



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA
DOUTORADO EM FITOTECNIA

IZABELLE RODRIGUES FERREIRA GOMES

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Cladosporium tenuissimum* E EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE SEU CRESCIMENTO *in vitro*.

MOSSORÓ

2023

IZABELLE RODRIGUES FERREIRA GOMES

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Cladosporium tenuissimum* E EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE SEU CRESCIMENTO *in vitro*.

Tese apresentada ao Doutorado em Fitotecnia do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Doutor em Fitotecnia.

Linha de Pesquisa: Melhoramento Genético

Orientadora: Prof^ª. Dra. Ioná Santos Araújo Holanda

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio

MOSSORÓ-RN.

2023

©Todos os direitos estão reservados à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata, exceto as pesquisas que estejam vinculadas ao processo de patenteamento. Esta investigação será base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) seja devidamente citado e mencionado os seus créditos bibliográficos.

G633c Gomes, Izabelle Rodrigues Ferreira.
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE
Cladosporium tenuissimum E EFEITO DE ÓLEOS
ESSENCIAIS SOBRE SEU CRESCIMENTO in vitro
/Izabelle Rodrigues Ferreira Gomes. -
2023.59 f.: il.

Orientadora: Ioná Santos Araújo Holanda.
Coorientadora: Márcia Michelle de Queiroz
Ambrósio. Tese (Doutorado) - Universidade
Federal Rural do Semi-árido, Programa de
Pós-graduação em Fitotecnia, 2023.

1. Cucumis melo L. 2. ISSR. 3. RAPD. 4.
cucurbitáceas. 5. mancha foliar. I. Holanda,
Ioná Santos Araújo, orient. II. Ambrósio, Márcia
Michelle de Queiroz, co-orient. III. Título.

IZABELLE RODRIGUES FERREIRA GOMES

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Cladosporium tenuissimum* E EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE SEU CRESCIMENTO *in vitro*

Tese apresentada ao Doutorado em Fitotecnia do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Doutor em Fitotecnia.

Linha de Pesquisa: Melhoramento Genético

Defendida em: 14 / 07 / 2023.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
gov.br IONA SANTOS ARAUJO HOLANDA
Data: 27/07/2023 08:23:03-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^ª. Dra. Ioná Santos Araújo Holanda (UFERSA)
Presidente

Documento assinado digitalmente
gov.br LINDOMAR MARIA DA SILVEIRA
Data: 26/07/2023 08:28:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Lindomar Maria da Silveira (UFERSA)
Membro Examinador

Andréia Mitsa

Paiva Negreiros

Assinado de forma digital por Andreia Mitsa Paiva Negreiros Dados: 2023.07.26 09:12:19 03

Dra. Andreia Mitsa Paiva Negreiros (UFERSA)
Membro Examinador

Documento assinado digitalmente
gov.br PATRICIA DO NASCIMENTO BORDALLO
Data: 26/07/2023 08:57:40-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Patrícia do Nascimento Bordallo (EMBRAPA)
Membro Examinador

Documento assinado digitalmente
gov.br PHELLIPPE ARTHUR SANTOS MARBACH
Data: 19/07/2023 10:56:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Phellippe Arthur Santos Marbach (UFRB)
Membro Examinador

*“Não és sequer a razão de meu viver,
pois que tu és já toda a minha vida...”
(Florbela Espanca)*

À minha filha, Clarice.

Eu dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois nos momentos mais difíceis foi a fé que mais me ajudou a superar os obstáculos que surgiram.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, pela oportunidade da realização deste doutorado e o acesso a um ensino de qualidade e excelência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

Ao meu marido Werlley, que têm sido meu grande companheiro na vida, sempre paciente, generoso e disposto a ajudar. Serei sempre grata por todo suporte, incentivo e cuidado comigo e com nossa família.

À minha filha Clarice, minha maior bênção, que enche minha casa, meus dias e minha vida de amor e alegrias.

À minha mãe Maria José, meu irmão Netinho e minha avó Inês, sempre presentes e me dando todo o amor, carinho e conselhos de que necessitei.

À minha orientadora Profa. Dra. Ioná, exemplo de profissional, mãe, amiga, conselheira, que me transmitiu uma vasta experiência acadêmica e de vida. Sou eternamente grata por toda compreensão e apoio durante esses anos.

À Profa Dra. Márcia Michele, sempre muito prestativa. Agradeço pela oportunidade e por toda a estrutura de seu laboratório tão gentilmente cedida para a execução de grande parte desse projeto.

Aos amigos e colegas de laboratório, Pedro Sidarque, Jorge, Talison, Jarlan, Karen, Deyse, Gilsivan, pelo apoio, dedicação e ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos que sempre estiveram comigo, que me inspiram e que levo sempre no meu coração, Jackson, Cynthia, Clea, Kyvia, Ingrid e Íris.

E a todos os que de alguma forma contribuíram para a minha formação e realização desse trabalho.

RESUMO

GOMES, Izabelle Rodrigues Ferreira. **Morphological and molecular characterization of *Cladosporium tenuissimum* and the effect of essential oils on its growth *in vitro***. 2023. 63 p. Tese (Doutorado em Agronomia: Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2023.

O objetivo deste estudo foi o de caracterizar, em nível morfológico e molecular, isolados de *C. tenuissimum*, causador da mancha marrom, a sua interação com abóbora e meloeiro, por meio de análises de patogenicidade, e avaliar o efeito de óleos essenciais no crescimento *in vitro* do patógeno. Para isso, foram coletadas folhas de abóbora e melancia, e folhas e frutos de meloeiro com lesões necróticas moderadas a severas, em regiões produtoras do Rio Grande do Norte, Brasil. Um total de doze isolados (quatro de abóbora, um de melancia e sete de melão) foram obtidos a partir de folhas e frutos sintomáticos. Os isolados foram submetidos a análises morfológicas em microscópio óptico e de varredura, extração de DNA de pelo método SDS, sequenciamento do DNA com os primers ITS 1 e 2 e, de parte do gene TEF1 α , análise filogenética pelo método da Análise de Máxima Verossimilhança e análise da diversidade genética com 19 marcadores ISSR e dez RAPD. O potencial patogênico dos isolados em plantas de abóbora e melão foi avaliado em casa-de-vegetação pela metodologia de suspensões de esporos (10^6 conídios/ml⁻¹). Para avaliar o controle do crescimento *in vitro* de dois isolados distantes geneticamente, foram testados três óleos essenciais: canela cássia (*Cinnamomum cassia*), capim limão (*Cymbopogon citratus*) e manjeriço (*Ocimum basilicum*), em duas concentrações (0,125% e 0,5%) cada. No estudo da diversidade genética ambos os marcadores ISSR e RAPD foram eficazes na identificação de similaridade genética dos isolados, e produziram polimorfismo percentual 98% e 100%, respectivamente. A análise do dendrograma em conjunto indicou a formação de oito grupos principais, onde o coeficiente de similaridade genética variou de 0,21 (CMX02 e CML10) a 0,48 (CML07 e CML08). Todos os isolados apresentaram potencial patogênico para as plantas de abóbora e melão, variando na severidade. Na avaliação *in vitro*, canela cássia e capim limão inibiram 100% do crescimento dos isolados CML06 e CML07, enquanto que óleo de manjeriço a 0,125% inibiram 84% e 78%, respectivamente. O isolado CML07 também apresentou na análise de similaridade em conjunto a maior distância genética dos demais isolados, sugerindo, dessa forma, que esse isolado possui genes que atuam de forma diferenciada, e que a presença da variação genética observada pode estar associada à maior incidência da doença. Este é o

primeiro relato do patógeno em áreas produtoras no Rio Grande do Norte e no Brasil para Cucurbitáceas.

Palavras-chave: *Cucumis Melo L.*, ISSR, RAPD, Cucurbitáceas, Mancha Foliar

ABSTRACT

GOMES, Izabelle Rodrigues Ferreira. **Morphological and molecular characterization and study of the effect of essential oils on the growth of *Cladosporium tenuissimum***. 2023. 63 p. Thesis (Doctorate in Agronomy: Plant Science) – Federal Rural University of the Semi-Arid (UFERSA), Mossoró-RN, 2023.

The objectives of this study were to characterize morphologically and molecularly isolates of *C. tenuissimum*, which causes brown spot, to verify its interaction with gourd and melon, through pathogenicity analysis, and to evaluate the effect of essential oils on the *in vitro* growth of pathogen. For this, pumpkin and watermelon leaves, and melon leaves and fruits with moderate to severe necrotic lesions were collected in producing regions of Rio Grande do Norte, Brazil. A total of twelve isolates (four from pumpkin, one from watermelon and seven from melon) were obtained from symptomatic leaves and fruits. The isolates were submitted to morphological analyzes in optical and scanning microscopes, DNA extraction by the SDS method, DNA sequencing with primers ITS 1 and 2 and, of part of the *TEF1 α* gene, phylogenetic analysis by the Maximum Likelihood Analysis method and genetic diversity analysis with 19 ISSR and ten RAPD markers. The pathogenic potential of isolates from pumpkin and melon plants was evaluated in a greenhouse using the spore suspension methodology (10^6 conidia/ml⁻¹). To evaluate the *in vitro* growth control of two genetically distant isolates, three essential oils, cassia cinnamon (*Cinnamomum cassia*), lemon grass (*Cymbopogon citratus*) and basil (*Ocimum basilicum*), were tested in two concentrations (0.125% and 0.5 %) each. In the study of genetic diversity, both ISSR and RAPD markers were effective in identifying the genetic similarity of the isolates, and produced percentage polymorphism 98% and 100%, respectively. The analysis of the dendrogram together indicated the formation of eight main groups, where the coefficient of genetic similarity ranged from 0.21 (CMX02 and CML10) to 0.48 (CML07 and CML08). All isolates showed pathogenic potential for pumpkin and melon plants, varying in severity. In the *in vitro* evaluation, cassia cinnamon and lemongrass inhibited 100% of the growth of isolates CML06 and CML07 while basil oil at 0.125% inhibited 84% and 78%, respectively. The CML07 isolate also showed a greater genetic distance from the other isolates in the joint similarity analysis, suggesting that this isolate has genes that act differently, and that the presence of the observed genetic variation may be associated with a higher incidence of the disease. This is the first report of the pathogen in producing areas in Rio Grande do Norte and Brazil for Cucurbitaceae.

Keywords: *Cucumis Melo* L., ISSR, RAPD, Cucurbitaceae, Leaf Spot.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- Figura 1 – Imagens de colônias de *Cladosporium* spp. cultivados em meio BDA isolados de folhas de abóbora (A e B), de frutos de melão (C e D), e de folhas de meloeiro (E e F), imagens de colônias efusas ou puntiformes de *Cladosporium* spp. (G) e, o reverso escuro de colônias de isolados cultivados em meio BDA (H e I) obtidos de plantios comerciais do Rio Grande do Norte.....32
- Figura 2 – Conídios de *Cladosporium* spp. em diferentes estágios de desenvolvimento, ramificados (A e B), e solitários e em processo de germinação de hifa (C e D), todos com coloração escura, visualizados em microscópio óptico.....33
- Figura 3 – Imagens do agrupamento de conídios de *Cladosporium tenuissimum* (A e B) e, formas morfológicas apresentadas pelos conídios de *C. tenuissimum*, ovoide (C) e doliformes (D) visualizados em microscópio eletrônico de varredura.....34
- Figura 4 – Imagens de folhas sintomáticas do fungo em folhas de melão originalmente doentes (A, B e C) e em folhas das plantas de aboboreiras (D e E) e de meloeiros (F e G) inoculadas em casa de vegetação.....35
- Figura 5 – Severidade de isolados de *Cladosporium* spp. em plantas de abobeira (A) e em plantas de meloeiro (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$)..... 36
- Figura 6 - Árvore filogenética construída por meio do método Neighbor-joining obtida através das sequências da região do espaçador interno transcrito do rRNA (ITS 1 e 4) dos doze isolados de *C. tenuissimum*.....37
- Figura 7 - Árvore filogenética construída por meio do método Neighbor-joining obtida através das sequências da região EF1 dos doze isolados de *C. tenuissimum*.....38

Figura 8	-	Árvore filogenética construída por meio do método Neighbor-joining obtida através das sequências da região do espaçador interno transcrito do rRNA (ITS) e EF1 dos doze isolados de <i>C. tenuissimum</i>	39
Figura 9	-	Dendrograma obtido pelo método UPGMA utilizando os coeficientes de Jaccard derivado da análise com os 19 marcadores ISSR dos 12 isolados de <i>Cladosporium tenuissimum</i>	42
Figura 10	-	Dendrograma obtido pelo método UPGMA utilizando os coeficientes de Jaccard derivado da análise com os marcadores RAPD dos doze isolados de <i>Cladosporium tenuissimum</i>	43
Figura 11	-	Dendrograma obtido pelo método UPGMA utilizando os coeficientes de Jaccard derivado da combinação dos dados da análise com os marcadores ISSR e RAPD dos 12 isolados de <i>Cladosporium tenuissimum</i>	44

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

- Tabela 1 - Identificação dos isolados fúngicos obtidos: espécie hospedeira, tecido vegetal e localização de origem.....26
- Tabela 2 - Identificação do número de acesso de depósito das sequências dos 12 isolados de *Cladosporium tenuissimum* no Genbank.....29
- Tabela 3 - Média de largura e comprimento dos conídios de cada isolado. Forma conidial mais encontrada e presença ou ausência de septos.....33
- Tabela 4 - Identificação (ID) dos primers ISSR, sequência dos primers, número fragmentos amplificados (N°F), número de fragmentos polimórficos (N°F_P), porcentagem de polimorfismo (%P), conteúdo de informações de polimorfismo (PIC), razão multiplex efetiva (EMR), índice de marcadores (MI).....40
- Tabela 5 - Identificação (ID) e sequência dos primers RAPD, número fragmentos amplificados (N°F), número de fragmentos polimórficos (N°F_P), porcentagem de polimorfismo (%P), conteúdo de informações de polimorfismo (PIC), razão multiplex efetiva (EMR), índice de marcadores (MI).....43

CAPÍTULO III

- Tabela 4 - Efeitos dos óleos de Canela cassia, Capim limão e Manjerição no desenvolvimento *in vitro* de dois isolados de *C. tenuissimum* no diâmetro e inibição.....55

SUMÁRIO.

