

BÁRBARA DE MELO AGUIAR

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, CULTURAL E PATOGÊNICA DE
Didymella bryoniae DE CUCURBITÁCEAS**

**MARINGÁ – PARANÁ – BRASIL
SETEMBRO – 2008**

BÁRBARA DE MELO AGUIAR

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, CULTURAL E PATOGÊNICA DE
Didymella bryoniae DE CUCURBITÁCEAS**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de Doutora.

**MARINGÁ – PARANÁ – BRASIL
SETEMBRO – 2008**

BÁRBARA DE MELO AGUIAR

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, CULTURAL E PATOGÊNICA DE
Didymella bryoniae DE CUCURBITÁCEAS**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de Doutora.

APROVADA em:

Prof. Dr. Álvaro Figueredo dos Santos

Prof. Dr. Ricardo Harakawa

Prof. Dr. Eliezer Rodrigues Souto

Prof. Dr. João Batista Vida
(Co-orientador)

Prof. Dr. Dauri José Tessmann
(Orientador)

À minha mãe, Marli e meu pai, Gilberto, que me deram todo o apoio necessário para concluir mais esta etapa

dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus familiares, irmã Daniela e sobrinho Gabriel, que sempre me apoiaram e torceram pelo meu sucesso.

Aos amigos Márcio Ueda, Sayuri Eto, Mauro J. Moreira, Ronilda Aguiar, Rosa Gabriella Vargas, Fran Gasparotto, Deniria França, Leina, Cláudia, Tatiane e Ricardo, pelos momentos de descontração.

Em especial a Tatiane Cristina A. Alves por toda ajuda e boa vontade demonstrada.

À Ricardo Ribeiro de Oliveira pela ajuda, amizade e companheirismo.

À Cláudia Regina Scapin que se tornou uma irmã pra mim.

A todos que mesmo não sendo citados, tiveram participação em mais essa etapa.

Aos professores Dauri José Tessmann e João Batista Vida pela orientação e co-orientação, além do auxílio e paciência.

Ao professor Adalberto Café Filho da Universidade de Brasília -UnB, que gentilmente cedeu alguns isolados de *Didymella bryoniae* utilizados nos experimentos.

A CAPES pela bolsa concedida.

BIOGRAFIA

BÁRBARA DE MELO AGUIAR, filha de Marli Molina de Melo e Gilberto Gabriel Miguel de Aguiar, nasceu em Resende, Estado do Rio de Janeiro, aos 13 dias do mês de julho de 1974.

Em 1996, iniciou o curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, graduando-se em setembro de 2002.

Em março de 2003, iniciou o curso de Mestrado em Agronomia na área de Proteção de Plantas na Universidade Estadual de Maringá, Paraná.

Em março de 2005, iniciou o curso de doutorado em Agronomia na área de Proteção de Plantas na Universidade Estadual de Maringá, Paraná.

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Agente causal.....	3
2.2. Sinais e sintomas.....	4
2.3. Epidemiologia.....	4
2.4. Perdas nas Culturas.....	5
2.5. Controle.....	6
2.6. Caracterização do patógeno.....	7
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1. Origem dos isolados.....	9
3.2. Culturas puras.....	10
3.3. Preparo do inóculo.....	10
3.4. Identificação e caracterização molecular.....	11
3.4.1. Extração de DNA.....	11
3.4.2. Reação de PCR.....	12
3.4.3. Análise dos dados.....	12
3.5. Caracterização cultural.....	13
3.6. Análise da patogenicidade e virulência dos isolados.....	13
3.7. Análise da Interação dos isolados de <i>D. bryoniae</i> nas hospedeiras pepino e melão.....	16
3.8. Efeito da enxertia de plantas de pepino susceptíveis em plantas de abóbora resistentes na intensidade do crestamento gomoso.....	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4.1. Identificação e caracterização molecular de isolados de <i>D.</i> <i>bryoniae</i>	19
4.2. Caracterização cultural.....	25
4.3. Análise da patogenicidade e virulência dos isolados.....	29

4.4. Análise da Interação dos isolados de <i>D. bryoniae</i> nas hospedeiras pepino e melão.....	33
4.5. Efeito da enxertia de plantas de pepino susceptíveis em plantas de abóbora resistentes na intensidade do crestamento gomoso.....	36
5. CONCLUSÕES.....	38
6. REFERÊNCIAS.....	39
7. APENDICE – sequência de nucleotídeos do rDNA compreendendo as regiões ITS1 e ITS2 e gene 5.8S.....	45

RESUMO

AGUIAR, Bárbara de Melo. **CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, CULTURAL E PATOGÊNICA DE *Didymella bryoniae* DE CUCURBITÁCEAS.** Universidade Estadual de Maringá, setembro de 2008. Professor Orientador : Dauri José Tessmann. Professor Co-orientador: João Batista Vida

