-Sierra A.,
302 García-Jiménez J., Ben Salem I., Souli M., Boughalleb, N. 2011. Effect of dsRNA on
303 growth rate and reproductive potential of *Monosporascus cannonballus*. *Fungal Biology*
304 DOI:10.1016/j.funbio.2010.12.007.

305 Burdon J.J., 1993. The structure of pathogen populations in natural plant communities.
306 *Annual Review of Phytopathology* **31**: 305-323.

307 Bruton B.D., 1998. Soilborne diseases in cucurbitaceae: pathogen virulence and host
308 resistance. In: McCreight J. (ed.). Cucurbitaceae'98, pp.143-166. ASHS Press,
309 Alexandria, USA.

310 Burgess T., Bihon W., Wingfield M.J., Wingfield B.D., 2009. A simple and rapid
311 method to determine vegetative compatibility groups in fungi. *Inoculum* **60**: 1-2.

312 Chilosi, G., Reda R., Aleandri M.P., Camele I., Altieri L., Montuschi C., Languasco L.,
313 Rossi V., Agosteo G.E., Macro C., Carlucci A., Lops F., Mucci M., Raimondo M.L.,
314 Frisillo, S., 2008. Fungi associated with root rot and collapse of melon in Italy. *Bulletin*
315 *OEPP/EPPO Bulletin* **38**: 147-154.

316 Cilliers A.J., Herselman L., Pretorius Z.A., 2000. Genetic variability within and among
317 mycelial compatibility groups of *Sclerotium rolfsii* in South Africa. *Phytopathology* **90**:
318 1026-1031.

- 319 Cohen R., Pivonia S., Burger Y., Edelstein M., Gamliel A., Katan J., 2000. Toward
320 integrated management of *Monosporascus* wilt of melons in Israel. *Plant Disease* **84**:
321 496-505.
- 322 Glass N.L., Kaneko I., 2003. Fatal attraction: nonself recognition and heterokaryon
323 incompatibility in filamentous fungi. *Eukaryotic Cell* **2**: 1-8.
- 324 Glass N.L., Jacobson D.J., Shiu P.K.T., 2000. The genetics of hyphal fusion and
325 vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. *Annual Review of Genetics*
326 **34**: 165-186.
- 327 Grünwald N.J., Goodwin S.B., Milgroom M.G., Fry W.E., 2003. Analysis of genotypic
328 diversity data for populations of microorganisms. *Phytopathology* **93**: 738-746.
- 329 Hill M.O., 1973. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences.
330 *Ecology* **54**: 427-432.
- 331 IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), 2010. Sidra: sistema IBGE de
332 recuperação automática. site: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric>.
- 333 Ikeda K., Inoue K., Nakamura H., Hamanaka T., Ohta T., Kitazawa O., Kida
334 C., Kanematsu S., Park P., 2011. Genetic analysis of barrage line formation during
335 mycelial incompatibility in *Rosellinia necatrix*. *Fungal Biology* **115**: 80-86.
- 336 Infantino A., Uccelletti A., Di Stefano G., Ciuffreda G., Frisullo S., 2002. First report of
337 *Monosporascus cannonballus* on melon in Italy. *Journal of Plant Pathology* **84**: 140.
- 338 Kauserud H., 2004. Widespread vegetative compatibility groups in the dry-rot fungus
339 *Serpula lacrymans*. *Mycologia* **96**: 232-239.
- 340 Kohn L.M., Stasovski E., Carbone I., Royer J., Anderson B., 1991. Mycelial
341 incompatibility and molecular markers identify genetic variability in field populations
342 of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* **81**: 480-485.