1. INTRODUÇÃO GERAL	16
REFERÊNCIAS.....	19
CAPÍTULO II - CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOECULAR DE <i>Cladosporium tenuissimum</i> CAUSADOR DE MANCHAS EM FOLHAS E FRUTOS DE CUCURBITÁCEAS NO BRASIL.....	
1. INTRODUÇÃO.	24
2. MATERIAL E MÉTODOS.	25
2.1. Amostragem e isolamento.	25
2.2. Análise morfológica.....	26
2.3. Patogenicidade.....	27
2.4. Extração de DNA.....	27
2.5. Amplificação das sequências.....	28
2.6. Sequenciamento.	28
2.7. Análises Filogenéticas.....	29
2.8. Análise com marcadores ISSR.	30
2.9. Análise com marcadores RAPD.	30
2.10. Análise estatística.....	31
2.11. Resultados e Discussão.	31
4. CONCLUSÃO.	45
REFERÊNCIAS.....	46
ANEXOS.....	49
ANEXO I.	49
CAPÍTULO III - ESTUDO DO EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE O CRESCIMENTO <i>in vitro</i> DE <i>Cladosporium tenuissimum</i>	
1. INTRODUÇÃO.	53
2. MATERIAIS E MÉTODOS.	53
2.1 Descrição do material.....	53

2.2 Análise estatística.....	54
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4. CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.....	57

1. INTRODUÇÃO GERAL

As cucurbitáceas são a segunda maior família das espécies hortaliças, e seus membros estão entre as mais importantes plantas comestíveis do mundo. A família contém aproximadamente 115 gêneros e 960 espécies, que são principalmente cipós herbáceos anuais ou cipós perenes. Dentre esses, nove gêneros e cerca de 30 espécies são utilizados para fins econômicos, destacando-se 15 espécies de abóboras, melões, melancias, chuchus, pepinos entre outros, que são predominantemente cultivadas pelos seus frutos (QUI GUO et al., 2017). Estima-se que o Brasil comercializou 5,4 milhões de toneladas de hortaliças em 2020, sendo 588 mil toneladas referentes ao subgrupo de frutos (melão, melancia, entre outros). O Censo Agropecuário 2017 contou 336 mil estabelecimentos nacionais com horticultura, distribuídos na seguinte ordem: Nordeste (41,0%), Sudeste (28,0%), Sul (16,5%), Norte (9,7%) e Centro-Oeste (4,7%) (AQUINO et al, 2020; BRAINER, 2021).

No Nordeste, o semiárido produz aproximadamente 95% do melão nacional, com o estado do Rio Grande do Norte (RN) respondendo por 66,85%, o Ceará por 13,72% e a Bahia por 10,53% (IBGE, 2017). Segundo os últimos dados publicados para abóboras em 2014, a produção nacional de abóboras e morangas maduras, segundo o Censo Agropecuário, foi de 385 mil t/ano, aproximadamente, numa área estimada em 88.150 hectares. A produção dessas espécies é carente de informações quantitativas, uma vez que grande parte da produção no Brasil é realizada por pequenos e médios produtores. (IBGE, 2020).

Embora a região Nordeste apresente excelentes condições para o cultivo de cucurbitáceas, o setor enfrenta diversos desafios, como a redução da produtividade e da qualidade das frutas, devido às dificuldades fitossanitárias (OSTER et al., 2018); o cultivo contínuo e a expansão das áreas sem o emprego de um manejo efetivo, um grande número de patógenos são identificados como causadores de doenças que podem afetar a qualidade do fruto e sua produção, dentre os quais os principais agentes são vírus, bactérias e fungos.

Os fungos destacam-se como um dos principais causadores de perdas na produção por causarem doenças e devastarem plantações (FERREIRA et al., 2015). Uma das doenças observadas nessas culturas é a mancha foliar, muitas vezes causada por fungos do gênero *Cladosporium*, que foi descrito por Link em 1816, pertencente à família Cladosporiaceae do Filo Ascomycota, e tem a *Cladosporium herbarum* como sua espécie tipo (INDEX FUNGORUM, 2014). Comumente encontrados em todos os tipos de plantas, em outros fungos e detritos, são frequentemente isolados do solo, alimentos, e matérias orgânicas, assim como, são bastante relatados como endofíticos (NASCIMENTO et al., 2015). As espécies de

Cladosporium spp. apresentam grande variabilidade morfológica, possivelmente relacionada a definição imprecisa e abrangente deste gênero (BENSCH et al., 2012).

Diante disso, os estudos de taxonomia convencionais, baseados em dados morfológicos e ecológicos, se tornaram limitados, visto que, além de requererem um taxonomista altamente experiente, demandam muito tempo. Com o avanço e, conseqüentemente, maior disponibilidade das tecnologias de sequenciamento e softwares de análise de DNA, é possível analisar uma grande quantidade de sequências em um curto período de tempo (ZHAO et al., 2018).

Os métodos de análise da filogenética foram originalmente desenvolvidos para estudar a trajetória evolucionária dos organismos. A filogenética é utilizada em várias áreas como a sistemática biológica e da biodiversidade, epidemiologia molecular, identificação da função de genes e identificação de microrganismos (AJAWATANAWONG, 2016).

Estudos de diversidade genética de patógenos vegetais são comumente baseados na descrição da estrutura genética, baseado em um número de isolados aleatoriamente coletados em áreas naturais ou agrícolas, utilizando-se de caracteres fenotípicos ou genéticos. O polimorfismo ou variação intraespecífica é consequência dos processos de mutação, fluxo gênico, deriva genética, recombinação e/ou seleção natural (ZHANG, 2017). Já as sequências de nucleotídeos da região espaçador transcrito interno do rDNA (ITS) apresentam dados importantes sobre a taxonomia e filogenia para as espécies, e podem contar com a associação a outros genes como, por exemplo, EF1 α e β – tubulina e são relatados com maior sucesso e confiabilidade na elucidação de relações filogenéticas (MARQUES et al., 2013).

Nesse contexto, o estudo da diversidade genética baseado em características moleculares, se destaca como uma ferramenta segura e eficaz na caracterização genética de organismos. Os marcadores de DNA que detectam o polimorfismo, baseados na amplificação de DNA, são chamados de marcadores de PCR (Reação em Cadeira da Polimerase). Diversas classes de marcadores podem ser utilizadas para detecção da diversidade genética de microrganismos, tais como o RAPD (DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso) e o ISSR (Repetições de Sequências Simples Intercaladas) (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; POCZAI et al., 2008).

O RAPD consiste em uma técnica não radioativa que necessita de baixa quantidade de DNA (15-25 ng) e nenhum conhecimento prévio da sequência de DNA. Os polimorfismos são detectados de variação na sequência e ocorrem em locais de anelamento do primer, bem como, na variação de comprimento da sequência alvo, localizada em pontos ligação do

primer. Ele apresenta alta praticidade e custo relativamente inferior em comparação a outros marcadores (TURCHETTO-ZOLE et al., 2017).

Os marcadores ISSR são iniciadores compostos por sequências de microssatélites, sequências repetidas de di ou trinucleotídeos, podendo ser ancorados ou não por 1 a 4 bases degeneradas nas extremidades 3' ou 5'. Estes marcadores são largamente utilizados por ser uma técnica de rápida geração de resultados, alta reprodutibilidade, alta taxa de polimorfismo e baixo custo (SHARMA et al., 2014).

Desse modo, a identificação do nível de similaridade genética entre os isolados, via marcadores moleculares, torna mais conclusivos os estudos sobre a diversidade genética de patógenos em potencial e métodos de controle eficientes (SANTOS et al., 2015). Por isso, apesar do controle químico ainda ser bastante utilizado entre os produtores, a adoção desse método para cucurbitáceas – com destaque para o melão – é extremamente limitada devido as exigências fitossanitárias para exportação.

Nesse sentido, estudos voltados para avaliar a eficácia de compostos naturais na inibição do crescimento de patógenos, tais como os óleos essenciais obtidos de plantas, podem ser um caminho mais sustentável no controle de *Cladosporium* spp. Dentre os óleos essenciais já testados para o controle de doenças fúngicas que demonstraram alto potencial de inibição, são citados os extraídos de canela cássia (*Cinnamomum cassia*), capim limão (*Cymbopogon citratus*) e manjeriço (*Ocimum basilicum*).

Diante do exposto, os objetivos desse trabalho foram verificar a caracterização morfológica, avaliar a similaridade genética entre os isolados de *Cladosporium* spp., confirmar a patogenicidade desses isolados em cucurbitáceas, e avaliar a utilização de óleos essenciais como método alternativo de controle em condições *in vitro*.

REFERÊNCIAS.

- AJAWATANAWONG, Pravech. **Molecular phylogenetics: Concepts for a newcomer.** Network Biology, p. 185-196, 2017.
- AQUINO, J. R.; ALVES, M. O.; FÁTIMA, M. V. **Agricultura familiar no Nordeste do Brasil: um retrato atualizado a partir dos dados do Censo Agropecuário 2017.** Revista Econômica do Nordeste, v. 51, p. 31-54, 2020.
- BENSCH, K. et al. **Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales).** Studies in Mycology. 67: 1–94. 2010. BENSCH, K. et al. **The genus *Cladosporium*.** Studies in Mycology 72: 1–401. 2012.
- BRAINER, Maria Simone de Castro Pereira. **Produção de hortaliças na área de atuação do BNB.** 2021.
- DUGAN, F. M.; SCHUBERT, K.; BRAUN, U. **Lista de verificação de nomes de *Cladosporium*.** Schlechtendalia, v. 11, p. 1-103, 2004.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2011/1998.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia. **Censo Agropecuário.** Disponível em:< https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo_agro/resultadosagro/agricultura.html?localidade=41&tema=76490>, v. 5, 2017.
- MARQUES, Marília Wortmann. **Identificação e caracterização de espécies de Botryosphaeriaceae na cultura da mangueira no nordeste do Brasil.** Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Fitopatologia/ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 2013. 87p.
- NASCIMENTO, T. L. et al. **Biodiversity of endophytic fungi in different leaf ages of *Calotropis procera* and their antimicrobial activity.** Fungal Ecology 14: 79-86. 2015.
- OSTER, A. H., et al. (2018). **Luz ultravioleta pulsada no controle de podridão pós-colheita e na qualidade de melão para exportação.** Embrapa Agroindústria Tropical - Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E). (Boletim de pesquisa, 173).
- PEREIRA, M. G.; PEREIRA, T. N. S.; COSTA, F. R. **Marcadores moleculares no pré-melhoramento.** In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (org.) Marcadores moleculares. Viçosa: Folha de Viçosa, p. 103-128, 2009.
- POCZAI, P.; TALLER, J.; SZABÓ, I. **Analysis of phylogenetic relationships in the genus *Solanum* (Solanaceae) as revealed by RAPD markers.** Plant Systematics and Evolution, v. 275, p. 59-67, 2008.
- QIU, Guo et al. **Progresso da pesquisa sobre melhoramento para resistência à murcha de fusarium e oídio em melão.** Boletim de Biotecnologia , v. 33, n. 8,. 14 p. 2017.
- SANTOS, A. P. A et al. **Efeito leishmanicida *in vitro* do látex de *Croton lechleri* (Euphorbiaceae).** Revista de Ciências farmacêuticas Básica e Aplicada, Porto Velho, Brasil., n. 36, v. 3, p. 413-418, 2015.

SHARMA, M, et al. **Development of DArT markers and assessment of diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris, wilt pathogen of chickpea (*Cicer arietinum* L.).** BMC Genomics 15: 454, 2014.

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; et al. **Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, 2017.

ZHANG, H. et al. **Augmentation of biocontrol agents with physical methods against postharvest diseases of fruits and vegetables.** Trends Food Sci. Technol., Jiangsu, China, v. 69, p. 36–45, 2017.

ZHAO, Xin; TIAN, Kun; YAU, Stephen S.-T. **Um novo método eficiente para análise de espécies de fungos usando correlações entre nucleotídeos.** BMC biologia evolutiva, v. 18, p. 1-13, 2018.

CAPÍTULO II - CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOECULAR DE *Cladosporium tenuissimum* CAUSADOR DE MANCHAS EM FOLHAS E FRUTOS DE CUCURBITÁCEAS NO BRASIL.

RESUMO: As cucurbitáceas são amplamente cultivadas na região Nordeste do Brasil, sendo está a maior produtora de melão e melancia do país. Entre novembro e dezembro de 2020 foram coletadas folhas de abóbora (*Cucurbita maxima* L.) e folhas e frutos de meloeiro (*Cucumis melo* L.) com lesões necróticas de moderadas a graves, irregulares e coloração marrom, de fazendas no Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. Um total de 12 isolados fúngicos (quatro de abóboras, um de melancia e sete de melões) foram isolados de folhas e frutos sintomáticos. Para identificação à nível morfológico, foram realizadas análises em microscópio óptico e de varredura. A análise de severidade foi realizada através do ensaio de patogenicidade, 11 isolados foram inoculados em plantas de abóbora e meloeiro em condições de casa-de-vegetação com a metodologia de suspensões de esporos (10^6 conídios/ml⁻¹) associada a câmara úmida. O DNA de cada isolado foi extraído pelo método SDS e submetido à amplificação por PCR das regiões ITS e TEF1 α , para o sequenciamento e identificação à nível de gênero e espécie. A caracterização molecular de isolados foi realizada usando os marcadores ISSR e RAPD. Todos os isolados neste estudo apresentaram características morfológicas semelhantes, quando observadas e avaliadas em microscópico óptico e de varredura. No ensaio de patogenicidade manchas, semelhantes às observadas em plantas doentes no campo, desenvolveram-se nas folhas inoculadas sete dias após a inoculação. Em contrapartida, nenhum sintoma foi observado nas plantas do tratamento controle. A morfologia fúngica foi idêntica à observada nas folhas das plantas doentes em campo, cumprindo assim os postulados de Koch. O teste de patogenicidade foi repetido e produziu os mesmos resultados. Uma árvore filogenética foi construída usando a Análise de Máxima Parcimônia, com as sequências concatenadas (ITS-TEF1 α) no software MEGAX (versão 11.0.8) e todos os isolados foram agrupados no mesmo clado com 99% de similaridade nucleotídica, quando comparados com sequências de isolados de *C. tenuissimum* depositados no GenBank. Para análise de diversidade genética, foram selecionados 19 primers ISSR, gerando 231 marcas, 98% polimórficas, com média de 12,1 por fragmentos por primer. Sete grupos principais foram formados, a 48% de similaridade e o coeficiente de similaridade genética variou de 0,26 a 0,56. Para o RAPD foram selecionados dez primers, que geraram 153 marcas, 100% polimórficas, com média de 15,3 por primer. Oito grupos principais foram formados, a 36% de similaridade, tendo o coeficiente de similaridade genética variando entre

0,10 à 0,46. Quando combinados, geraram oito grupos principais, no nível de 44% de similaridade, e o coeficiente de similaridade genética variou de 0,21 à 0,48. Diante do exposto, recomenda-se que outras pesquisas precisam ser realizadas para determinar a epidemiologia e a extensão do impacto econômico causado por esse patógeno às cucurbitáceas, para desenvolver estratégias de controle da doença.

Palavras chave: Fitopatógeno, Diversidade Genética, Patogenicidade, Mancha Foliar.

CHAPTER II - MORPHOLOGICAL AND MOECULAR CHARACTERIZATION OF *Cladosporium tenuissimum* CAUSING SPOT ON LEAVES AND FRUITS OF CUCURBITS IN BRAZIL.