O crestamento gomoso, causado pelo fungo *Didymella bryoniae* [anamorfo: *Ascochyta cucumis* (sin.: *Phoma cucurbitacearum*) é uma doença importante para diversas espécies da família Cucurbitaceae. O objetivo deste trabalho foi determinar a extensão da variabilidade molecular, cultural e patogênica de 21 isolados de *D. bryoniae* oriundos de melão (*Cucumis melo*), pepino (*C. sativus*), melancia (*Citrullus lanatus*) e abóbora (*Cucurbita pepo*) obtidos de plantas com sintomas de crestamento gomoso no caule. Adicionalmente, avaliou-se o efeito da enxertia de plantas de pepino japonês, susceptíveis ao crestamento gomoso, em plantas de abóbora resistentes, visando o controle da doença. A análise de seqüências de um segmento do DNA ribossomal, compreendendo as regiões ITS1, ITS2 e o gene 5.8 S, permitiu a identificação molecular das espécies dos isolados, mediante comparação com acessos do *GenBank*, e revelou baixa variabilidade dentre os isolados analisados. Os isolados foram comparados em relação à virulência em sete genótipos de cucurbitáceas (híbridos e variedades de pepino, melão, melancia e abóbora), no entanto o ranqueamento dos isolados em relação à virulência não foi consistente entre os genótipos analisados. A interação entre genótipos do hospedeiro e a virulência do patógeno, baseada na análise de quatro isolados (dois de pepino e dois de melão) em quatro genótipos de pepino e três de melão, não foi significativa quando a inoculação foi realizada no caule, porém foi significativa com inoculação na folha ($P=0,05$). Não foi observada relação entre virulência, aspecto de colônia e agrupamento filogenético dos isolados. A enxertia de híbridos susceptíveis de pepino em um genótipo de abóbora resistente reduziu a severidade da podridão gomosa.

Palavras-chave: crestamento gomoso, cucurbitáceas, *Cucumis sativus*; *C. melo*

ABSTRACT

AGUIAR, Bárbara de Melo. **MOLECULAR, CULTURAL AND PATHOGENIC CHARACTERIZATION OF *Didymella bryoniae* of CUCURBIT.** Universidade Estadual de Maringá, September 2008. Adviser : Dauri José Tessmann. CO-adviser: João Batista Vida

Gummy stem blight, caused by the fungus *Didymella bryoniae* [anamorph: *Ascochyta cucumis* (syn.: *Phoma cucurbitacearum*) is an important disease of several species within the Cucurbitaceae family. The objective of this work was to determine the extent of molecular, cultural, and pathogenic variability among 21 *D. bryoniae* isolates from melon (*Cucumis melo*), cucumber (*C. sativus*), watermelon (*Citrullus lanatus*), and pumpkin (*Cucurbita pepo*). Additionally, it was evaluated the effect of grafting of susceptible cucumber on resistant pumpkin plants on control of gummy stem blight. The analysis of sequences of a portion of ribosomal DNA, containing the regions ITS1 and ITS2, and the 5.8 gene, allowed indirect identification of species; however, it was observed low variability among the isolates. The virulence of isolates was compared based on seven cucurbit genotypes (hybrids and varieties of cucumber, melon, and pumpkin), however the ranks of isolates were not consistent among the genotypes. The interaction between host genotypes and isolate, based on the analysis of four isolates (two isolates from cucumber and two isolates from melon) and seven host genotypes (four cucumber and three melon genotypes) was not significant for stem gummy, but was significant for leaf spot ($P=0,05$). It was not observed relationship among virulence, cultural characteristics and phylogenetic grouping among the tested isolates. Grafting susceptible cucumber on resistant pumpkin reduced severity of stem gummy blight on cucumber.

Keyword: gummy stem blight; *Cucurbitaceae Cucumis sativus*; *C. melo*

1. INTRODUÇÃO

O fungo *Didymella bryoniae* (Fuckel) Rehm [sin. *Mycosphaerella citrullina* (C.O. Sm.) Grossenbach], com o anamorfo *Ascochyta cucumis* Fautrey & Roum. [= *Phoma cucurbitacearum* (Fr.: Fr.) Sacc.] causa podridão gomosa do caule, manchas foliares e podridão de frutos e tem como hospedeiras diversas espécies de *Citrullus*, *Cucumis*, *Cucurbita* da família Cucurbitaceae (KOTHERA et al., 2003).

Dentre essas cucurbitáceas, as mais cultivadas no Brasil são a melancia [*Citrullus lanatus* (Thumb.) Matsum.], com 82 mil ha e o melão (*Cucumis melo* L.), com 15,5 mil ha. A abóbora (*Cucurbita pepo* L.) e o pepino (*Cucumis sativus* L.) têm menor expressão, porém tem grande relevância econômica para algumas regiões do Brasil (FNP CONSULTORIA E COMERCIO, 2000).

Dentre as várias doenças fúngicas que afetam essas culturas está o crestamento gomoso. Essa doença ataca tanto cultivos em campo aberto quanto em ambiente protegido, sendo considerada atualmente a principal doença fúngica nas culturas do meloeiro (RIZZO et al., 2003; TSUTSUMI e SILVA, 2004) e melancia (SANTOS et al., 2005a).

A doença é identificada principalmente pela lesão no caule das plantas com aspecto encharcado e a presença de goma quando em estágio avançado, assim como de pontuações escuras que são os corpos de frutificação do patógeno. Porém, a doença ocorre também em ramos, folhas e frutos. Os ramos também exibem encharcamento com exsudação gomosa parda a cinza circunscrevendo o caule e promovendo a seca da parte localizada acima da lesão. Nas folhas aparecem manchas pardas a marrons, de formato circular. Em frutos as lesões são menos freqüentes, mostrando-se pardacentas, circulares e profundas (KUROZAWA et al., 2005; ZITTER, 2004).