- 343 Kull L.S., Pedersen W.L., Palmquist D., Hartman G.L., 2004. Mycelial compatibility
344 grouping and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease* **88**: 325-332.
- 345 Leslie J.F., 1993. Fungal vegetative compatibility. *Annual Review of Phytopathology*
346 **31**: 127-150.
- 347 Lobo-Ruano, M., 1990. Colapso del melón producido por el hongo del genero
348 *Monosporascus*. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* **16**: 701-707.
- 349 Ludwig J.A., Reynolds J.F., 1988. Statistical Ecology: A Primer on Methods and
350 Computing. John Wiley & Sons, New York, USA.
- 351 Martyn R.D., Miller M.E., 1996. *Monosporascus* root rot and vine decline: an emerging
352 disease of melons worldwide. *Plant Disease* **80**: 716-724.
- 353 McDonald B.A., Linde C., 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential,
354 and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **40**: 349-379.
- 355 Medeiros E.V., Sales Junior R., Michereff S.J., Barbosa M.R., 2006. Quantificação de
356 ascósporos de *Monosporascus cannonballus* em solos não cultivados de Caatinga e em
357 áreas de cultivo de melão do Rio Grande do Norte e Ceará. *Fitopatologia Brasileira* **31**:
358 500-504.
- 359 Milgroom M.G., Cortesi P., 1999. Analysis of population structure of the chesnut blight
360 fungus based on vegetative incompatibility genotypes. *Proceedings of the National*
361 *Academy of Sciences, USA* **96**: 10518-10523.
- 362 Pivonia S., Gerstl Z., Maduel A., Levita R., Cohen R., 2010. Management of
363 *Monosporascus* sudden wilt of melon by soil application of fungicides. *European*
364 *Journal of Plant Pathology* **128**: 201-209.
- 365 Sales Jr. R., Nascimento I.J.B., Freitas L.S., Beltrán R., Armengol, J., Vicent A.,
366 García-Jiménez J., 2004. First Report of *Monosporascus cannonballus* on melon in
367 Brazil. *Plant Disease* **88**: 84.

- 368 Shannon C.E., Weaver W., 1949. The Mathematical Theory of Communication.
369 University of Illinois Press, Urbana, USA.
- 370 Silva K.J.P., Cordeiro A.G., Nogueira D.R.S., Sales Junior, R., 2010. *Monosporascus*
371 *cannonballus*: agente causal do colapso ou morte súbita do meloeiro. *Revista Verde de*
372 *Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável* **5**: 11-18.
- 373 Stanghellini M.E., Kim D.H., Rasmussen S.L., 1996. Ascospores of *Monosporascus*
374 *cannonballus*: germination and distribution in cultivated and desert soils in Arizona.
375 *Phytopathology* **86**: 509-514.
- 376 Stoddart J.A., Taylor J.F., 1988. Genotypic diversity: estimation and prediction in
377 samples. *Genetics* **118**: 705-711.
- 378 Wu B.M., Subbarao K.V., 2006. Analyses of lettuce drop incidence and population
379 structure of *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor*. *Phytopathology* **96**: 1322-1339.
- 380

381 **Table 1.** *Monosporascus cannonballus* isolates used in study of mycelial compatibility

382 groups (MCG).