ABSTRACT: Cucurbits are widely cultivated in the Northeast region of Brazil, being the largest producer of melons and watermelons in the country. Between November and December 2020, pumpkin leaves (*Cucurbita maxima* L.) and melon leaves and fruits (*Cucumis melo* L.) with moderate to severe necrotic lesions, irregular and brown in color, were collected from farms in the State of Rio Grande do Sul. North, Brazil. A total of 12 fungal isolates (four from pumpkins, one from watermelon and seven from melons) were isolated from symptomatic leaves and fruits. For identification at the morphological level, analyzes were carried out using an optical and scanning microscope. Severity analysis was carried out using the pathogenicity test, 11 isolates were inoculated on pumpkin and melon plants under greenhouse conditions using the spore suspension methodology (10^6 conidia/ml⁻¹) associated with a humid chamber. The DNA of each isolate was extracted by the SDS method and subjected to PCR amplification of the ITS and TEF1 α regions for sequencing and identification at the genus and species level. Molecular characterization of isolates was performed using ISSR and RAPD markers. All isolates in this study showed similar morphological characteristics when observed and evaluated under optical and scanning microscopy. In the pathogenicity test, spots, similar to those observed on diseased plants in the field, developed on the inoculated leaves seven days after inoculation. In contrast, no symptoms were observed in plants from the control treatment. The fungal morphology was identical to that observed in the leaves of diseased plants in the field, thus fulfilling Koch's postulates. The pathogenicity test was repeated and produced the same results. A phylogenetic tree was constructed using Maximum Parsimony Analysis, with the concatenated sequences (ITS-TEF1 α) in the MEGAX software (version 11.0.8) and all isolates were grouped in the same clade with 99% nucleotide similarity when compared with sequences from *C. tenuissimum* isolates deposited in GenBank. For genetic diversity analysis, 19 ISSR primers were selected, generating 231 brands, 98% polymorphic, with an average of 12.1 fragments per primer. Seven main groups were formed, at 48% similarity and the genetic similarity coefficient ranged from 0.26 to 0.56. For RAPD, ten primers were selected, which generated 153 brands, 100% polymorphic, with an average of 15.3 per primer. Eight main groups were formed, with 36% similarity, with the genetic similarity coefficient varying between 0.10 and 0.46. When combined, they generated eight main groups, at a 44% similarity level, and the genetic similarity coefficient varied from 0.21 to 0.48. In view of the

above, it is recommended that further research needs to be carried out to determine the epidemiology and extent of the economic impact caused by this pathogen to cucurbits to develop strategies to control the disease.

Keywords: Phytopathogen, Genetic Diversity, Pathogenicity, Leaf Spot.

1. INTRODUÇÃO.

Dentre os fatores que limitam a produtividade do meloeiro, destacam-se os danos ocasionados por fungos que possuem alta capacidade de dispersão, persistência e hospedeiros geneticamente próximos a cultura, a exemplo das abóboras (*Cucurbita máxima* L.), que tem grande importância socioeconômica e alimentar – e cultivado em praticamente todos os estados brasileiros, com destaque para os estados de São Paulo, Bahia, Minas Gerais.

Os dados oficiais de produção dessa cultura no país são escassos e não foram inseridos no último Censo Agropecuário do Censo Agropecuário do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Assim, a produção nacional de abóboras e morangas maduras, segundo o penúltimo Censo Agropecuário foi de 385 mil t/ano, aproximadamente, numa área estimada em 88.150 hectares (IBGE, 2020). Os últimos dados apresentados pela Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas (ABCSEM, 2014) estimam que a produção brasileira gerou 726 mil t/ano somente de abóboras japonesas e 551 mil t/ano de abobrinhas.

Mesmo nesse contexto, com uma diferença entre os dados, é evidente que as abóboras, de maneira genérica, estão entre as cinco principais hortaliças produzidas no Brasil, predominantemente entre pequenos e médios agricultores. Como é o caso do semiárido nordestino, onde o cultivo dessas culturas ocorre em ciclos consecutivos e, muitas vezes, em áreas sem o emprego de manejo adequado, gerando problemas causados por diversos fungos, a exemplo do gênero *Cladosporium* spp., que possui distribuição cosmopolita, em que suas espécies são reconhecidas como importantes agentes na decomposição, deterioração e causadores de alergias no homem e doenças em animais e plantas.

Uma das características da atuação do patógeno é a presença de manchas marrons na superfície das folhas, as quais, sequencialmente, tornam-se áreas necrosadas, podendo provocar a desfolha das plantas doentes. Consequentemente, ocorre a diminuição da área verde das folhas e assim a redução do potencial fotossintético da planta, bem como as absorções e metabolismos nutricionais desta. A penetração dos conídios na planta ocorre por via estomática, e o fungo apresenta várias raças fisiológicas, o que dificulta a identificação e o emprego de métodos de controle eficientes (BENSCH et al., 2012).

Essa identificação dos fungos geralmente é baseada em sua morfologia tanto macro quanto microscopicamente. No entanto, este método apresenta limitações por não fornecer informações suficientes no processo de distinção de espécies, que são morfologicamente próximas, visto que, estas características podem variar conforme as condições ambientais, meio de cultura, substrato e condições de incubação. Nessa perspectiva, muitas vezes, se

apresenta certa dificuldade aos taxonomistas em determinar quais as características fenotípicas que realmente delimitam um gênero ou espécie (OLIVEIRA, 2011; SANTOS et al., 2010; GUARRO et al., 1999).

Diante disso, as técnicas moleculares vêm sendo amplamente utilizadas para a identificação de fungos, técnicas como a da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), permite à amplificação de fragmentos específicos de DNA de células fúngicas (LAZAROTTO et al., 2013). Uma das regiões mais utilizadas para a identificação molecular de fungos é a região do “Espaçador interno transcrito” (ITS), que faz parte da estrutura do gene do RNA ribossômico. Essa região possui sequências mais conservadas filogeneticamente e, portanto, são mais adequados para estudos de biodiversidade (REIS JUNIOR, et al., 2006). Uma das vantagens de se usar sequências de RNAr é sua disponibilidade em bases de dados, o que permite a comparação com outras sequências depositadas (YURI et al., 2022).

Entretanto, o sequenciamento de apenas uma região não é, sempre, suficiente para identificação em nível de espécie, ou uma determinada região é mais eficiente na identificação de alguns organismos. De acordo com Geiser et al. (2004), o gene que codifica o “Fator de Elongação 1-alpha” (EF1- α) tornou-se o marcador mais usual, visto que é um gene de cópia única, altamente informativo entre espécies relacionadas. A região do fator de alongação é altamente conservada e está envolvida na tradução, sendo recentemente muito utilizada para estudar a variação intra e interespecífica, bem como para análises de filogenia de uma grande variedade de grupos de microrganismos (O’DONNELL et al., 2015).

Portanto, o objetivo deste estudo foi analisar a patogenicidade e confirmar por meio de sequenciamento de DNA, o agente casual da mancha marrom em plantios comerciais de melão e abóbora, coletados de diferentes áreas de produção, no estado do Rio Grande do Norte.

2. MATERIAL E MÉTODOS.

2.1. Amostragem e isolamento.

Foram coletadas amostras de folhas de abóbora (*Cucurbita máxima* L.) e folhas e frutos de meloeiro (*Cucumis melo* L.), ambas com lesões necróticas moderadas a graves, irregulares e marrons, provenientes de fazendas no estado do Rio Grande do Norte, Brasil. Essas amostras foram levadas ao Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia I, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), localizado no município de Mossoró-RN, onde foram devidamente identificadas e acondicionadas em sacos plásticos.

Foi utilizado o método indireto de isolamento, onde fragmentos dos tecidos com sintomas foram selecionados e desinfestados superficialmente em álcool etílico 70%, hipoclorito de sódio 0,5% e lavagem final em água estéril (CAROLLO; FILHO, 2016). O plaqueamento desses fragmentos foi realizado em placas de Petri com meio BDAS (batata-dextrose-ágar), acrescido de tetracilina (0,05g/L), entre os meses de novembro e dezembro de 2020. Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa incubadora a 28 ± 2 °C, inicialmente por sete dias para o crescimento das colônias fúngicas e obtenção das culturas puras. Foram obtidos 11 isolados fúngicos (quatro de abóboras e sete de melões) (Tabela 1).

Tabela 1 - Identificação dos isolados fúngicos obtidos: espécie hospedeira, tecido vegetal e localização de origem.

Isolados	Espécie Hospedeira	Tecido Vegetal	Localização
CMX01	Abóbora	Folha	Baraúna/RN
CMX02	Abóbora	Folha	Baraúna/RN
CMX03	Abóbora	Folha	Baraúna/RN
CMX04	Abóbora	Folha	Baraúna/RN
CLA05	Melancia	Folha	Jandaíra/RN
CML07	Melão	Fruto	Jandaíra/RN
CML08	Melão	Folha	Jandaíra/RN
CML09	Melão	Folha	Jandaíra/RN
CML10	Melão	Folha	Jandaíra/RN
CML11	Melão	Folha	Jandaíra/RN
CML12	Melão	Folha	Jandaíra/RN

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

2.2. Análise morfológica.

Após a obtenção de culturas puras, a análise das características morfológicas foi realizada por meio da utilização de microscópio óptico e microscópio eletrônico de varredura. Os conídios foram suspensos em água destilada, e a suspensão de esporos foi posta em uma

lamínula, seca em estufa, durante 1 hora a 30 °C. Suas estruturas foram verificadas conforme (Pat) Griff. & Maubl., e o tamanho médio de 600 conídios foram mensurados conforme (YILDIZ et al., 2014) utilizando o software Image J, versão 1.52a. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-knott a 5 % de probabilidade pelo programa Sisvar versão 5.7 (Build 91).

2.3. Patogenicidade

O experimento de patogenicidade foi conduzido em duplicata em casa de vegetação, localizada no Centro de Ciências Agrárias da UFERSA, no período de fevereiro a junho de 2021. Foi utilizado o método de suspensões de esporos (10^6 conídios/ml⁻¹) (Know et al., 1999), com uma amostra total de 140 plantas de melão e 140 plantas de abóbora, sendo uma planta por vaso, em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 11 tratamentos para cada cultura, mais o controle, com 5 repetições para cada. Cada tratamento representou um isolado de *Cladosporium* spp., e água destilada esterilizada para o grupo controle. A inoculação das plantas ocorreu 15 dias após a semeadura.

A avaliação da severidade da doença se deu aos 15 dias após a inoculação, utilizando a escala de notas proposta por Ambrósio et al. (2015), em que: 0 = sem sintoma; 1 = 3 % de tecidos infectados; 2 = 10 % de tecidos infectados; 3 = 25 % de tecidos infectados; 4 = 50 % de tecidos infectados; e 5 = planta morta.

A normalidade dos dados foi testada e os valores foram submetidos a análise de variância (ANOVA). As médias dos valores da severidade da doença foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$), usando o R software estatístico v. 3.6.1 (R Core Team, 2019).

2.4. Extração de DNA.

O DNA genômico dos fungos isolados foi extraído seguindo o protocolo SDS (SMITH et al. 2001), com modificações. Os 11 isolados de *Cladosporium* spp. foram cultivados em meio BDA (Batata-DextroseÁgar) + tetraciclina (0,05g/L) em placa de Petri; mantidos em estufa tipo DBO a 28 ± 2 °C, por ± 14 dias até o total desenvolvimento das colônias (CASTELLANI, 1939). O micélio foi macerado com nitrogênio líquido, em cadinho de porcelana até a obtenção de um pó fino, sendo transferido para microtubos de 2,0 mL. Em seguida, foi adicionado o tampão de extração SDS (SDS 10%; Tris-HCl 1 M pH 8,0; NaCl 5 M; EDTA 0,20 M; CTAB 7%; PVP 1%; β -mercaptoetanol 2% e água ultrapura q.s.p) aos tubos, nos quais foram incubados em banho termostático a 60° C por 40 minutos.

Ao fim da etapa, realizou-se a separação de fases com clorofórmio-álcool-isoamílico em centrifuga (24:1). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado álcool isopropílico incubado a -20°C por ± 12 horas. Os tubos passaram por lavagens em álcool 70% e 90%, respectivamente. O pellet obtido foi ressuspensão em solução de RNase (10µg/mL) (Ludwig Biotec, Brasil). A integridade e quantificação das amostras foi verificada em 1g de agarose para cada 100 mL de solução TBE (Tris Borato EDTA), corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL), submetido à eletroforese a 120V por 30 minutos. Posteriormente o gel foi visualizado em fotodocumentador (Proteinsimple, Alphaimager HP) na presença de luz UV.

2.5. Amplificação das sequências.

O DNA dos isolados foi submetido à amplificação por PCR das regiões do ITS e TEF1α com os primers ITS1/ITS4 (White et al. 1990) e EF1-728F/EF1-986R (Carbone and Kohn 1999), respectivamente. A região ITS do fungo isolado foi amplificada usando os primers universais ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e o fator de alongamento EF1-α usando os primers EF1-728F (5' CATCGAGAAGTTCGAGAAGG) e EF1-986R (5' TACTTGAAGGAACCCTTACC).

A amplificação por PCR seguiu o mesmo protocolo para todos os primers, foi realizada em 20 µl de volume final contendo Buffer 1X, 0,2 mM de dNTP, 1U de Taq DNA polimerase, 5 uM de cada iniciador (Genewiz) e 30 ng de cada DNA em termociclador de DNA (Amplitherm), consistindo em uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 50 °C 36 por 1 min e 72 °C por 1 min, e uma etapa final de extensão 72 °C por 10 min.

Os amplicons foram separados por eletroforese em gel de agarose (2%) em tampão TBE 1 X (Tris HCl, Ácido Bórico, EDTA). Um marcador de DNA de 100 pb DNA Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific) e corante de ligação ao DNA 6X DNA Loading Dye (Trans) foi utilizado para visualização, identificação e mensuração do tamanho dos produtos de PCR por eletroforese; visualizados em fotodocumentador (Proteinsimple, Alphaimager HP) sob luz UV. Os amplicons foram purificados com o kit PCR Clean-Up Gel extraction de acordo com o protocolo do fabricante (NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up, MachereyNagel, Brasil).

2.6. Sequenciamento

Os produtos de PCR foram sequenciados pelo método do tipo Sanger em ambas as direções, e a eletroforese realizada em sequenciador automático de DNA ABI 3730 DNA Analysis. As sequências obtidas foram submetidas a busca por similaridades no banco de dados do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov), com o software BLAST (Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local) (Tabela 2).

Tabela 2 - Identificação do número de acesso de depósito das sequências dos 12 isolados de *Cladosporium tenuissimum* no Genbank.