Esse patógeno apresenta um grande número de espécies hospedeiras e estudos realizados em outros países apresentam evidências de ocorrência de variabilidade patogênica (St. AMAND e WEHNER, 1995; KOTHERA et al., 2003). Inclusive, Kothera et al. (2003), com base em marcadores AFLP,

evidenciaram dois grupos dentre uma população de 102 isolados procedentes de diversos países. Sendo que apenas um dos grupos foi categorizado como altamente virulento. Mesmo resultado foi obtido por Somai et al. (2002a) que também identificou dois grupos de virulência entre os isolados de *D. bryoniae* analisados. Assim sendo, visando ampliar o conhecimento sobre a etiologia da podridão gomosa do caule em cucurbitáceas cultivadas no Brasil, o objetivo deste trabalho foi determinar a extensão da variabilidade molecular, cultural e patogênica em isolados de *D. bryoniae* oriundos de melão (*Cucumis melo*), pepino (*C. sativus*) e melancia (*Citrullus lanatus*) com sintomas de podridão gomosa no caule. Para identificação e caracterização molecular foi analisado um segmento do DNA ribossomal, compreendendo as regiões ITS 1, ITS 2 e o gene 5.8S. Um objetivo adicional foi avaliar a eficiência da enxertia de plantas de pepino japonês em plantas de abóbora visando o controle de podridão gomosa. Tais informações serão importantes para o desenvolvimento de estratégias de manejo da doença.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Agente causal

O agente causal do crestamento gomoso do caule, podridão gomosa ou cancro da haste é um parasita necrotrófico facultativo de plantas da família Cucurbitaceae (SVEDELIUS, 1990). Foi descrito pela primeira vez na França em 1891, na fase anamórfica, com o nome de *Ascochyta cucumis* Fautr. & Roum, e mais tarde na fase teleomórfica como *Didymella melonis* Pass. (WIANT, 1945; CHIU e WALKER, 1949). O anamorfo do patógeno já foi denominado *Phyllosticta citrulina* Chester e *Ascochyta melonis* Poteb (CORLETT, 1981 citado por CASTRO, 1994). Atualmente, a fase teleomórfica recebe a denominação *Didymella bryoniae* (Auersw) Rehn, que já teve como sinonímia *Mycosphaerella melonis* (Pass.) Chiu & Walker (KUROZAWA et al., 2005), *Sphaerella bryoniae* Auersw., *Dimosphaeria bryoniae* (Auersw.) Niessl, *D. melonis* Pass., , *Micosphaerella citrulina* (C. O. Sn.) Gross. e *Sphaerella melonis* Ferraris (CORLETT, 1981 citado por CASTRO, 1994). Pertence a subdivisão Ascomicotyna, ordem Dothiales e classe Coelomycetes (KRUGNER e BACCHI, 1995).

Na fase perfeita produz geralmente oito ascósporos em asca. Esses esporos medem entre 14-18 x 4-6 µm, apresentando-se hialinos, monoseptados com leve constrição na região do septo e extremidades arredondadas, com a célula de cima mais larga que a de baixo. As ascas são produzidas em tecido estromático, o ascostroma ou pseudotécio, que é escuro com dimensão entre 125 e 213 µm de diâmetro (SITTERLY e KEINATH, 2000). Como anamorfo pertence ao gênero *Phoma* (sin. *Ascochyta*) (KUROZAWA et al., 2005). Nessa fase, produz conídios hialinos, cilíndricos com extremidades arredondadas, sem ou com um septo e 6-13µm de comprimento. Os conídios são produzidos em corpos de frutificação denominados picnídios com diâmetro entre 120 e 180 µm (SITTERLY; KEINATH, 2000). As colônias do fungo

apresentam micélio aéreo branco e micélio verde oliva quando o substrato utilizado é o batata-dextrose-ágar (BDA) (KEINATH et al., 1995).

2.2. Sinais e sintomas

Os sintomas aparecem na parte aérea das plantas em qualquer estágio de desenvolvimento. Os ramos afetados exibem encharcamento com exsudação gomosa parda a cinza circunscrevendo o caule e promovendo a seca da parte localizada acima da lesão. Nas folhas aparecem manchas pardas a marrons, de formato circular (KUROZAWA et al., 2005; ZITTER, 2004) que se iniciam nos bordos e crescem em direção à nervura principal, com ou sem halo amarelo (VIANA et al., 2002). Em frutos as lesões são menos freqüentes, mostrando-se pardacentas, circulares e profundas. Em estágios mais avançados da doença é possível observar pequenas pontuações escuras e circulares no exudado gomoso ou lesões, que correspondem aos corpos de frutificação do patógeno (KUROZAWA et al., 2005; ZITTER, 2004).

2.3. Epidemiologia

O fungo *Didymella bryoniae* está presente em vários países, tais como Brasil (MATTA et al., 1974), Porto Rico, Cuba, Estados Unidos, Japão (WIANT, 1945) e França (SITTERLY, 1969). Esse patógeno se desenvolve bem em regiões ou épocas de clima mais quente e úmido, onde a temperatura ideal varia de 23 a 25°C (ARNY e ROWE, 1991; PASCHOLATI et al., 1983; VAN STEEKELENBURG, 1982). A umidade relativa ideal é acima de 80% por um período de 24 horas, independente se a umidade foi mais alta no período noturno ou diurno (VAN STEEKELENBURG e WELLES, 1988), sendo que a duração da lâmina de água na superfície das folhas e pecíolo é o fator que mais influencia no rápido desenvolvimento da doença (ARNY e ROWE, 1991). As lesões aparecem, de forma geral entre três e sete dias após a inoculação (FERREIRA e BOLEY, 1992).

Na região de Tocantins, onde as condições variam de 22 a 30 °C e a umidade é em torno de 70%, após quatro dias da inoculação apareceram sintomas de encharcamento no caule e 50 dias após a inoculação os sintomas

foram observados nas folhas, sendo que após 75 dias (coincidindo com época de colheita) a curva de progresso da doença se mostrou exponencial (SANTOS et al., 2005a). Outros fatores como baixa condutividade elétrica e baixa concentração de Cálcio (Ca) também favorecem o desenvolvimento da doença (VAN STEEKELEBURG e WELLES, 1988).