383

Code (CMM)	Year	Country	Location ^a	Growing area	Host	MCG group
2360	2009	Brazil	Icapuí - CE	CE-1	muskmelon	2
2361	2009	Brazil	Icapuí - CE	CE-1	muskmelon	1
2362	2009	Brazil	Icapuí - CE	CE-1	muskmelon	1
2363	2009	Brazil	Icapuí - CE	CE-1	muskmelon	2
2365	2009	Brazil	Icapuí - CE	CE-1	muskmelon	4
2367	2009	Brazil	Icapuí - CE	CE-1	muskmelon	2
2368	2009	Brazil	Icapuí - CE	CE-1	muskmelon	2
2369	2009	Brazil	Icapuí - CE	CE-1	muskmelon	1
2370	2009	Brazil	Icapuí - CE	CE-1	muskmelon	1
2371	2009	Brazil	Icapuí - CE	CE-1	muskmelon	2
2372	2009	Brazil	Icapuí - CE	CE-1	muskmelon	2
2398	2009	Brazil	Quixeré - CE	CE-2	muskmelon	1
2399	2009	Brazil	Quixeré - CE	CE-2	muskmelon	1
2401	2009	Brazil	Quixeré - CE	CE-2	muskmelon	2
2402	2009	Brazil	Quixeré - CE	CE-2	muskmelon	1
2403	2009	Brazil	Quixeré - CE	CE-2	muskmelon	3
2404	2009	Brazil	Quixeré - CE	CE-2	muskmelon	1
2405	2009	Brazil	Quixeré - CE	CE-2	muskmelon	1
2430	2009	Brazil	Quixeré - CE	CE-2	muskmelon	1
2431	2009	Brazil	Quixeré - CE	CE-2	muskmelon	1
2466	2009	Brazil	Quixeré - CE	CE-2	muskmelon	2
2376	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-1	muskmelon	2
2377	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-1	muskmelon	1
2379	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-1	muskmelon	1
2381	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-1	muskmelon	2
2429	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-1	muskmelon	2
2386	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-2	muskmelon	1
2387	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-2	muskmelon	1
2390	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-2	muskmelon	1
2391	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-2	muskmelon	1
2394	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-2	muskmelon	2
2396	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-2	muskmelon	1
2397	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-2	muskmelon	1
2408	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-3	muskmelon	2
2413	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-3	muskmelon	1
2414	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-3	muskmelon	2
2418	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-3	muskmelon	2
2422	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-3	muskmelon	1
2423	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-3	muskmelon	2
2445	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-3	muskmelon	2
2446	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-3	muskmelon	1
2447	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-3	muskmelon	1
2434	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-4	muskmelon	2
2435	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-4	muskmelon	2
2436	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-4	muskmelon	1
2437	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-4	muskmelon	1
2440	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-4	muskmelon	1
2441	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-4	muskmelon	3
2448	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-5	muskmelon	1
2449	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-5	muskmelon	2
2450	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-5	muskmelon	1

2451	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-5	muskmelon	1
2452	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-5	muskmelon	1
2453	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-5	muskmelon	1
2454	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-5	muskmelon	1
2455	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-5	muskmelon	1
2457	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-5	muskmelon	1
2467	2009	Brazil	Mossoró - RN	RN-5	muskmelon	1
0649	1998	Spain	Fuente Álamo - MU	EF-1	muskmelon	5
0651	1998	Spain	Argamasilla de Alba - CR	EA-1	muskmelon	10
0652	2003	Spain	Almenara - CS	EL-1	cucurbit rootstock	9
0660	2003	Spain	Almenara - CS	EL-2	muskmelon	7
0662	2003	Spain	Almenara - CS	EL-3	watermelon	6
0654	2004	Spain	Alboraia - VA	EB-1	cucurbit rootstock	9
0658	2003	Spain	Alboraia - VA	EB-2	muskmelon	8
0668	2004	Spain	Alboraia - VA	EB-3	muskmelon	7
0672	2004	Spain	Alboraia - VA	EB-4	watermelon	9
0663	2003	Spain	Picassent - VA	EP-1	watermelon	7
0673	2004	Spain	Silla - VA	ES-1	watermelon	6

384

385 ^a For Brazilian isolates location indicates agricultural pole - state (CE = Ceará and RN = Rio
386 Grande do Norte), while in Spanish isolates indicates town - province (CR = Ciudad Real, CS =
387 Castellón, MU – Murcia and VA = Valencia).

388 **Table 2.** Indices of total diversity, richness and evenness for *Monosporascus*
 389 *cannonballus* populations from Brazil-BR (subpopulations Icapuí, Quixeré and
 390 Mossoró) and Spain-SP.