Isolados	Nº Acesso no Genbank	
	ITS	TEF1
CMX01	OP493556	OP536836
CMX02	OP493555	OP536837
CMX03	OP493554	OP536838
CMX04	OP493553	OP536839
CLA05	OP493552	OP536840
CML06	OP493551	OP536841
CML07	OP493550	OP536842
CML08	OP493549	OP536843
CML09	OP493548	OP536844
CML10	OP493547	OP536845
CML11	OP493546	OP536846
CML12	OP493545	OP536847

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

2.7. Análises Filogenéticas

As sequências depositadas no Genbank que apresentaram maior similaridade foram baixadas e alinhadas através do programa MUSCLE (EDGAR, 2004). Para a construção da

árvore filogenética, foi utilizado o método de Neighbour-Joining (NJ) como base, com 1000 repetições de Bootstrap. Todas as análises foram realizadas no software MegaX versão 10.1.7 (TAMURA et al., 2013).

2.8. Análise com marcadores ISSR

O DNA genômico dos doze isolados de *Cladosporium tenuissimum* foram amplificados via PCR com 19 primers ISSR. As reações de amplificação para os iniciadores RAPD foram realizadas utilizando volumes finais de 12 µL, contendo 10 ng do DNA, 5 µM do primer, 2 mM de cada dNTP, solução tampão de Buffer 1x (50 mM de KCl; 200 mM de Tris-HCl, pH 8,4), 1,5 mM de MgCl₂, 5 µg de BSA e 1 U de Taq DNA polimerase foi submetida à amplificação em termociclador automático (Amplitherm). O programa de amplificação foi composto por uma desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, 40 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 40 segundos; 50°C anelamento por 40 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e após o término dos ciclos, seguiu-se com a temperatura de 72°C por 2 minutos, de extensão final.

Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose a 2% corados com brometo de etídeo (5µL/100mL) submetidos a eletroforese a 120V por ± 120 minutos em tampão TBE 1X. Um padrão de 1 Kb (BioLabs/ New England) foi utilizado como marcador de peso molecular. Os géis foram visualizados e registrados em fotodocumentador na presença de luz UV.

2.9. Análise com marcadores RAPD

O DNA genômico dos doze isolados de *Cladosporium tenuissimum* foram amplificados via PCR com dez iniciadores RAPD. Cada reação de volume final de 25 µL foi composta contendo 10 ng do DNA, 0,2 µM do primer, 2 mM de cada dNTP, solução tampão de Buffer 1x (50 mM de KCl; 200 mM de Tris-HCl, pH 8,4), 1,5 mM de MgCl₂, 5 µg de BSA e 1 U de Taq DNA polimerase foi amplificada em termociclador automático (Amplitherm).

As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: uma etapa a 95°C por 5 minutos de desnaturação inicial, seguida de 40 ciclos de amplificação, consistindo em 92°C por 1 min, 40°C por 1 min de anelamento, 72°C por 2 min de extensão, e uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose a 1,5% corados com brometo de etídeo (5µL/100mL) submetidos a eletroforese a 120V por ± 120 minutos em tampão TBE 1X. Um padrão de 1 Kb (BioLabs/ New England) foi utilizado como

marcador de peso molecular. Os géis foram visualizados e registrados em fotodocumentador na presença de luz UV.

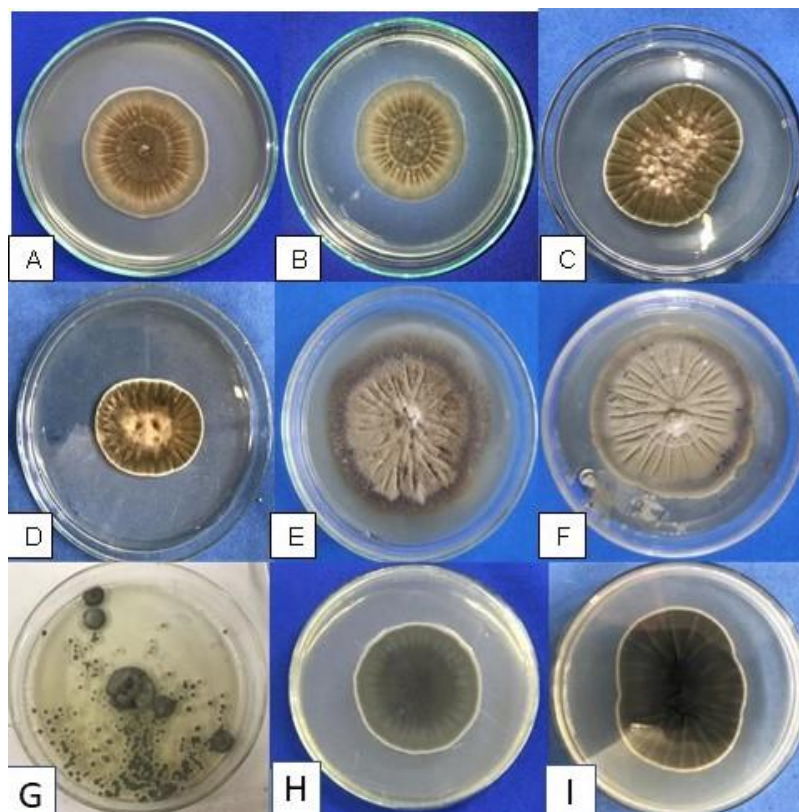
2.10. Análise estatística

Os fragmentos gerados por ambos os marcadores foram convertidos em matrizes de dados binários onde 1 representava a presença da banda no isolado e 0 a ausência. A matriz foi utilizada para calcular o grau de similaridade entre os isolados, através do coeficiente de Jaccard (J). A análise de agrupamento foi realizada através do método UPGMA (Método de grupo de pares não ponderados usando médias aritméticas) no software NTSYSPc. Os valores de PIC (Conteúdo de informações de polimorfismo), EMR (Taxa multiplex efetiva) e MI (índice de marcadores), foram calculados de acordo com Chesnokov e Artemyeva (2015).

3. Resultados e Discussão

A análise dessas observações subsidiou a conclusão de que, após o desenvolvimento de culturas puras, os isolados produziam colônias de coloração cinza-escuro a verde-oliva, textura aveludada, cercadas por hifas branco-acinzentadas (Figura 1), semelhantes as descritas por Menezes et al, (2017). Os fungos pertencentes ao gênero *Cladosporium* são denominados fungos demácios, mielinizados ou pretos, por apresentarem coloração naturalmente escura em decorrência da presença de pigmento melânico (di-hidroxinaftalenomelanina) em sua parede celular. Este pigmento, além de constituir um elemento fotoprotetor, é considerado um fator de virulência do fungo, uma vez que protege os organismos do estresse ambiental, do antagonismo de outros organismos e da limitação de nutrientes (ZAITZ et al., 2012; SIDRIM e ROCHA, 2012).

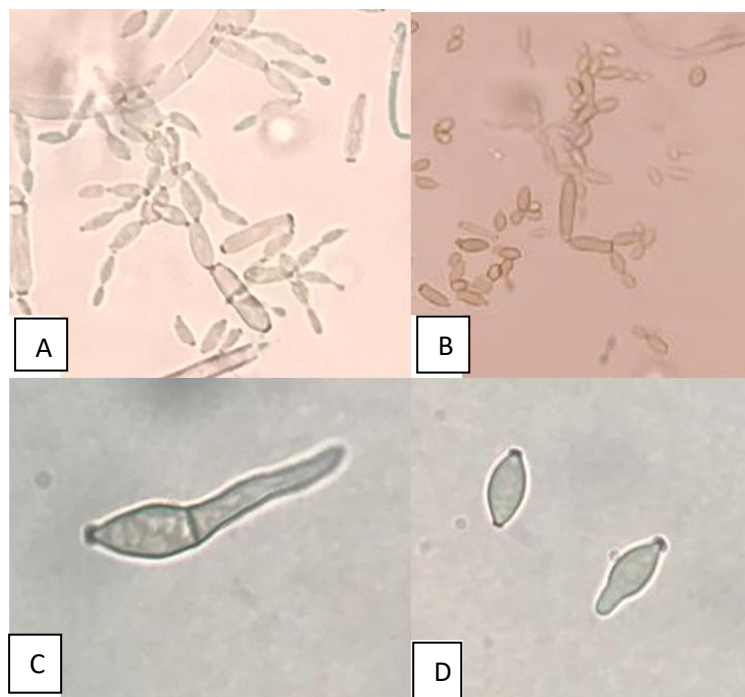
São fungos de crescimento lento, atingindo crescimento máximo em placa dentro de 14 a 21 dias. Caracterizam-se pela produção de colônias efusas ou ocasionalmente puntiformes, com superfícies planas, aveludadas, circulares, de crescimento lento e enrugado, que vão do verde oliva ao marrom escuro e reverso preto (Figura 1) (TAMSIKAR et al., 2006).



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Figura 1 - Imagens de colônias de *Cladosporium* spp. cultivados em meio BDA isolados de folhas de abóbora (A e B), de frutos de melão (C e D), e de folhas de meloeiro (E e F), imagens de colônias efusas ou puntiformes de *Cladosporium* spp. (G) e, o reverso escuro de colônias de isolados cultivados em meio BDA (H e I) obtidos de plantios comerciais do Rio Grande do Norte.

Todos os isolados deste estudo produziram conidióforos altos, escuros, eretos, ramificados irregularmente no ápice, conídios escuros, com nenhum a três septos, variáveis em forma e tamanho, formando cadeias frequentemente ramificadas (Figura 2) com 2 a 3,5 μm de diâmetro (Tabela 3). Os conídios podem estar dispostos em cadeias, sendo catenulados ou, muitas vezes, solitários em algumas espécies (Figura 3), onde os conídios são mais largos, assumindo as formas ovóides, doliformes, elipsóides ou esféricas (BENSCH et al., 2012).



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

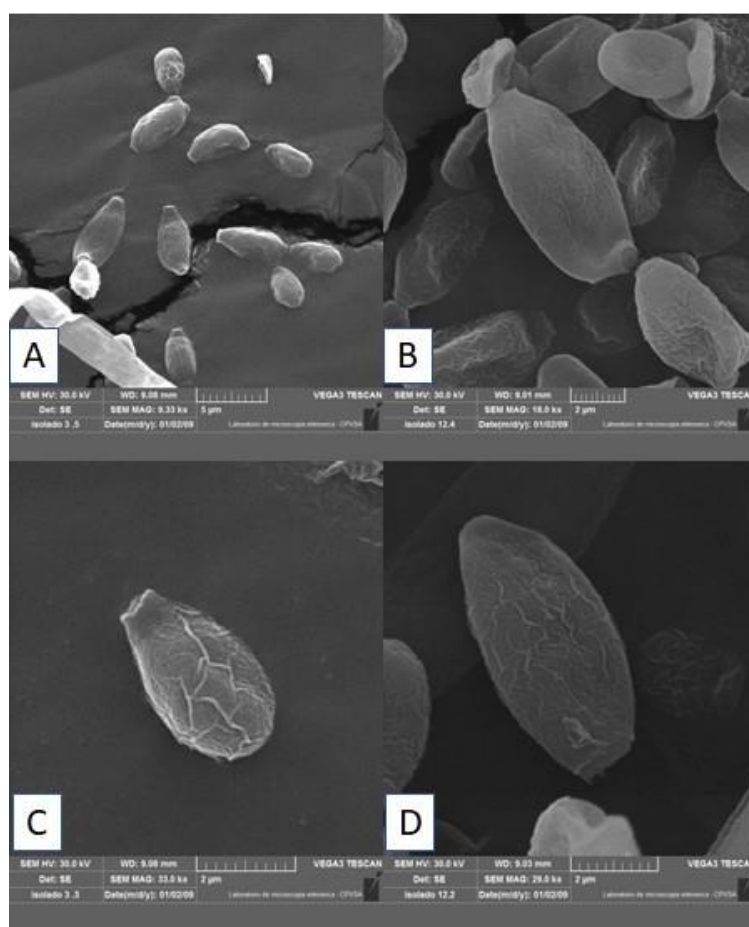
Figura 2 - Conídios de *Cladosporium spp.* em diferentes estágios de desenvolvimento, ramificados (A e B), e solitários e em processo de germinação de hifa (C e D), todos com coloração escura, visualizados em microscópio óptico.

Tabela 3 - Média de largura e comprimento dos conídios de cada isolado. Forma conidial mais encontrada e presença ou ausência de septos.

Isolados	Conídios		Forma mais encontrada	Presença de septos
	Largura (μm) ³	Comprimento (μm) ³		
CMX01	1.06 d	2.20 d	Doliformes	0-2
CMX02	1.20 c	2.66 c	Doliformes	0-2
CMX03	1.23 c	2.44 d	Ovoides	0-3
CMX04	1.26 c	2.56 c	Doliformes	0-3
CML06	1.32 b	2.69 c	Esféricos	0-1
CML07	1.60 a	3.15 b	Ovoides	0-3

CML08	1.25 c	2.39 d	Doliformes	0-1
CML09	1.19 c	2.54 c	Esféricos	0-2
CML10	1.23 c	2.68 c	Esféricos	0-3
CML11	1.21 c	2.96 b	Doliformes	0-2
CML12	1.32 b	3.41 a	Doliformes	0-2

Fonte: Elaborado pelo autor (2023). Letras diferentes na mesma coluna difere significativamente ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste de Scott Knott.

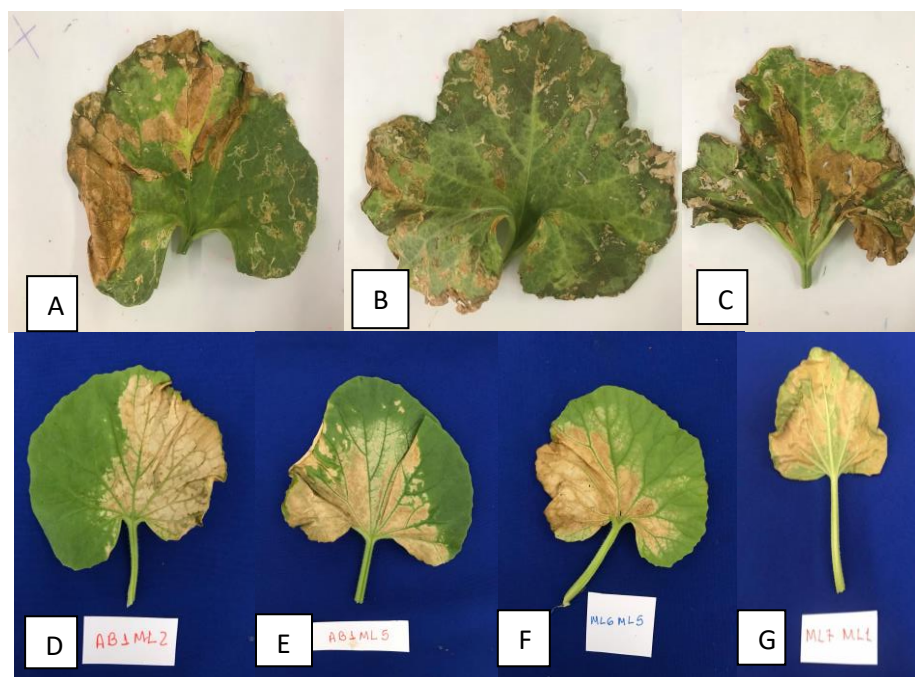


Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Figura 3 - Imagens do agrupamento de conídios de *Cladosporium tenuissimum* (A e B) e, formas morfológicas apresentadas pelos conídios de *C. tenuissimum*, ovoide (C) e doliformes (D) visualizados em microscópio eletrônico de varredura.