A disseminação de *D. bryoniae* se dá pela água a curtas distâncias e pelo vento à longas distâncias (KUROZAWA et al., 2005), ferramentas de poda contaminadas (VIDA et al., 2004), contato entre plantas e pelo próprio homem (KUROZAWA et al., 2005). Cardoso et al. (1974) relata que a relação entre o surgimento dos ascósporos e o aparecimento dos sintomas indica que a disseminação do patógeno é principalmente pelos esporos da fase perfeita. Entretanto, KUROZAWA et al. (2005), cita que ambos os tipos de esporos, sexuais e assexuais, são capazes de atuar como fonte de inóculo primário.

O patógeno freqüentemente apresenta dilatação na extremidade do tubo germinativo, como um *peg* de penetração, entretanto essa penetração se dá somente por ferimentos e estômatos (SCHENCK, 1962), contrariando Chiu e Walker, (1949) que citam que na a infecção de tecidos jovens, por estes não possuírem uma camada de cera bem desenvolvida, a penetração pode ocorrer de forma direta.

O fungo sobrevive em restos culturais na forma de micélio dormente (KUROZAWA et al., 2005) mantendo sua viabilidade como fonte de inóculo por um período maior que um ano (VAN STEEKENBURG, 1983), mas em ramos enterrados sua sobrevivência chega a 36 semanas, com viabilidade de esporos por um período de até 16 semanas (KEINATH, 2002) e também na semente, tanto na parte externa como interna, nos tecidos cotiledonares, possibilitando a introdução da doença em áreas não infestadas (LEE et al., 1984).

2.4. Perdas nas culturas

No ano de 1973, foi relatado que a podridão gomosa estava provocando um prejuízo superior a 50% nos 50 ha de meloeiro plantados no estado de Pernambuco e paralelamente também em áreas de cultivo no estado da Bahia, ambos na região Nordeste do Brasil (MATTA et al., 1974). Mais recentemente entre os anos de 1990 e 1996 foram relatadas perdas, em condições de

ambiente protegido, que chegaram a 100%, incluindo morte de planta, queda de frutos e redução no brix (teor de açúcar), desvalorizando o fruto para o comércio (VIDA et al., 1996). Na cultura da melancia, em parcelas de testemunhas não tratadas, houve redução de 19,2% na produção de frutos (SANTOS et al., 2005a), o que demonstra a importância da doença na produção de cucurbitáceas.

2.5. Controle

Entre as formas de controle do patógeno *D. bryoniae* encontram-se as medidas culturais, controle químico e alternativo, além do uso de variedades resistentes (KUROZAWA et al., 2005).

Como medidas culturais temos o plantio em locais pouco úmidos e uso de rotação de culturas com plantas não pertencentes à família cucurbitácea e exclusão com uso de sementes sadias (KUROZAWA et al., 2005); enterrio de restos culturais (KEINATH, 2002) e retirada das flores femininas após a formação do fruto (FIGUEIREDO et al., 1970).

O controle químico utilizando fungicidas freqüentemente é ineficiente em melão (KUROZAWA et al., 2005). Em alguns casos os cultivares apresentam resistência ao uso de benomil¹ (KEINATH e ZITTER, 1998a), benzimidazoles (MALATHRAKIS e VAKALOUNAKIS, 1983; KEINATH e ZITTER, 1998 b) e tiofanato metílico (KEINATH e ZITTER, 1998 b). Porém, em associação de difenoconazole + acibenzolar-s-methyl (BTH) foi observado eficiência de controle em melão rendilhado (RIZZO et al., 2003). Entretanto em melancia o uso de fungicidas é mais eficiente. Pulverizações com mancozeb ou clorotalonil em intervalos de 7 dias no início do aparecimento da doença reduz os sintomas afetando positivamente a AACPD (área abaixo da curva de progresso da doença) (KEINATH, 2000), sendo a mistura de produtos muitas vezes utilizada, como exemplo, tiofanato metílico + clorotalonil, mancozeb + difeconazole + mancozeb (SANTOS et al., 2005b) e benomil + mancozeb (FERRAZ et al., 2000). Em plantas de pepino foi observado que pulverizações alternadas de clorotalonil, benomil e triforine, com intervalos de 7 dias

¹ Produto atualmente fora do mercado.

controlaram a doença e evitaram o desenvolvimento de estirpes tolerantes a derivados de benzimidazoles (VAN STEEKELENBURG, 1978).

O uso de óleos com efeito fungitóxico também tem sido utilizado como possível alternativa de controle, como uso de *Cymbopogon citratus* que inibiu 100% do crescimento micelial de *Didymella bryoniae* (BANKOLE e JODA, 2004). O mesmo foi observado por Fiori et al. (2000), quando extrato bruto de folhas e óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora*, *Achillea millefolium*, *Ageratum conyzoides* e *Cymbopogon citratus* se mostraram eficientes na inibição do crescimento micelial e na redução da germinação dos esporos de *D. bryoniae*. Inoculações prévias com *Micosphaerella melonis* termicamente inativado e *Helminthosporium carbonum* não patogênico, em plantas de melão de cultivares suscetíveis, mostrou que estas possuem mecanismos de resistência latentes que proporcionaram o fenômeno de resistência induzida (PASCHOLATI et al., 1986). O mesmo não foi observado com o indutor de resistência acibenzolar-s-methyl (BTH), que se mostrou ineficiente quando comparado com a testemunha (RIZZO et al., 2003), mas a levedura *Rhodosporidium diobovatum* mostrou potencial para o controle da podridão gomosa (UTKHEDE e BOGDANOFF, 2003).