391

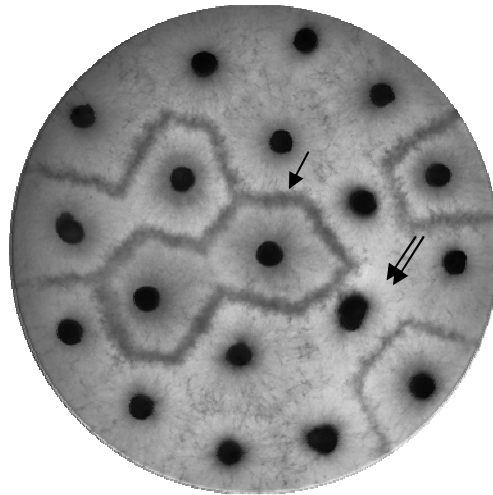
Indices	Icapui	Quixeré	Mossoró	BR	SP
Diversity					
N_1^a	2.43 (1.67-3.18)	2.23 (1.34-3.11)	2.12 (1.72-2.51)	2.37 (1.97-2.77)	5.33 (3.80-6.85)
G^b	1.85 (0.98-2.72) ^f	2.18 (1.44-2.91)	1.92 (1.54-2.29)	2.10 (1.78-2.41)	4.84 (3.33-6.34)
Richness					
g_{obs}^c	3	3	3	4	6
$E(g_n)^d$	2.83	3.00	2.27	2.53	6.00
Evenness					
E_5^e	0.60	0.96	0.82	0.80	0.89

392

393 ^a Hill's diversity index (Hill, 1973).394 ^b Stoddart and Taylor's genotypic diversity index (Stoddart and Taylor, 1988)395 ^c Number of observed genotypes (MCG).396 ^d Expected number of genotypes (MCGs) estimated by the rarefaction method (Grünwald *et al.*,
397 2003).398 ^e Ludwig and Reynolds's evenness index (Ludwig and Reynolds, 1988)399 ^f Numbers in parentheses indicate 90% confidence interval calculated by bootstrapping (1,000
400 resamples) using the accelerated bootstrap method (Grünwald *et al.*, 2003).

401

402



403

404 **Fig. 1.** Dark barrage lines (arrow) formed between incompatible isolates of
405 *Monosporascus cannonballus* belonging to different mycelial compatibility groups
406 (MCGs) and confluent mycelium (double arrows) between compatible isolates
407 belonging to the same MCG.

CONCLUSÕES GERAIS

- A população de *M. cannonballus* no nordeste do Brasil tem baixo nível de diversidade genética.
- A seleção episódica é provavelmente a principal força evolutiva atuando sobre a estrutura genética da população de *M. cannonballus* no Brasil.
- Os isolados de *M. cannonballus* do Brasil e Espanha constituem populações distintas.
- A incompatibilidade micelial mostrou-se uma ferramenta importante para a caracterização genética de populações de *M. cannonballus*.

Anexo

Normas para submissão de artigo ao Journal of Plant Pathology (JPP)

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Scope of the Journal

The aim of the *Journal of Plant Pathology* (JPP), an international journal of the Italian Society for Plant Pathology, is to publish results of research on fundamental and applied aspects of plant pathology. Contributions in the field of mycology, bacteriology, virology, physiological plant pathology, plant-parasite interactions, post-harvest diseases, non-infectious diseases, and plant protection are welcome. Articles on pesticide screening and screening for resistance to pathogens are generally not accepted. Surveys for diseases or pathogens should be submitted as “Short communications”

Editorial Policy

JPP is open to publication of papers by members and non-members of the Italian Society for Plant Pathology. Manuscripts submitted for publication will be considered on the assumption that the same or similar work has not been or will not be published elsewhere. Accepted papers become copyright of the Journal.

There is no page charge (except for colour figures). The authors will receive 25 offprints free of charge.

Submission of papers

JPP encourages authors to submit manuscript on-line to: <http://www.sipav.org/jpp>

Our system allows for easy author registration procedures and submission of papers and will speed up the review and acceptance time. No printed or CD versions of papers will be required anymore. Submission of hard-copy manuscripts will not be handled, as well as papers sent by e-mail to the Editorial Office.