Constatou-se após os testes de patogenicidade, sintomas em todas as plantas de abóbora e melão, não havendo preferência por hospedeiro (Figura 4). Pequenas lesões foram observadas já nos primeiros dias (por volta de 5 a 7 dias), após a inoculação nas plantas,

sendo também constatadas manchas marrons em grande parte das bordas das folhas e pontos de frutificação do fungo, na parte abaxial que, posteriormente, desenvolveram-se de forma severa. Nas plantas que mais sofreram com ataque do fungo, havia necrose e murcha. Plantas do tratamento controle não desenvolveram nenhum tipo de lesão. A descrição desses sintomas possui semelhanças ao relato descrito por Xie et al. (2022), em seus ensaios de patogenicidade com *Cladosporium tenuissimum* em amendoim.

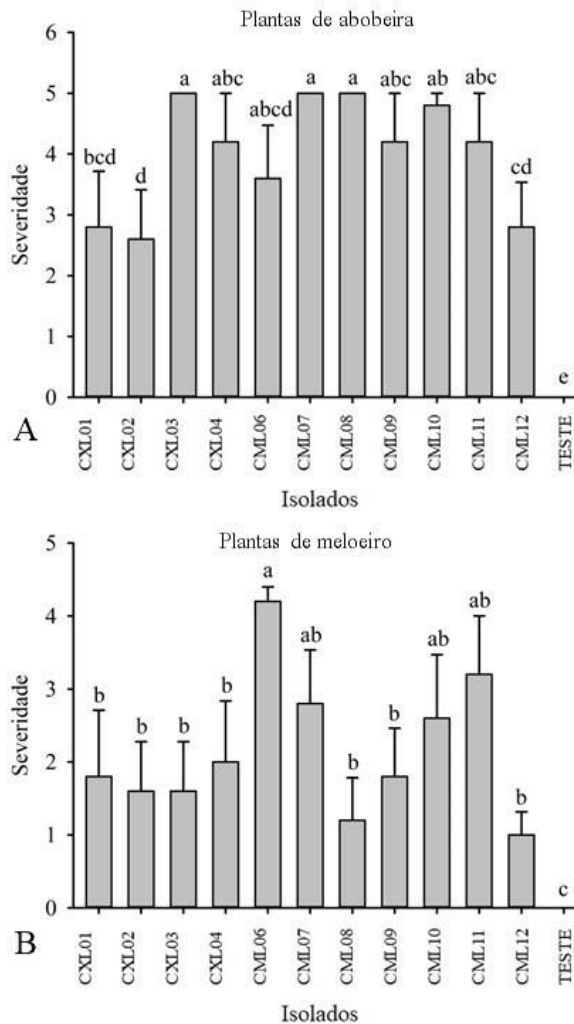


Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Figura 4 - Imagens de folhas sintomáticas do fungo em folhas de melão originalmente doentes (A, B e C) e em folhas das plantas de aboboreiras (D e E) e de meloeiros (F e G) inoculadas em casa de vegetação.

Os fragmentos das folhas que apresentaram lesões similares ao material coletado inicialmente, foram isoladas e produziram colônias com as mesmas características dos isolados preservados, confirmando os postulados de Robert Koch. Autores como Xiao et al., (2022) e Xie et al., (2022) também obtiveram resultados semelhantes, onde os isolados por eles testados apresentaram potencial de patogenicidade, para jujuba de inverno (*Ziziphus jujuba Mill*, fruto típico da China) e amendoim, respectivamente. Todos os isolados deste estudo foram patogênicos para aboboreira e meloeiro (Figura 5), entretanto, houve variação entre a severidade manifestada. Este resultado evidencia que plantas da família das

cucurbitáceas são susceptíveis e podem servir como hospedeiros para o patógeno *C. tenuissimum*.



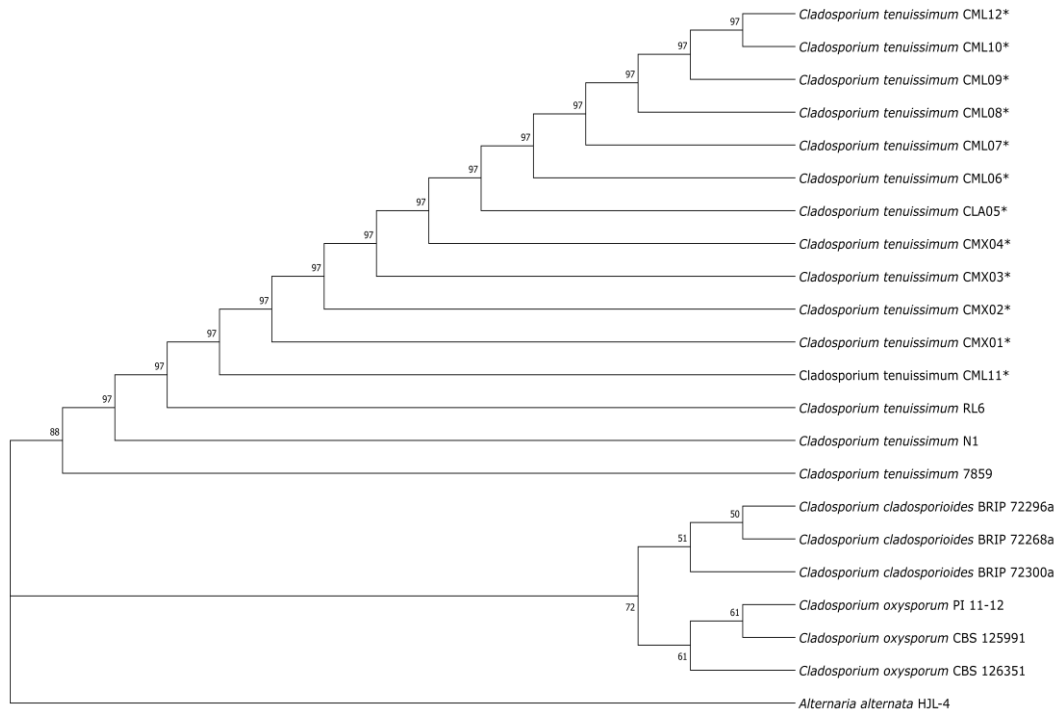
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Figura 5 - Severidade de isolados de *Cladosporium spp.* em plantas de abobeira (A) e em plantas de meloeiro (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

A construção das árvores, para análise filogenética com os primers ITS 1 e 4 serviram como base para classificar os isolados à nível de espécie (Figura 6) (Figura 7), e em conjunto com o primer EF1 para classificar e confirmar o nível de gênero (Figura 8). Desse modo, todos os isolados ficaram no clado de *Cladosporium tenuissimum*, com suporte de bootstrap de 97% para as regiões ITS e EF1 individualmente, e de 99% na análise em conjunto. As sequências modelos foram retiradas do GenBank, sendo esses isolados utilizados como

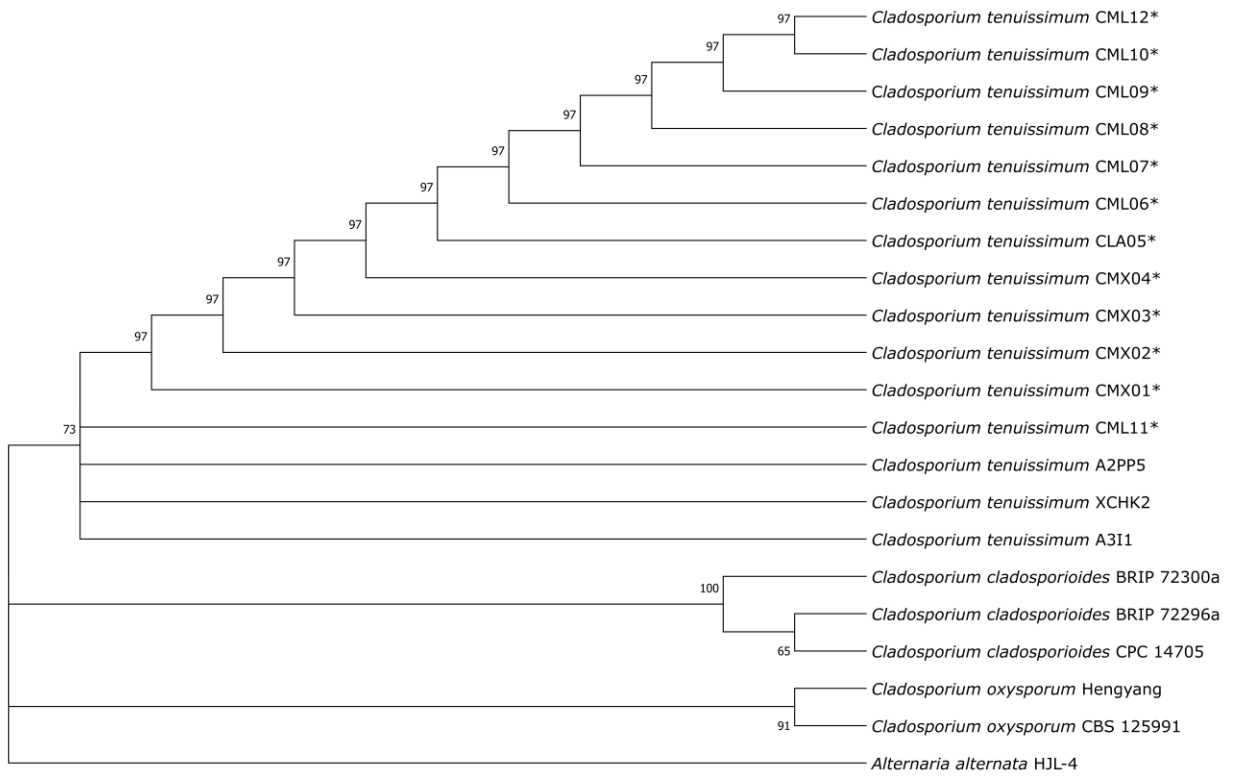
referência para identificação de *Cladosporium tenuissimum*, confirmando uma única espécie para todos os onze os isolados.

Foi possível observar que os isolados não agruparam por hospedeiro e localidade, indicativo de que pode existir alta capacidade de adaptabilidade e, até mesmo, haver mutação dentro da espécie e Geng et al., (2022) utilizaram as mesmas regiões para identificação e obtiveram 99,6% de identidade com *C. tenuissimum*.



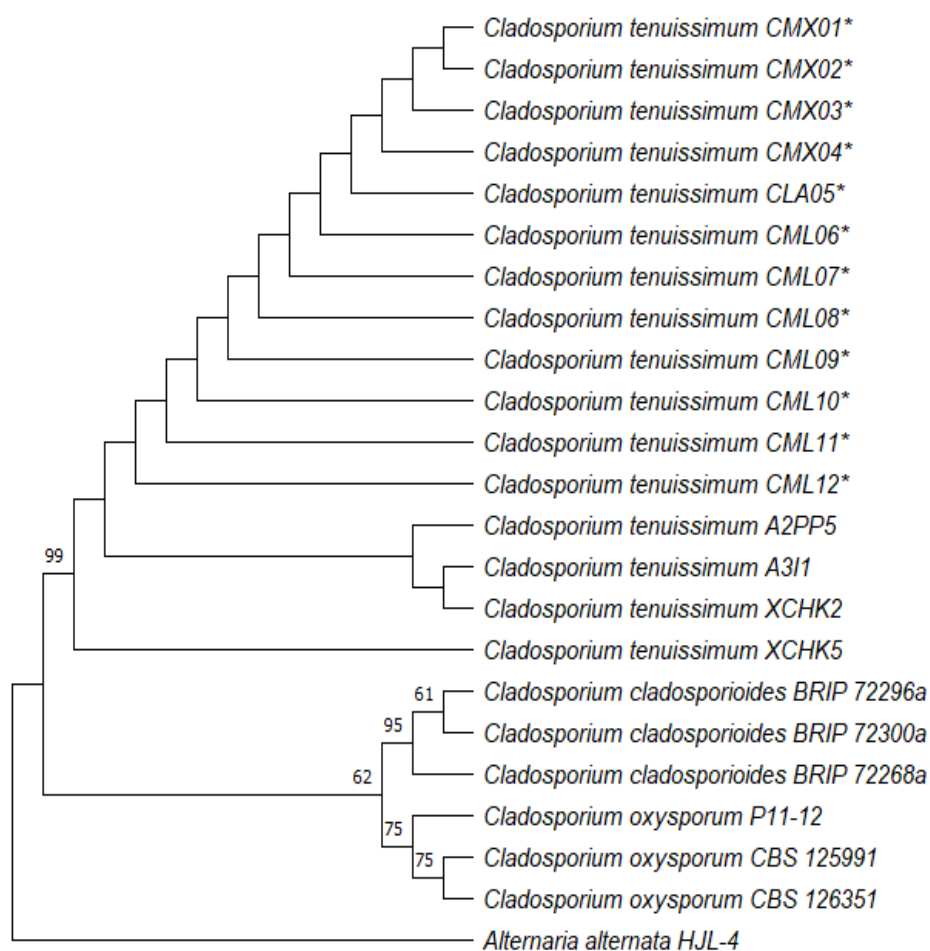
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Figura 6 - Árvore filogenética construída por meio do método Neighbor-joining obtida através das sequências da região do espaçador interno transcrito do rRNA (ITS 1 e 4) dos doze isolados de *C. tenuissimum*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Figura 7 - Árvore filogenética construída por meio do método Neighbor-joining obtida através das sequências da região EF1 dos doze isolados de *C. tenuissimum*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Figura 8 - Árvore filogenética construída por meio do método Neighbor-joining obtida através das sequências da região do espaçador interno transcrito do rRNA (ITS) e EF1 dos doze isolados de *C. tenuissimum*.

Existem muitos relatos de hospedeiros de *C. tenuissimum*, em diversas áreas tropicais e em várias culturas – incluindo o Brasil nos últimos anos (Auer et al., 2010; Rosado et al., 2019; Souza et al., 2020; Santos et al., 2020). Em Cucurbitaceas, o primeiro relato de *C. tenuissimum* foi em 1985 (Narain, et al., 1985), em folhas e frutos de melancia na Índia. Na Coreia, Nam et al. (2015) relataram como agente causal da ferrugem em morangos. O trabalho mais recente de Xu et al., (2023) associa o *C. tenuissimum* como causa para podridão da jujuba de inverno, fruto típico da China.