O uso de variedades resistentes também é utilizado como controle visando reduzir a necessidade de aplicações de fungicidas. Nesses casos é necessário o uso de linhagens resistentes nos programas de melhoramento, (KUROZAWA et al., 2005; TSUTSUMI e SILVA, 2004; GUSMINI et al., 2005).

2.6. Caracterização do patógeno

A caracterização de um patógeno tem como objetivo demonstrar a sua variabilidade através da análise de diferentes características, tais quais, moleculares, culturais e patogênicas.

A caracterização morfológica procura avaliar a variabilidade fenotípica entre os isolados, visando verificar se os isolados apresentam um mesmo padrão morfológico e capacidade de colonização, mesmo oriundos de hospedeiros diferentes. A grande dificuldade, porém, da caracterização de *D. bryoniae*, está relacionada à dificuldade que o mesmo apresenta na esporulação em meio de cultura. Nesse sentido, o método que se mostrou mais

eficiente que o crescimento tradicional em placas de Petri contendo meio BDA foi o uso de *Nalgene autoclavable pan* ao invés de placas de Petri (GUSMINI et al., 2003), meio BDA modificado (50g batata/L de água) (SOMAI et al., 2002a; 2002b) e feijão Azuki (PASCHOLATI et al., 1986).

A caracterização molecular permite avaliar caracteres genotípicos entre isolados de fungos, analisando semelhanças e diferenças que possam ou não estar relacionadas com fatores externos e estudar a filogenia da espécie. A importância da caracterização utilizando rDNA se dá pelo fato desta região do genoma ser informativa para a filogenia de fungos, apresentando, de modo geral, boa resolução ao nível de espécie e em alguns casos em categorias sub-específicas. Em *Didymella bryoniae*, diversas técnicas moleculares são utilizadas para analisar diversidade genética. Utilizando marcadores RAPD, Somai et al. (2002a) determinaram diferenças moleculares entre os 59 isolados analisados onde foram identificados dois grupos de virulência entre os isolados. O mesmo foi observado por Kothera et al. (2003), que com base em marcadores AFLP, evidenciaram dois grupos dentre uma população de 102 isolados procedentes de diversos países, sendo que apenas um dos grupos foi categorizado como altamente virulento.

Seqüências de rDNA também têm sido empregadas no desenho de primers específicos para a espécie *D. bryoniae* (KEINATH, 1996). Inclusive com as técnicas de PCR multiplex (KOCH e UTKHEDE, 2004), tecnologia de *microarray* (KOCH et al., 2005) e PCR- ELISA (SOMAI et al., 2002b).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Origem dos isolados

Os isolados foram obtidos através de isolamento direto a partir de picnídios oriundos de plantas de pepino e melão que apresentaram sintomas da doença causada pelo patógeno *D. bryoniae*. Outros cinco isolados, de plantas de melancia e melão, foram cedidos pelo professor Adalberto Café Filho, da Universidade de Brasília (UnB) (QUADRO 1). Os isolados foram mantidos em meio BDA - batata:dextrose:ágar (200g:20g:7g/L H₂O) contido em placas de Petri com diâmetro de 100 mm, incubados em BOD, na temperatura de 23 ± 2 °C com regime de 12 h luz e 12 h escuro.

Quadro 1 - Informações sobre os isolados de *Didymella bryoniae* (Maringá - PR, 2007)

Isolado	Hospedeiro de origem	Localidade
Db-M1(M1)	Melão rendilhado Bônus II	Paraná
Db-M2(M2)	Melão rendilhado Bônus II	Paraná
Db-M3(M3)	Melão rendilhado Bônus II	Paraná
Db-M4(M4)	Melão rendilhado Bônus II	Paraná
Db-M5(M5)	Melão rendilhado Bônus II	Paraná
Db-PC(PC)	Pepino japonês Hokushin	Paraná
Db-PD(PD)	Pepino japonês Hokushin	Paraná
Db-PE(PE)	Pepino japonês Hokushin	Paraná
Db-PF(PF)	Pepino japonês Hokushin	Paraná
Db-PG(PG)	Pepino japonês Hokushin	Paraná
Db-PH(PH)	Pepino japonês Hokushin	Paraná
Db-PJ(PJ)	Pepino japonês Hokushin	Paraná
Db-PL(PL)	Pepino japonês Hokushin	Paraná
Db-PN(PN)	Pepino japonês Hokushin	Paraná

Quadro 1- Continuação

Isolado	Hospedeiro	Localidade
Db-PV(PV)	Pepino japonês Samurai	Paraná
Db-PX(PX)	Pepino japonês Samurai	Paraná
¹ Cenar-1(C1)	Melancia	Distrito Federal
¹ FO-4(F4)	Melancia	Tocantins
¹ FO-7(F7)	Melancia	Tocantins
¹ 80	Melão	Pernambuco
¹ L2	<i>Muskmelon</i>	USA

¹ Adalberto Café-Filho- UnB

3.2. Culturas puras

Para o uso nos experimentos utilizou-se culturas puras através do método ponta de hifa. Para esse procedimento foram utilizadas placas de Petri com meio agar-água 2%. Alíquotas de 10mL do meio foram vertidas nas placas de Petri, em seguida, as placas foram incubadas em estufa de cultura tipo BOD, com temperatura ajustada para $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ e regime de luz contínua pelo período de 2 a 5 dias. As hifas foram visualizadas com o auxílio de uma lupa e cortadas, juntamente com o meio, por bisturi cirúrgico. As pontas de hifa foram depositadas em placas de Petri contendo 20 mL de meio BDA e incubadas em BOD nas condições descritas anteriormente.