Papers should be submitted as single PDF files not exceeding 1 MB, with double line spacing and continuous line numbering. Figures and tables must be placed at the end of the file, not within the text.

The authors must carefully read the Conditions of Use and the Instructions for Authors before submitting their paper. The Instructions for Authors are also available on the JPP web site (<http://www.sipav.org/jpp>) together with the Instructions for on-line submission.

Types of papers

The JPP welcomes:

Standard “full-length” papers (Research papers). As a rule, they should not exceed 6000 words (not including references and tables) and contain no more than ten tables and figures combined. Standard papers are divided into the following sections: Summary (not exceeding 250 words), and Key words (not exceeding five and not appearing in the title); Introduction; Materials and Methods; Results; Discussion; Acknowledgements; References. Some flexibility in layout is allowed for papers that cannot be presented in conventional form. For instance, a combined Results and Discussion section is permitted.

Short communications. These are intended for reporting brief complete pieces of work, not for preliminary results. Short communications should not exceed 2500 words and contain no more than six figures and tables combined. The text is not divided into sections, except for a short Summary, not exceeding 200 words, and Key words, Acknowledgements and References.

Disease notes. They are intended for new or unusual records in abstract forms, with one or two references. Their length should not exceed 250 words.

Review papers. As a rule, review articles on specific subjects are invited. Offered reviews may be considered, but the authors should contact the Editor-in-Chief in advance.

Format

All papers must be written in English. We strongly suggest to ensure that the language is corrected before submission.

The International System of units (SI) must be adopted for all numerical data. Whenever abbreviations are to be used, the names should be given initially in full with the abbreviation in parentheses, *e.g.* polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), Tobacco mosaic virus (TMV). The CBE manual *Scientific Style and Format* (6th edition, Cambridge University Press) is recommended as a reference for style and conventions.

Double spacing and continuous line numbering should be used throughout the text and in the figure legends.

Title page.

This page should contain:

TITLE OF THE PAPER (capital letters, bold. Preferred font, Times New Roman 14);

Author(s) name (initials and family name, low case, bold, Times New Roman 12);

[*Affiliation(s) and full address(es)* of all author(s), italics, Times New Roman 11];

Running title: A meaningful, 5-6 word-long short title (Times New Roman 12)

Corresponding author: name (Times New Roman 12)

fax number :

e-mail address:

SUMMARY. The Summary (max 250 words, Times New Roman 12) should be concise and briefly describe the scope of the research, the major results and conclusions. **No references should be cited** invece di It should not contain references.

INTRODUCTION. This section should give background information on the extant study in a concise form. Extended review of the subject should be avoided as well as any anticipation of results.

MATERIALS AND METHODS. The Materials and Methods section is divided into subsections. It should give enough information to allow other investigators to repeat the experiments. For standard procedures a reference is sufficient. Only major modifications or novel methods should be detailed. Suppliers of reagents or equipments should be indicated in parentheses. The source of bioreagents (e.g., bacterial strains, virus isolates, antibodies, ecc.) should also be specified.

RESULTS. This section may be divided into subsections. The rationale for the experiments and the results should be clear and concise. The interpretation of data should be presented in the Discussion section.

DISCUSSION. The Discussion should give an interpretation of the results, related to previous work. It should not be a mere repetition of the results. Results and Discussion sections may be combined.

ACKNOWLEDGEMENTS. Optional. Beside personal recognitions, it may contain the source of financial support obtained for the study.

REFERENCES. Literature citations in the text should be in parentheses, giving the author's name and date, and using *et al.*, when the number of authors exceeds two [e.g. (Smith, 1994); (Smith and Pearson, 1991); (Smith *et al.*, 1995)]. Citations of personal communications and unpublished data are allowed, but only when strictly necessary. References must be listed in

alphabetical order by first author and written in the following formats according to where they are from:

Journal

Elad I., Volpin H., 1991. Heat treatment for the control of rose and carnation grey mould. *Plant Pathology* **40**: 278-286.