Utilizando a técnica derivada de PCR, através dos iniciadores ISSR, foi possível obter um total 237 bandas (Tabela 2), sendo 231 (98%) polimórficas, com média de 12,1 bandas polimórficas por primer, onde o mais polimórfico foi o primer ISSR 10 (NF=22) e os menos

polimórficos ISSR 03 e 04 (NF=8, cada). O coeficiente de similaridade genética variou de 0,26 (CMX03 e CML07) a 0,56 (CML10 e CML11).

Estes valores são superiores aos encontrados por Itako et al. (2021), utilizando sete primers ISSR para oito isolados de *Cladosporium fulvum*, quando obtiveram 54 bandas polimórficas, com média de 7,71 bandas polimórficas por primer. Lucentini et al. (2021) num estudo sobre a população de *Fulvia fulva* (syn. *Cladosporium fulvum*, *Passalora fulva*), utilizando oito isolados de *C. Fulvum* e sete primers ISSR, obtiveram 54 amplicons polimórficos (30,86%), os oitos isolados foram agrupados em dois grupos com um coeficiente de similaridade de 0,883 no entanto, nenhuma relação foi encontrada entre clusters e origem geográfica, cultivar de isolamento do patógeno ou raça dos isolados.

Em um estudo com dez isolados de *Sclerotium rolfii*, Dinesh et al. (2022) utilizando quatro primers ISSR e cinco RAPD, mostraram que todos os isolados foram agrupados em dois grupos principais a 6% e 20% de coeficiente de similaridade. Os isolados de *S. rolfii* tiveram uma similaridade de sequência de 98% entre si; 100% com outros isolados em comparação com as sequências recuperadas do NCBI. Este estudo elucidou que marcadores moleculares como RAPD e ISSR podem ser bem empregados para analisar a variabilidade e o índice de polimorfismo em fragmentos de DNA, demonstrando a eficiência do marcador ISSR na análise de diversidade genética para *Cladosporium tenuissimum* do presente estudo.

Nas tabela 4 e tabela 5, os valores de PIC são utilizados para indicar o poder de discriminação e diversidade entre os acessos; foram em média 0,356537 para ISSR (variando de 0,275463 a 0,446181) e 0,32847 para RAPD (variando de 0,302288 a 0,363248). Valores similares foram encontrados por Silva Neto et al. (2022), médias de 0,364 para RAPD e 0,380 para ISSR. Diferentemente, Dinesh et al. (2022) encontraram maiores valores de PIC para os primers ISSR e RAPD com médias de 0,86 e 0,83, respectivamente.

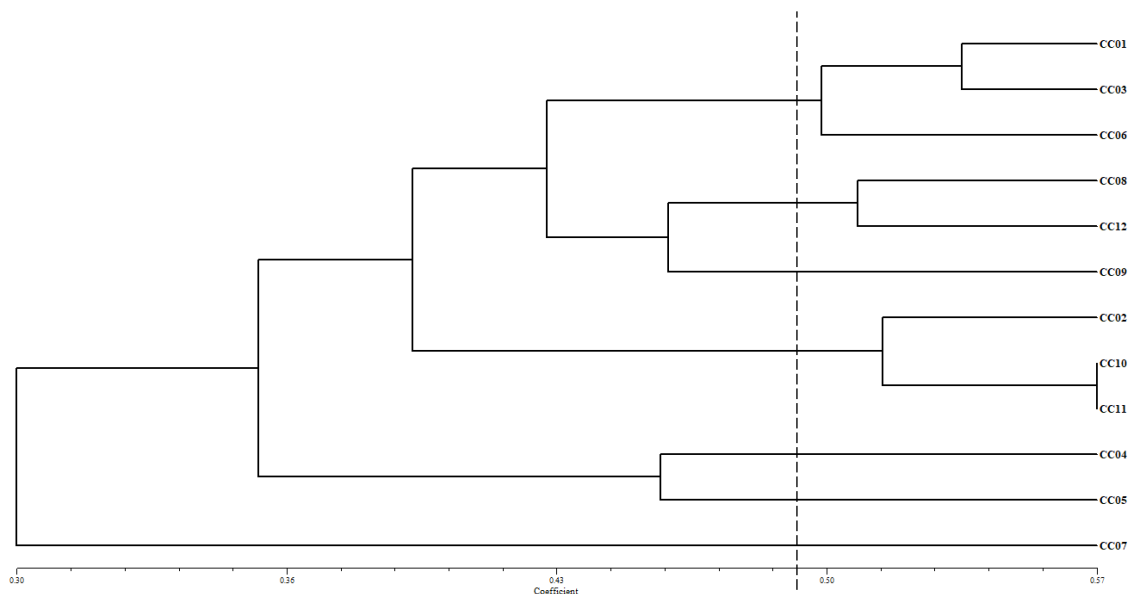
Tabela 4 - Identificação (ID) dos primers ISSR, sequência dos primers, número fragmentos amplificados (N°F), número de fragmentos polimórficos (N°F_P), porcentagem de polimorfismo (%P), conteúdo de informações de polimorfismo (PIC), razão multiplex efetiva (EMR), índice de marcadores (MI)

ID	Sequência	N°F	N°F _P	%P	PIC	EMR	MI
ISSR 01	DiCA3'YG	9	9	100%	0,330247	9,0	3,0
ISSR 03	DiCA5'CY	8	8	100%	0,380208	8,0	3,0
ISSR 04	DiGA3'C	8	8	100%	0,446181	8,0	3,6

ISSR 05	DiGA3'RC	10	10	100%	0,425	10,0	4,3
ISSR 06	DiGA3'T	11	10	91%	0,363889	9,1	3,3
ISSR 07	DiGA5'CR	9	9	100%	0,342593	9,0	3,1
ISSR 10	TriGTG3'YC	22	22	100%	0,313131	22,0	6,9
ISSR 11	TriGTG5'CY	12	11	92%	0,337121	10,1	3,4
ISSR 12	TriTGT3'RC	16	16	100%	0,356771	16,0	5,7
ISSR 13	TriTGT5'CY	12	12	100%	0,373843	12,0	4,5
ISSR 15	TriAAG3'RC	11	11	100%	0,39899	11,0	4,4
ISSR 16	TriATG3'RC	16	16	100%	0,394965	16,0	6,3
ISSR 17	TriACA3'RC	16	15	94%	0,308333	14,1	4,3
ISSR 18	TriAGG3'RC	11	11	100%	0,405303	11,0	4,5
ISSR 21	TriTCC3'RC	11	10	91%	0,322222	9,1	2,9
ISSR 22	TriTGA3'RC	14	14	100%	0,318452	14,0	4,5
ISSR 23	TriCAT3'RC	12	12	100%	0,324074	12,0	3,9
ISSR 24	TriCGA3'RC	14	12	86%	0,275463	10,3	2,8
ISSR 25	TriGAA3'RC	15	15	100%	0,357407	15,0	5,4
Total		237	231	-	-	-	-
Média				98%	0,356537	11,9	4,2

Fonte: Elaborada pelo Autor (2023).

Pelo método UPGMA foi gerado o dendrograma onde os isolados foram distribuídos em sete grupos principais, no nível de 48% de similaridade (Figura 9). No entanto, não foi possível estabelecer um padrão específico para os grupos formados por hospedeiro ou por localização, indicando alta variabilidade entre os isolados. Segundo Martins et al. (2011), isolados podem apresentar padrões distintos dentro da mesma espécie, ao mesmo tempo, que a formação de muitos grupos, representa distância genética dentro de um mesmo grupo.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Figura 9 - Dendrograma obtido pelo método UPGMA utilizando os coeficientes de Jaccard derivado da análise com os 19 marcadores ISSR dos 12 isolados de *Cladosporium tenuissimum*.

Este comportamento também pode ser explicado por mecanismos de recombinação genética, onde a troca de material genético se dá através de mecanismos parassexuais ou, ainda, ocorrer mutações através da coevolução do fitopatógeno com o hospedeiro e os fatores ambientais da região geográfica de localização do fungo (OLIVEIRA & COSTA, 2003).

Dez marcadores RAPD produziram fragmentos bem definidos e polimórficos para a análise de diversidade genética dos isolados de *Cladosporium tenuissimum* (descritos na tabela 5). No total, foram produzidas 153 bandas, 100% polimórficas. A média de bandas polimórficas por primer foi de 15,3, onde o mais polimórfico foi o OPM 04 (NF=20) e o menos polimórfico OPM 10 (NF=13). O coeficiente de similaridade genética variou 0,10 (CML07 e CML9) a 0,46 (CML08 e CML09).

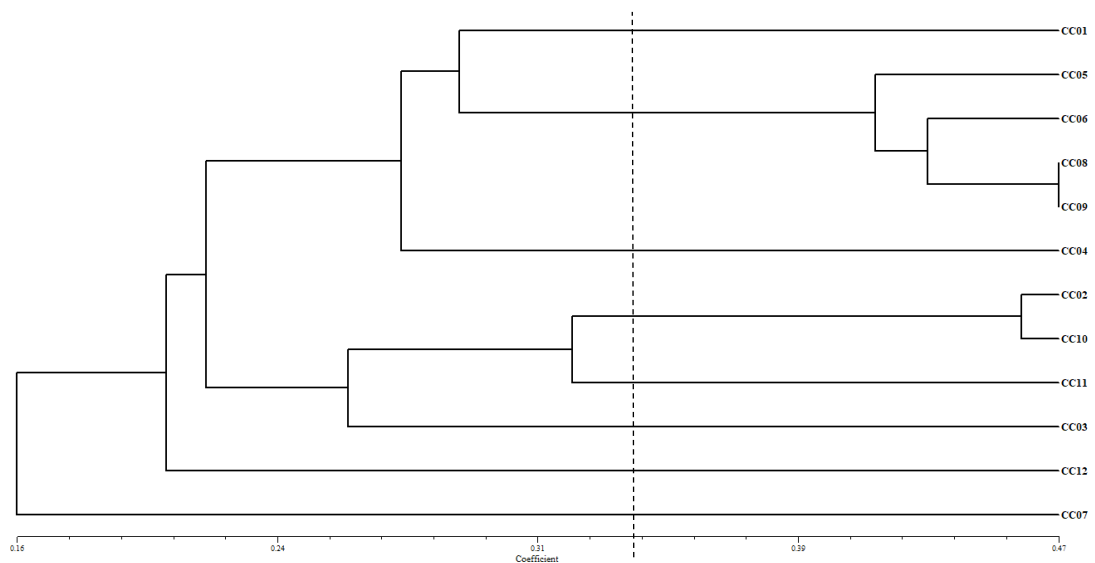
Abass (2016), estudando isolados de *Cladosporium herbarum* e três primers RAPD, obteve um total de 63 bandas amplificadas, 49 bandas foram polimórficas entre o perfil da espécie, com percentual de polimorfismo de 80%, sendo considerado de alto perfil informativo. Em outro estudo, Xavier et al. (2018) obtiveram para dez isolados de *Colletotrichum sublineola*, com dez primers RAPD, 105 bandas polimórficas, com média bandas polimórficas por primer de 10,5. Valores superiores puderam ser observados no presente trabalho, confirmando a eficiência dos marcadores RAPD no estudo da diversidade genética de *C. tenuissimum*.

Tabela 5 - Identificação (ID) e sequência dos primers RAPD, número fragmentos amplificados (N°F), número de fragmentos polimórficos (N°F_P), porcentagem de polimorfismo (%P), conteúdo de informações de polimorfismo (PIC), razão multiplex efetiva (EMR), índice de marcadores (MI).

ID	Sequência	N°F	N°F _P	%P	PIC	EMR	MI
OPM 01	GTTGGTGGCT	15	15	100%	0,341667	15,0	5,1
OPM 02	ACAACGCCTC	17	17	100%	0,302288	17,0	5,1
OPM 03	GGGGGATGAG	19	19	100%	0,322368	19,0	6,1
OPM 04	GGCGTTGTC	20	20	100%	0,307639	20,0	6,2
OPM 05	GGGAACGTGT	15	15	100%	0,316667	15,0	4,8
OPM 06	CTGGGCAACT	11	11	100%	0,314394	11,0	3,5
OPM 07	CCGTGACTCA	15	15	100%	0,339815	15,0	5,1
OPM 09	GTCTTGCGGA	11	11	100%	0,324495	11,0	3,6
OPM 10	TCTGGCGCAC	13	13	100%	0,363248	13,0	4,7
OPM 12	GTCCACTGTG	17	17	100%	0,352124	17,0	6,0
Total		153	153				
			Média	100%	0,32847	15,3	5,0

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

O dendrograma obtido através do método UPGMA com os coeficientes de similaridade de Jaccard dos doze isolados indicou que estes estavam agrupados em oito grupos principais no nível de 36% de similaridade (Figura 10).

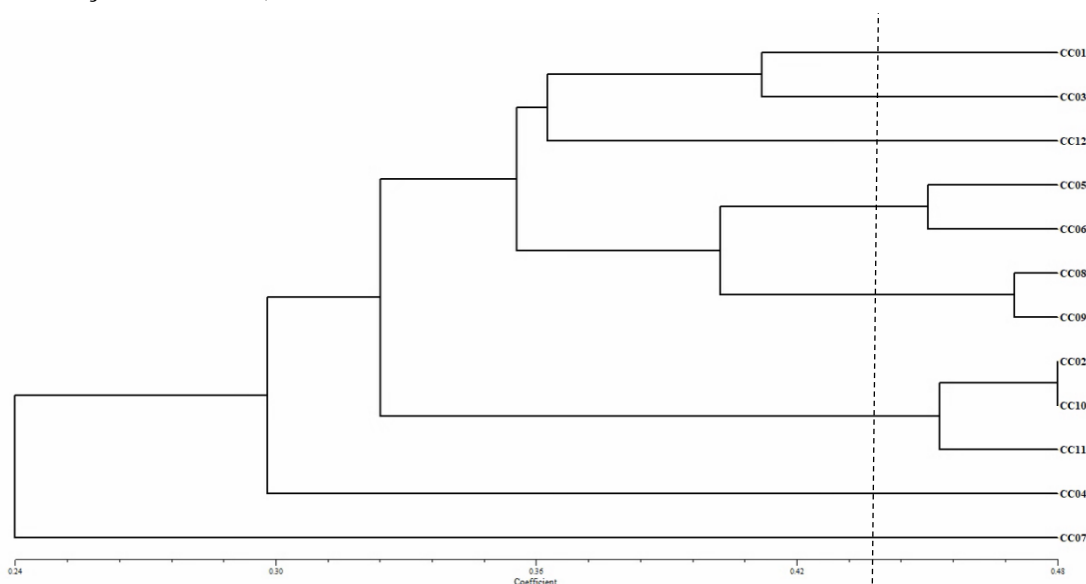


Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Figura 10 - Dendrograma obtido pelo método UPGMA utilizando os coeficientes de Jaccard derivado da análise com os marcadores RAPD dos doze isolados de *Cladosporium tenuissimum*.