3.3. Preparo do inóculo

As amostras (isolados) utilizadas para os testes de patogenicidade e caracterização cultural foram mantidas em placas de Petri com diâmetro de 100 mm contendo 20 mL de meio BDA incubados em BOD, na temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ com regime de 12 h de luz e 12 h de escuro. As amostras para a caracterização molecular foram primeiramente repicadas para recipientes do tipo Erlenmeyer com capacidade para 250 mL contendo meio líquido BD - batata dextrose modificado (200g batata:200g dextrose:1000mL H₂O). A repicagem foi feita utilizando-se 5mL H₂O destilada e esterilizada nas placas de Petri, as quais foram raspadas com espátula para promover a fragmentação do

micélio que foi transferido para os Erlenmeyers. Estes foram incubados em BOD, nas condições já descritas, por um período de até 5 dias. Após esse período o micélio foi coado com o auxílio de gaze esterilizada e armazenado em Eppendorff, congelado a -20°C para posterior extração de DNA.

3.4. Identificação e caracterização molecular

3.4.1. Extração de DNA

O DNA genômico dos isolados foi extraído a partir de micélio obtido de colônias do patógeno, que cresceram em meio BD modificado utilizando o kit de extração 'Plant DNAzol® Reagent' da marca Invitrogen. Para a extração do DNA, ± 100mg de micélio foi macerado em um cadinho contendo N líquido. O micélio macerado foi acondicionado em tubo Eppendorff com 300 µL do reagente de extração plant DNAzol, homogeneizado e incubado por 5 min a 25°C. Foi adicionado 300 µL de clorofórmio, homogeneizado e incubado pelo mesmo período e centrifugado a 14000 rpm por 4min. O sobrenadante foi transferido para tubos Eppendorff limpos. Para a precipitação do DNA foi adicionado 225 µL de etanol 100% no tubo Eppendorff, homogeneizado e armazenado em temperatura ambiente por 5 min, posteriormente, centrifugados a 9400 rpm por 4 min e o sobrenadante formado foi descartado. O *pellet* foi lavado com 300 µL da mistura de um volume do Plant DNAzol com 0,75 do volume de etanol 100%, misturado em agitador do tipo vortex e armazenado em temperatura ambiente por 5 min. Centrifugou-se a amostra por 4 min a 9400 rpm e o sobrenadante foi descartado. O plant DNAzol foi removido com a adição de 300 µL de etanol 70% e centrifugação a 9400 rpm por 4 min. O etanol foi descartado e os tubos invertidos, abertos sob papel absorvente esterilizado por 10 a 15 min até o etanol evaporar. O *pellet* foi ressuspensão com 70 µL de tampão TE (Tris pH 7,5 10mM e EDTA 1 mM). Os tubos Eppendorff com o DNA dos isolados foram armazenadas em geladeira a 4 °C.

3.4.2. Reação de PCR

As regiões ITS1, ITS2 e o gene 5.8S foram amplificados através da reação da polimerase em cadeia (PCR) com os oligonucleotídeos ITS 4 (5' TCCTCCGCTTATTGATAT 3') e ITS5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG - 3') (WHITE et al., 1990). As reações de amplificação foram conduzidas em um termociclador Tpersonal Whatman Biometra, em tubos contendo 100 µL da mistura de reação constituída por 50 mM de KCl, 10 mM de Tris, pH 7,5, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 unidade de Taq DNA polimerase, 0,2 mM de cada dNTP, 15 pmol de cada oligonucleotídeo e aproximadamente 300 ng de DNA de cada amostra. A reação de PCR foi baseada em 30 ciclos, sendo: 1 minuto a 94 °C, 30 segundos a 55 °C, e 1 minuto a 72 °C. Previamente aos ciclos, as amostras foram submetidas à temperatura de 94 °C por 1 minuto e de um período extra de extensão de 5 minutos, à 72 °C após os 30 ciclos.

Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 1,5 % contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL) e submerso em tampão TBE. A separação eletroforética foi de aproximadamente 40 minutos, a 100 volts. Ao término da corrida, o gel foi fotografado sob luz ultravioleta. O produto da reação de PCR, contendo o fragmento amplificado, foi purificado com o kit Concert™ Rapid PCR (Invitrogen), de acordo com as especificações do fabricante e encaminhado para seqüenciamento no Laboratório de Bioquímica do Instituto Biológico de São Paulo.

3.4.3. Análise dos dados

Para a identificação da espécie, as seqüência de nucleotídeos dos isolados foram comparada com seqüências do gene 5.8S e regiões ITS1 e ITS2 do DNA ribossômico disponíveis no *GenBank*. Em seguida, alinhamentos múltiplos foram obtidos com seqüências do gene 5.8S e regiões ITS1 e ITS2 de vários isolados de outros países adquiridas no *GenBank* utilizando-se o programa Clustal W *online* (<<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>>). A partir dos alinhamentos foram inferidas árvores filogenéticas utilizando-se o método de máxima parcimônia com os procedimentos de busca eurística e a adição de

passo a passo (*stepwise addition*) e *neighbor joining* implementados com o programa PAUP* versão 4.0b10 (Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA, EUA). A confiabilidade dos ramos foi testada por *bootstrap* com 1000 repetições.