Book

Abel F.B., Morgan P.W., Saltveit M.F., 1992. Ethylene in Plant Biology. 2nd Ed. Academic Press Inc., San Diego, USA.

Book chapter

Alleweldt G., 1987. The contribution of grapevine breeding to integrated pest control. In: Cavalloro R. (ed.). Integrated Pest Control in Viticulture, pp. 369-377. A.A. Balkema, Rotterdam, The Netherlands.

Thesis or Dissertation

Hammer P., 1992. Mechanisms of resistance to infection by *Botrytis cinerea* in rose flowers. Ph.D. Thesis. Pennsylvania State University, University Park, USA.

Proceedings

Mortensen K., Makowsky R.M.D., 1989. Field efficacy of different concentrations of *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *malvae* as a herbicide for round-leaved mallow (*Malva pusilla*). In: Delfosse E.S. (ed.). *Proceedings of the 7th International Symposium on Biological Control of Weeds, Rome 1988*: 523-530.

Tables. Tables should have a concise title and, if necessary, a footnote. A single grid is preferred for each table. If grids are not used, tabs and not spaces should be used to align columns. The preferred format for tables is MS Word.

Figures. Figures should be sized to fit in the column(s) of the Journal and should be submitted at their intended publication size. They are provided as PDF files only when submitted for reviewing to minimize file size. When the paper is accepted, quality digital files must be provided. The minimal resolution should be 300 dpi. TIFF or PowerPoint formats are preferred. In some cases a printed copy of the figures may be requested. To avoid font problems, a single font should be used throughout. Fonts as Arial, Helvetica, Symbol, Times New Roman are preferred.

Photographs. Photographs should be well contrasted, with non essential areas removed. For micrographs, a magnification bar must be included. There is a charge for colour photographs. Please contact the Editorial Office for rates.

Line drawings. These should be submitted as high-quality computer-generated figures. However, in some cases a printed copy of the figures may be requested. Symbols and line thickness should be clear. Shading should be avoided, as it may be difficult to reproduce.

Figure legends. These should give enough information to make the figure understandable and should be concise and self-explanatory. Detailed experimental procedures must be described in the Materials and methods section and not in a legend. All symbols reported in the figure must be defined, together with abbreviations not reported in the text.

Sequence data. Manuscripts containing sequence data should include the relative accession number from a recognized nucleotide database. Diagrams of nucleotide and amino acid sequences should fit in the column(s) of the Journal. Characters should be 6-8 points.

Virus nomenclature. Virus names should be given accordingly to the standard rules set by the International Committee on Taxonomy of Viruses. Names of established species, genera, families and orders must be written in italics with capital initials. Tentative and unassigned species are written in roman type with capital initial.

Processing of papers.

All papers will be peer reviewed by two or more referees. In the online submission, manuscripts can be sent to the Editorial Office, who will choose the appropriate Editor. Alternatively, authors can select the Senior Editor who will be in charge of handling their manuscript in the category field. In both cases a reference number will be assigned to the paper. After preliminary examination by the Senior Editor to ascertain if the paper is in line within the scope of the Journal, submitted papers will be assigned to Associated Editors for further processing. Papers will be accepted by Senior Editors acting upon the advice of Associated Editors. After processing and acceptance, papers are taken in charge by the Editorial Office to check their conformity to the JPP standards.

Proofs are sent by e-mail as PDF files. Corrections of proofs will be restricted to publisher's errors only. Substantial alterations will be charged to the authors. The PDF file should be printed and corrections marked on the printed copy. Corrected proof should be mailed or sent by fax (+39. 080. 5442911) to the Editorial Office within three days. Minor corrections can be communicated by e-mail (jpp@sipav.org).