Os isolados também não apresentaram correlação, não agrupando por hospedeiro ou localização com os primers RAPD. A alta porcentagem de polimorfismo nos isolados analisados pode justificar esse resultado, onde, Medina et al. (2015), sugere que a espécie que apresenta esse comportamento pode estar em processo evolutivo, podendo ocorrer processos de adaptabilidade ou, até mutações, mesmo em isolados com hospedeiro e localização de origem em comum, o que pode ser importante considerando o número de isolados analisados.

O dendrograma gerado com a combinação das análises dos marcadores ISSR e RAPD pelo método UPGMA (Figura 11) indicou que os doze isolados de *Cladosporium tenuissimum* estavam ordenados em oito grupos principais no nível de 44% de similaridade (Figura 4). O coeficiente de similaridade genética variou de 0,21 (CMX02 e CML10) a 0,48 (CML07 A CML08). Esses marcadores produziram polimorfismo percentual 98% e 100%, para ISSR e RAPD, respectivamente, que são médias altas, e que indicam o poder de discriminação e potencial desses primers em determinar a diversidade genética de isolados fúngicos (Mendonça et al., 2018).



Fonte: elaborado pelo autor (2023).

Figura 11 - Dendrograma obtido pelo método UPGMA utilizando os coeficientes de Jaccard derivado da combinação dos dados da análise com os marcadores ISSR e RAPD dos 12 isolados de *Cladosporium tenuissimum*.

O dendrograma correlacionando os dados obtidos pelos dois primers utilizados mostrou que todos os doze isolados utilizados neste estudo são diversos e distintos entre si, não agrupando por característica já citadas como hospedeiro, tecido lesionado ou localização geográfica de origem, corroborando com os resultados das análises individuais para cada primer.

Diversos autores descrevem a grande capacidade dos marcadores ISSR em caracterizar a diversidade genética de indivíduos, porém trabalhos com a combinação deste marcador com o marcador RAPD, trazem mais resultados com maior porcentagem de polimorfismo encontrado em comparação a ISSR, atribuindo isso à maior capacidade desses iniciadores em acessar mais regiões informativas no genoma, trazendo mais robustez aos resultados tanto da comparação entre os dois marcadores, como também quanto aos resultados que eles apresentam em conjunto (ARIF et al., 2009; GOMES et al., 2009; FAN et al., 2010; TANYA et al., 2011; ABADIO et al., 2012; SILVA NETO et al., 2023).

Os resultados obtidos neste trabalho fornecem informações importantes aos produtores de melão e abóbora da região em razão de haver pouca produção de conhecimento sobre esse fitopatógeno, que atua diretamente como causador de manchas foliares em várias culturas. Portanto, o conhecimento do agente casual é importante para futuros estudos de medidas de controle fitossanitário, para que haja o manejo adequado da cultura e êxito na produção.

4. CONCLUSÃO.

Os isolados utilizados neste estudo são patogênicos variando em níveis de severidade para aboboreira e meloeiro, comprovando que *C. tenuissium* é um patógeno causador de mancha marrom.

Os isolados utilizados no estudo foram sequenciados e suas sequências apresentaram 99% de similaridade para *Cladosporium tenuissimum*, quando depositadas no GenBank.

Nesse estudo foi verificado que ambos os marcadores, ISSR e RAPD são satisfatórios na detecção da diversidade genética dos microrganismos estudados.

AGRADECIMENTOS.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS.

- AMBRÓSIO, M. M. Q., et al. **Screening a variable germplasm collection of Cucumis melo L. for seedling resistance to Macrophomina phaseolina.** Euphytica, v.206, p.287- 300, 2015.
- BENSCH, K. et al. **Species and ecological diversity within the Cladosporium cladosporioides complex (Davidiellaceae, Capnodiales).** Studies in Mycology. 67: 1–94. 2010. BENSCH, K. et al. The genus Cladosporium. Studies in Mycology 72: 1–401. 2012.
- CAROLLO, E. M., FILHO, H. P. S. **Manual básico de técnicas fitopatológicas.** Embrapa Mandioca e Fruticultura – Manuais - Bases de Dados da Pesquisa Agropecuária, 2016
- CASTELLANI, A., **Viability of some pathogenic fungi in distilled water.** J. Trop. Med. Hyg. 42, 225-226, 1939.
- GEISER, David M. et al., FUSARIUM-ID v. 1.0: a **DNA sequence database for identifying Fusarium.** European journal of plant pathology, v. 110, p. 473-479, 2004.
- GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A. M., **Developments in fungal taxonomy.** Clinical microbiology reviews, v. 12, n. 3, p. 454-500, 1999.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário 2017,** Disponível em:< https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo_agro/resultadosagro/agricultura.html?localidade=41&tema=76490> v. 5, 2020.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção de Melão no Brasil.** Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/melao/br>>. 2022.
- LATHA, P., V. et al., **First report of Lasiodiplodia theobromae (Pat.) Griffon & Maubl causing root rot and collar rot disease of physic nut (Jatropha curcas L.) in India.** Australasian Plant Disease Notes, v.4, p.19– 20, 2009.
- LAZAROTTO, M.; MACIEL, C. G.; MUNIZ, M. F. B., **Ocorrência de Colletotrichum gloeosporioides em camélia no Brasil.** Ornamental Horticulture, v. 19, n. 2, p. 145-148, 2013.
- MENEZES, C. P.; DE LIMA PEREZ, A. L. A.; OLIVEIRA, E. L., **Cladosporium spp: morfologia, infecções e espécies patogênicas.** Acta Brasiliensis, v. 1, n. 1, p. 23-27, 2017.

- O'DONNELL, K. et al., **DNA sequence-based identification of *Fusarium*: current status and future directions.** *Phytoparasitica*, v. 43, p. 583-595, 2015.
- OLIVEIRA, R.J.V.D. et al., **Cladosporium species from hypersaline environments as endophytes in leaves of *Cocos nucifera* and *Vitis labrusca*.** *Mycotax*, v. 129, n. 1, p. 25-31, 2014.
- REIS JÚNIOR, F. B.; TEIXEIRA, K.R. dos S.; REIS, V. M., **Análises de restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) em estudos de diversidade intra-específica de *Azospirillum amazonense* isolado de diferentes espécies de *brachiaria*.** 2004.
- SANTOS, C. et al. **Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts.** *Research in microbiology*, v. 161, n. 2, p. 168-175, 2010.
- SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos [Reimpressão].** 2012.
- SMITH, S. N. et al., **Soil-borne populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum, a cotton wilt fungus in California fields.** *Mycologia*, v.93 p.737-743, 2001.
- TAMSIKAR, J.; NAIDU, J.; SINGH, S. M. **Phaeohyphomycotic sebaceous cyst due to *Cladosporium cladosporioides*: case report and review of literature.** *Journal de Mycologie Médicale*, v. 16, n. 1, p. 55-57, 2006.
- TAMURA, K. et al., 2013. **MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0.** *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.
- XIAO, Y. et al. **First Report of Brown Spot of Dekopon Fruit Caused by *Cladosporium tenuissimum* in China.** *Plant Disease*, v. 107, n. 2, p. 559, 2023.
- XIE, X.-W. et al. **First Report of *Cladosporium tenuissimum* Causing Leaf Spots on Carnation in China.** *Plant Disease*, v. 106, n. 4, p. 1300, 2022.
- XU, X. et al. **Diversity and Pathogenicity of Fungi Associated with Fruit Rot of Winter Jujube in Shandong Province, China.** *Plant Disease*, v. 107, n. 3, p. 794-801, 2023.
- YILDIZ, A., BENLIOGLU, K., BENLIOGLU, HS. **First Report of Strawberry Dieback Caused by *Lasiodiplodia theobromae*.** *Plant Disease*, v.98, n.11, p.1579-1579, 2014.

YURI, J. E.; DE RESENDE, G. M.; COSTA, N. D., **Recomendação de cultivares de melão dos tipos Amarelo e Pele de Sapo em cultivos no verão e inverno no Submédio do Vale do São Francisco.** 2022.

ZAITZ, C. et al. **Compêndio de micologia médica.** In: Compendio de Micologia Medica. 1998. p. 434-434.

ANEXOS.

ANEXO I.

First Report of *Cladosporium tenuissimum* causing spot diseases on leaves and fruits of cucurbits in Brazil.

Izabelle Rodrigues Ferreira Gomes, Jarlan Lucas Santos Silva, Talison Eugênio Costa, Pedro Sidarque Lima Pinto, Washington Luis da Silva, Márcia Michelle Queiroz Ambrosio, and Ioná Santos Araújo Holanda.

Published Online: 1 Feb 2023 <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-22-2388-PDN>

ABSTRACT

Cucurbitaceae crops are widely cultivated in the Northeast region of Brazil, which is the biggest producer of melon and watermelon in the country (Oliveira, 2020). Between November and December 2020 leaves of pumpkins (*Cucurbita maxima* L.) and watermelon (*Citrullus lanatus* L.), and leaves and fruits of melon plants (*Cucumis melo* L.) were collected with moderate to severe necrotic, irregular, and brown lesions from farms in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. Fragments of diseased tissues were cut into small pieces and surface disinfested in 70% ethanol for 30 seconds, then in 2% sodium hypochlorite for 1 minute, and washed in sterile distilled water. Disinfested pieces of tissue were plated on potato dextrose agar (PDA) and incubated for seven days in the dark at 28 ± 2 °C. A total of 12 fungal isolates (four from pumpkins, one from watermelon, and seven from melons) were isolated from leaves and symptomatic fruits. All isolates in this study shared similar morphological characteristics. The colonies were dark gray to olive green in color with a velvety texture and surrounded by gray-white hyphae. The conidiophores were erect, tall, dark, and irregularly branched at the apex containing dark conidia, with 0 to 3 septa, variable in shape and size, forming chains that were often branched, globose, or subglobose with 3 to 4.5 μm in diameter. DNA from each isolate was extracted using the SDS method (Smith et al., 2001) and submitted to PCR amplification of the ITS and TEF1 α regions with the primers ITS1/ITS4 (White et al. 1990) and EF1-728F/EF1-986R (Carbone and Kohn 1999), respectively. The amplicons were sequenced and deposited in GenBank: ITS (OP493545-OP493556) and TEF1 α (OP536836-OP536847). Blastn analysis of the ITS and TEF1 α partial sequences revealed that all 12 isolates belong to the species *Cladosporium tenuissimum*, with 100% nucleotide similarity with sequences of many *C. tenuissimum* isolates deposited in GenBank. A phylogenetic tree was constructed using the Maximum Parsimony Analysis, with the

concatenated sequences (ITS-TEF1 α) on MEGAX software (version 11.0.8) (Tamura et al, 2018). All 12 isolates clustered in the same clade and were closely related to isolates A2PP5, A3I1, and XCHK2 with the respective accession numbers KU605789.1, KU605790.1, and MG873071.1 from GenBank, with 99% bootstrap support. The pathogenicity of the 12 isolates was evaluated in pumpkin and melon plants in a greenhouse. Spore suspensions (10⁶ conidia/ml⁻¹) were sprayed on the leaves of healthy seedlings until runoff, only water was sprayed on control plants as the mock, and five seedlings of each crop (melon and pumpkin) were inoculated in each treatment. All plants were covered with plastic bags for two days. Spots, similar to those observed on diseased plants in the field, developed on the inoculated leaves (after seven days from the inoculation day, no symptoms were observed on plants from the mock treatment) and the fungal morphology was identical to that observed on the originally diseased leaves, fulfilling Koch's postulate. The pathogenicity test was repeated and yielded the same results. The fact that all 12 isolates were pathogenic on pumpkin and melon leaves, indicates that many Cucurbits are susceptible to *C. tenuissimum* infection. Many growers in the region are reporting similar symptoms in their melon plantations and it appears that the disease incidence is getting more severe year after year, based on growers's reports. Therefore, more research needs to be conducted to determine the epidemiology and the extension of the economic impact caused by this pathogen to Cucurbits to develop strategies for disease control. To the best of our knowledge, this is the first report of *C. tenuissimum* causing disease in Cucurbits in Brazil.

REFERENCES:

- Carbone, I. and Kohn, L. M. 1999, *Mycologia*, 91(3), 553.59
<https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061051>
- Oliveira, S. C., et al. 2020, *Brazilian Journal of Development*, 6(4), 22688. 62
<https://doi.org/10.34117/bjdv6n4-436>
- Smith, S. N. et al. 2001, *Mycologia*, 93(4), 737.65
<https://doi.org/10.1080/00275514.2001.12063205>
- Tamura, K. et al. 2021, *Molecular biology and evolution*, 38(7), 3022.68
<https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- White, T.J. et al. 1990, *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315.71
<https://msafungi.org/wp-content/uploads/2019/03/February-2013-Inoculum.pdf>

CAPÍTULO III - ESTUDO DO EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE O CRESCIMENTO *in vitro* DE *Cladosporium tenuissimum*.

RESUMO: O gênero *Cladosporium* spp. possui distribuição cosmopolita e suas espécies são relatadas como importantes agentes na decomposição, deterioração e causadores de alergias no homem, além de doenças em animais e plantas. Porém, a escassez de algumas informações sobre o fungo, pode desfavorecer o monitoramento e o desenvolvimento de frentes para o controle eficiente do patógeno. Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial de controle alternativo com óleos essenciais de canela cássia (*Cinnamomum cassia*), capim limão (*Cymbopogon citratus*) e manjericão (*Ocimum basilicum*) *in vitro*. Foram utilizados isolados coletados em fazendas produtoras de abóbora, melancia e melão das cidades de Baraúna e Jandaíra, no Rio Grande do Norte, Brasil. Para as análises com os óleos essenciais foram realizadas em duplicata com dois isolados (CML06 e CML07), em duas concentrações (0,125% e 0,5%), mais um tratamento com Tween (2%) e o tratamento controle, com dez repetições para cada, totalizando 8 tratamentos. Medições do diâmetro da colônia foram realizadas em duas direções perpendiculares. O isolado CML07 apresentou a maior distância genética dos demais isolados. Para as análises com os óleos essenciais houve inibição total no crescimento *in vitro* nos tratamentos de canela cássia (0,125 e 0,5%), capim limão (0,125 e 0,5%) e manjericão (0,5%) e parciais para manjericão a 0,125%, sendo o isolado CML07 o que mais resistiu ao efeito do óleo. Os resultados observados no presente estudo demonstraram que os óleos essenciais se mostraram como um eficiente método alternativo, para inibir o crescimento *in vitro* dos isolados utilizados neste estudo, com maior eficiência para as menores dosagens de canela cássia e capim limão.

Palavras-chave: Cucurbitáceas, Fitopatógeno, Controle Alternativo, Crescimento Controlado.

CHAPTER III - STUDY OF THE EFFECT OF ESSENTIAL OILS ON THE *in vitro* GROWTH OF *Cladosporium tenuissimum*.