3.5. Caracterização cultural

Para a caracterização do aspecto e cor da colônias, discos de micélio de 3 mm de diâmetro dos isolados foram repicados para placas de Petri contendo meio BDA, utilizando-se 3 repetições por isolado. Essas placas foram armazenadas em estufa de cultura tipo BOD, com temperatura ajustada para 23 ± 1 °C e regime de luz alternado 12h claro/12 h escuro. A avaliação do tipo e cor da colônia foi feito visualmente, utilizando as características: micélio rasteiro ou aéreo, fundo de placa escuro ou com setores e bordas da colônia com crescimento uniforme (circular) ou desuniforme.

3.6. Análise da patogenicidade e virulência dos isolados

Foi feita inoculação cruzada entre os isolados de plantas de pepino caipira (Safira) e japonês (Hokushin), melão do grupo valenciano (Amarelo), rendilhado (Bônus II) e caipira (Gaúcho), abóbora caipira (Menina Brasileira) e melancia (Creeson Sweet). As sementes foram inicialmente plantadas em bandejas de isopor com 128 células utilizando substrato comercial. Ao desenvolverem as folhas cotiledonares, as mudas foram transferidas para copos plásticos descartáveis com capacidade de 400ml, contendo substrato comercial. As plantas foram inoculadas ao atingirem uma espessura de 3 a 4 mm de diâmetro de caule. Os ensaios foram montados em casa de vegetação.

A inoculação no caule se deu abaixo das folhas cotiledonares, com palito de dente esterilizado e discos de micélio com 3 mm de diâmetro feitos com auxílio de furador específico. As colônias utilizadas para a inoculação tinham entre 7 e 12 dias de idade. As plantas ficaram três dias em câmara úmida e foram avaliadas no sétimo dia após a inoculação. Foi montada uma escala de notas (QUADRO 2, FIGURA 1) com base no comprimento da lesão, para avaliar o desenvolvimento da doença originado por cada isolado em uma

mesma espécie de planta visando verificar a diferença de severidade entre os isolados.

O delineamento experimental utilizado foi do tipo inteiramente casualizado (DIC) com 10 repetições (plantas) por tratamento (isolados). Todos os isolados foram utilizados, exceto Db- S 3 e 6, perfazendo 21 tratamentos mais testemunha e o teste estatístico utilizado para avaliar a diferença de severidade foi Scott Knott ao nível de 5% de significância, com o auxílio do software para análises estatísticas Sisvar (DEX/UFLA).

Quadro 2 - Escala de notas utilizada para avaliar as lesões nas plantas inoculadas com isolados de *D. bryoniae*

Nota	Comprimento de lesão (cm)	Aspecto da lesão
0	Não ocorre lesão	-
1	Até 1	Sem necrose
2	Até1	Com necrose
3	1,1 - 1,5	Com necrose
4	1,6 - 2,0	Com necrose
5	2,1 - 2,5	Com necrose
6	2,6 - 3,0	Com necrose
7	3,1 – 3,5	Com necrose
8	Acima de 3,5	Com necrose

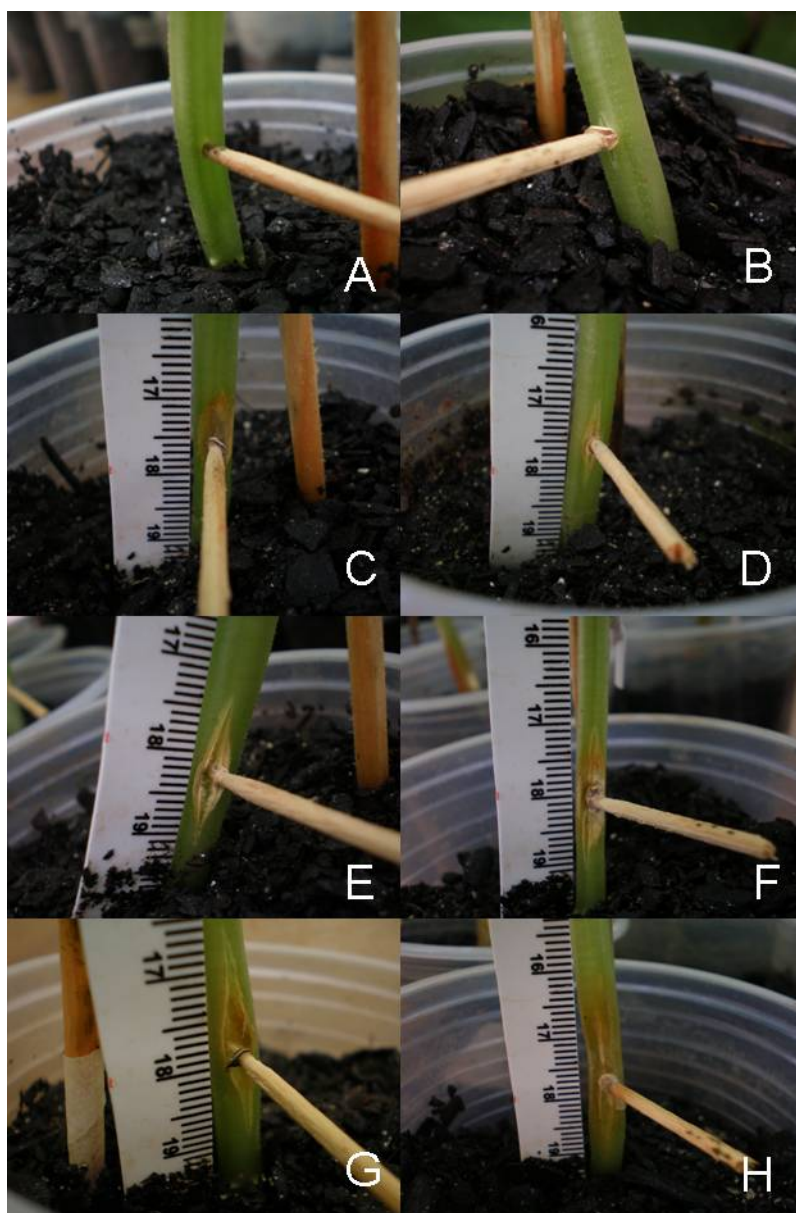


Figura 1 – Ilustração da escala de notas utilizada para avaliar as lesões nas plantas inoculadas com isolados de *Didymella bryoniae*: A nota 0, B nota 1, C e D nota 2, E nota 3, F nota 4, G nota 5 e H nota 6)