ABSTRACT: The genus *Cladosporium* spp. It has a cosmopolitan distribution and its species are reported to be important agents in decomposition, deterioration and causes of allergies in humans and diseases in animals and plants. However, the scarcity of some information about the fungus may hinder monitoring and the development of fronts for efficient control of the pathogen. In view of the above, the objective of the present study was to evaluate the potential for alternative control with essential oils of cassia cinnamon (*Cinnamomum cassia*), lemon grass (*Cymbopogon citratus*) and basil (*Ocimum basilicum*) *in vitro*. Isolates collected on farms producing pumpkin, watermelon and melon in the cities of Baraúna and Jandaíra, in Rio Grande do Norte, Brazil, were used. For analyzes with essential oils, they were carried out in duplicate with two isolates (CML06 and CML07), in two concentrations (0.125% and 0.5%), plus a treatment with Tween (2%) and the control treatment, with ten replications. for each, totaling 8 treatments. Colony diameter measurements were taken in two perpendicular directions. Isolate CML07 presented the greatest genetic distance from the other isolates. For the analyzes with essential oils, there was total inhibition of *in vitro* growth in the treatments of cassia cinnamon (0.125 and 0.5%), lemon grass (0.125 and 0.5%) and basil (0.5%) and partial for basil at 0.125%, with isolate CML07 being the one that most resisted the effect of the oil. The results observed in the present study demonstrated that essential oils proved to be an efficient alternative method to inhibit the *in vitro* growth of the isolates used in this study, with greater efficiency for lower dosages of cassia cinnamon and lemongrass.

Keywords: Cucurbits, Phytopathogen, Alternative Control, Controlled Growth.

1. INTRODUÇÃO.

Os fungos se destacam como um dos principais causadores de perdas na produção, por causarem doenças e devastarem plantações. Um grande número de patógenos vêm sendo identificados como causadores de doenças que podem afetar a qualidade das culturas e suas produções, dentre os quais os principais agentes são vírus, bactérias e fungos (FERREIRA et al., 2015). A exemplo disso, os fungos do gênero *Cladosporium* spp., que são comuns em regiões tropicais e subtropicais, vêm sendo citados como patógenos com uma ampla gama de hospedeiros, nos quais reduzem a produção e geram perdas econômicas (NUNES et al., 2020).

Diante disto, apesar da eficácia dos fungicidas sintéticos, as preocupações sobre o uso indiscriminado de produtos químicos e a procura por controles alternativos, principalmente por produtores brasileiros que exportam, têm crescido. Várias atividades biológicas dos óleos essenciais são conhecidas, tais como as atividades antimicrobiana e inseticida, enquanto outras vêm sendo descobertas nas últimas décadas, com destaque para a atividade contra parasitos causadores de doenças fúngicas (MELO & CROTTI, 2017).

Portanto, o uso de compostos naturais, como óleos essenciais de plantas, é uma alternativa para controle de doenças e pragas. Assim, dentre os óleos essenciais já testados para o controle de doenças fúngicas, aqueles extraídos de canela cássia (*Cinnamomum cassia*), capim limão (*Cymbopogon citratus*) e manjeriço (*Ocimum basilicum*), demonstraram alta atividade antifúngica (SILVA et al, 2013; PENTEADO et al., 2021; CHAGAS et al., 2021; DIAS et al., 2022).

Nesse sentido, este estudo teve como objetivos verificar a eficácia de diferentes óleos essenciais na inibição *in vitro* do crescimento de dois isolados geneticamente distantes.

2. MATERIAIS E MÉTODOS.

2.1 Descrição do material.

Foram utilizados dois isolados de *Cladosporium tenuissimum* pertencente a micoteca da UFERSA. A seleção dos isolados teve como base dados obtidos a partir de análises de diversidade genética realizadas previamente. O CML06, que em estudos prévios mostrou alta capacidade em causar doença em plantas de melão; e o CML07 que além de causar severidade em plantas de abóbora e melão, demonstrou ser o mais distante geneticamente, diante dos grupos gerados nas análises de diversidade genética, baseadas em RAPD e ISSR.

Foram utilizados os óleos essenciais de canela cássia, capim limão e manjeriço. Foi realizado um delineamento experimental inteiramente casualizado, composto pelos dois isolados, e duas concentrações de cada óleo à 0,125 e 0,5% (As concentrações de óleo utilizadas foram determinadas em testes preliminares), um controle com Tween (2%) e um controle negativo (meio BDA). Foram utilizadas dez repetições para cada tratamento, totalizando 200 placas.

Os meios BDA foram autoclavados por 15 minutos a 121°C e 1 atm. Em seguida, após resfriamento a ± 45 °C, os meios foram misturados com os óleos essenciais e o Tween 2%. Posteriormente, sob condições assépticas, os meios foram colocados em placas de Petri (90 x 90 mm) e, após a polimerização dos meios, discos de 5 mm foram retirados das culturas fúngicas e transferidos para o centro das placas. Em seguida, as placas foram incubadas em BOD (demanda bioquímica de oxigênio) a 28 ± 2 °C para crescimento do fungo.

O crescimento micelial foi avaliado medindo-se o diâmetro da colônia em duas direções perpendiculares após 14 dias.

2.2 Análise estatística

Os dados observados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), tendo suas médias comparadas pelo teste de t (LSD), a 5% de significância. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico Sisvar versão 5.7 (Build 91).

3. Resultados e Discussão

Neste estudo, todas as concentrações dos óleos essenciais a 0,5% inibiram o crescimento micelial nos isolados CML06 e CMX07 de *Cladosporium tenuissimum*. Já na concentração 0,125%, apenas com o óleo essencial de manjeriço houve crescimento do fungo, comprovando, desta forma, que a porcentagem de inibição do crescimento aumenta à medida que a concentração do óleo aumenta (Tabela 1). Todas as concentrações testadas proporcionaram inibições significativas em comparação ao controle, exceto a concentração de 0,125% de manjeriço para os dois isolados. O Tween 2% também teve valores significativos na inibição do crescimento das colônias, quando comparado ao controle e aos demais tratamentos 31,48% para o isolado CML06 e 26,14% para o isolado CMX07.

Podemos ressaltar que mesmo sendo distantes geneticamente, e não agruparem quanto hospedeiro e local de origem, os dois isolados utilizados apresentaram o mesmo

comportamento quando submetidos às análises com os óleos essenciais *in vitro*, o que demonstra a eficiência dos referidos óleos sobre o crescimento micelial do patógeno.

Tabela 1 - Efeitos dos óleos de Canela cassia, Capim limão e Manjerição no desenvolvimento *in vitro* de dois isolados de *C. tenuissium* no diâmetro e inibição.

Tratamentos	Isolado CML06		Isolado CML07	
	Diâmetro (cm)	Inibição (%)	Diâmetro (cm)	Inibição (%)
Canela 0,125%	0,00 d	100 a	0,00 d	100 a
Capim Limão 0,125%	0,00 d	100 a	0,00 d	100 a
Manjerição 0,125%	0,36 c	84,23 b	0,39 c	78,77 b
Canela 0,5%	0,00 d	100 a	0,00 d	100 a
Capim Limão 0,5%	0,00 d	100 a	0,00 d	100 a
Manjerição 0,5%	0,00 d	100 a	0,00 d	100 a
Tween 2%	1,57 b	31,48 c	1,47 b	26,14 c
Controle sem tratamento	2,33 a	0,00 d	2,02 a	00 d

Fonte: elaborado pelo autor (2023). Letras diferentes na mesma coluna difere significativamente ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste t (LSD).

Mitchell et al. (2012), encontraram resultados semelhantes para o óleo de canela no controle fúngico *in vitro* para várias espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*. Dias et al. (2022), apresentaram resultados satisfatórios para o efeito *in vitro* do óleo essencial de capim limão, sobre o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani in vitro*, a partir de 0,2%. Chagas et al. (2021) avaliaram o efeito dos óleos essenciais de manjerição e capim citrolena sobre o desenvolvimento *in vitro* dos fungos *Alternaria solani*, *Curvularia* sp, *Cercospora* sp, onde, comparado a este estudo, obtiveram melhores resultados para o manjerição, com total inibição do crescimento dos patógenos.

Considerando as análises realizadas no presente estudo, foi possível observar que o isolado CML07, além de ter apresentado médias superiores aos demais tratamentos no ensaio de severidade, também apresentou na análise de similaridade, em conjunto a maior distância genética dos demais isolados em estudos prévios. Adicionalmente, este isolado foi o que mais resistiu ao efeito do óleo essencial, sugerindo que esse isolado possui genes que atuam de forma diferenciada dos demais, e que a presença da variação genética observada pode estar associada à maior incidência da doença. Este estudo de inibição do crescimento do patógeno *C. tenuissimum in vitro* corrobora no que tange a evidenciar que medidas de controle podem ser feitas e os óleos extraídos de plantas são eficientes para este propósito.

4. CONCLUSÃO.

Considerando os três óleos testados, e as duas concentrações, os melhores tratamentos para controle *in vitro* de *Cladosporium tenuissimum* foram canela 0,125% e capim limão 0,125%.

Os dados obtidos nesse trabalho podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias de manejo para o ataque do fitopatógeno *Cladosporium tenuissimum*.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS

ABADIO, A. K. et al. **Genetic diversity analysis of isolates of the fungal bean pathogen *Pseudocercospora griseola* from central and southern Brazil.** Genetics and Molecular Research, Viçosa, Brasil, v. 11, p. 1272–1279, 2012.

ABASS, M. H., **Identificação de diferentes patógenos fúngicos da podridão dos frutos da tamareira (*Phoenix dactylifera* L.) usando marcadores ITS e RAPD.** Basra J Date Palm Res , v. 15, n. 1-2, pág. 1-19, 2016.

ABDULLAH, A. A.; DEWAN, M. M.; AL-ABEDY, A. N., **Genetic variation of some isolates of *Cladosporium sphaerospermum* isolated from different environments.** In: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing, 2019. p. 012016.

ABRAFRUTAS. - **ESTATÍSTICA DE EXPORTAÇÕES DE FRUTAS NO PRIMEIRO SEMESTRE DE 2019.** – Abrafrutas. Disponível em: <<https://abrafrutas.org/2019/07/17/estatistica-de-exportacoes-de-frutas-no-primeiro-semester-de-2019/>>.

ARIF, M. et al., **Comparative analysis of ISSR and RAPD markers for study of genetic diversity in Shisham (*Dalbergia sissoo*).** Plant Mol Biol Rep., Uttarakhand, India, v. 27, p. 488–95, 2009.

BABU, B. K. et al. **Identification and detection of *Macrophomina phaseolina* by using species-specific oligonucleotide primers and probe.** Mycologia, v. 99, n. 6, p. 797-803, 2007.

CHAGAS, Lillian França Borges et al. **Efeito do Óleo Essencial do Manjerição e Capim Citronela na Inibição de Fungos Fitopatogênicos da Cultura do Tomate Effect of Essential Oil of Basil and Citronella Grass on the Inhibition of Phytopathogenic Fungi in Tomato Crops.** Brazilian Journal of Development, v. 7, n. 12, p. 120758-120771, 2021.

DIAS, P. P. et al. **Atividade fungitóxica *in vitro* do óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) e controle de *Rhizoctonia solani* em plantas de alface (*Lactuca sativa* L.), cultivar maravilha quatro estações.** Summa Phytopathologica, v. 47, p. 204-208, 2022.

DIAS, R. de; SANTOS, JS dos., **Panorama nacional da produção de melancia.** Embrapa Semiárido-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2019.

- DINESH, K. et al. **Genetic diversity analysis of *Sclerotium rolfsii* employing ITS, ISSR and RAPD markers.** Indian Phytopathology, v. 75, n. 1, p. 259-265, 2022.
- DOGAN, B.; DURAN, A.; HAKKI, E. E. **Phylogenetic analysis of *Jurinea* (Asteraceae) species from Turkey based on ISSR amplification.** In: Annales Botanici Fennici. Finnish Zoological and Botanical Publishing Board, 2007. p. 353-358.
- FAN, J. Y. et al. **Genetic diversity of populations of *Monilinia fruticola* (fungi, Ascomycota, Heliotales) from China.** The Journal of Eukaryotic Microbiology, Beijing, China, v. 57, p. 206–212, 2010.
- FERREIRA, M. E. GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, MAHARACHCHIKUMBURA et al., 20111998.
- GOMES, S. et al. **Assessing genetic diversity in *Olea europaea* L. using ISSR and SSR mark-ers.** Plant Mol Biol Rep., Vila Real, Portugal, v. 27, p. 365–73, 2009.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário.** Disponível em:< https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo_agro/resultadosagro/agricultura.html?localidade=41&tema=76490>. v. 5, 2020.
- ITAKO, A. T. et al. **Controle de *Cladosporium fulvum* em tomateiro por extratos de plantas medicinais.** Arquivos do Instituto Biológico, v. 76, p. 75-83, 2021.
- MENDONÇA, T. F. N. de et al. **Dissimilaridade genética entre linhagens de quiabeiro: caracteres morfológicos e moleculares.** 2018.
- MITCHELL, T. C. de C. C. **Potencial de óleos essenciais de orégano, cravo e canela no controle fúngico *in vitro* e em milho.** 2012.
- NUNES, M. S. et al. **Incidência de fungos fitopatogênicos em frutos e hortaliças comercializadas em Areia-Paraíba.** Brazilian Journal of Development, v. 6, n. 6, p. 36283-36295, 2020.
- OLIVEIRA, V. C.; COSTA, J. L. S. **Compatibilidade vegetativa de nit-mutantes de *Fusarium solani* patogênicos e não-patogênicos ao feijoeiro e à soja.** Fitopatologia Brasileira, v. 28, p. 089-092. 2003.

PENTEADO, Ana Lúcia. **Atividade do óleo essencial de Cinnamomum cassia contra Staphylococcus aureus: revisão.** 2021.

PEREIRA, R. B.; PINHEIRO, J. B.; DE CARVALHO, A. D. F. **Identificação e manejo das principais doenças fúngicas do meloeiro.** 2012.

SEONG, E. S. et al., **Analysis of genetic diversity in the bioenergy crop Miscanthus via ISSR and RAPD markers.** Journal of Crop Science and Biotechnology, v. 25, n. 4, p. 373-379, 2022.

SILVA NETO, J. A. et al. **Morphological, molecular and pathogenic characterization of Colletotrichum gloeosporioides isolated from mango.** Revista Caatinga, v. 35, p. 514-527, 2022

SILVA, J. L. et al. **Essential oil of Cymbopogon flexuosus, Vernonia polyanthes and potassium phosphite in control of bean anthracnose.** Journal of Medicinal Plants Research, v. 9, n. 8, p. 243-253, 2015.

SOUZA, D. C. L. **Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: Uma revisão.** Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 17, n. 3, p. 495–503, 2015.

TANYA P. et al. **Genetic diversity among Jatropha and Jatropha-related species based on ISSR markers.** Plant Mol Biol Rep., Pathom, Thailan, v. 29, p. 252–264, 2011.

WILLIAMS, J. G. K. et al. **DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.** Nucleic acids research, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. **Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification.** Genomics, v. 20, n. 2, p. 176-183, 1994.