3.7. Análise da interação dos isolados de *D. bryoniae* e as hospedeiras pepino e melão

Como inóculo foram utilizados os isolados Db-PG e Db-PF de pepino e Db-M2 e Db-M5 de melão. O experimento foi realizado em casa de vegetação.

A inoculação foi realizada na região do caule, abaixo das folhas cotiledonares, e na 2ª ou 3ª folha definitiva. As colônias utilizadas para a inoculação tinham entre 7 e 12 dias de idade. Ferimentos leves foram realizados no caule, na região a ser inoculada, utilizando um instrumento provido de diversas agulhas e as folhas foram feridas com o atrito de uma outra folha. Os discos de micélio foram colocados sobre os ferimentos e envolvidos com filme plástico na região inoculada do caule, e sob o ferimento nas folhas. As plantas ficaram em câmara úmida por 3 dias. A avaliação foi feita 10 dias após a inoculação, com a medição do comprimento da lesão no caule e diâmetro médio da lesão na folha.

O delineamento experimental utilizado foi do tipo inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições (plantas) por tratamento (híbridos). Os tratamentos foram quatro diferentes híbridos de pepino tipo 'japonês' (Taisho Ki, Hokushin, Samurai e Natsubayashi) e três de melão do grupo rendilhado (Royal Sweet, Bônus II e Sunrise) mais cinco testemunhas de cada grupo inoculadas com disco de meio BDA. As mudas foram produzidas em bandejas de isopor, com 128 células, com substrato comercial e após o desenvolvimento da 1ª folha definitiva foram transplantadas para copos descartáveis de 400 ml contendo substrato comercial. O teste estatístico utilizado para avaliar a diferença de severidade entre os diferentes híbridos foi Scott Knott ao nível de 5% de significância, com o auxílio do software para análises estatísticas Sisvar (DEX/UFLA).

3.8. Efeito da enxertia de plantas de pepino susceptíveis em plantas de abóbora resistentes na intensidade do crestamento gomoso

Utilizou-se o método de enxertia de fenda cheia (CAÑIZARES e GOTO, 2003; RIZZO et al., 2004), tendo como porta-enxerto o híbrido de abóbora Shelper. As sementes dos híbridos de pepino foram plantadas com três dias de antecedência em relação às mudas do porta-enxerto para que ambas as

espécies de porta-enxerto e enxerto estivessem com semelhante diâmetro de caule no momento da enxertia.

As mudas dos seis diferentes híbridos de pepino tipo 'japonês' e do porta-enxerto abóbora Shelper foram produzidas em bandejas de isopor, com 128 células, com substrato comercial. A enxertia foi realizada quando o porta-enxerto e a copa apresentaram a primeira folha verdadeira. As mudas de abóbora Shelper foram transplantadas para copos plásticos contendo 750 mL de substrato comercial. Utilizando uma lâmina descartável, flambada, cortou-se o meristema apical do porta-enxerto abóbora Shelper logo acima das folhas cotiledonares. Em seguida, realizou-se um outro corte longitudinal no caule remanescente, em uma profundidade aproximada de 1,0 cm, perpendicular as folhas cotiledonares.

Para preparo das mudas empregadas como enxerto, utilizou-se o mesmo procedimento, com lâmina descartável e flambada. Cortou-se as mudas abaixo 1,5 cm das folhas cotiledonares. Abaixo das folhas cotiledonares, procederam-se dois cortes opostos em bisel, obtendo uma forma de cunha de aproximadamente 1,0 cm. Em seguida, encaixou-se a porção em cunha do enxerto (híbridos de pepino) na fenda do porta-enxerto (abóbora Shelper) e foram presos por um clipe especial para enxertia. Logo após a enxertia, as plantas foram colocadas em câmara úmida com microaspersão, com umidade de 90%.

A inoculação com *D. bryoniae*, em plantas não enxertadas, foi realizada na região do caule abaixo das folhas cotiledonares e para as enxertadas, acima da região de enxertia e abaixo das cotiledonares do porta-enxerto, com o objetivo de observar a reação dos híbridos, enxertados e não enxertados. As plantas foram inoculadas com colônias de sete dias de idade. A região de inoculação foi levemente ferida utilizando-se um instrumento provido de diversas agulhas. Os discos de micélio foram colocados sobre os ferimentos e envolvidos com filme plástico na região inoculada. A avaliação foi feita 8 dias após a inoculação utilizando-se uma escala de notas, descrita no item 3.6.2, para o comprimento da lesão.

O delineamento experimental utilizada foi do tipo inteiramente casualizado (DIC) com seis repetições (plantas) por tratamento (híbridos enxertados e não enxertados). Os tratamentos foram seis diferentes híbridos

de pepino tipo 'japonês' (Taisho, Tsuyataro, Hokushin, Samurai, Natsubayashi e Soudai) enxertadas e não enxertadas (pé franco) sobre o porta enxerto abóbora híbrido Shelper. Como inóculo foi utilizado o isolado Db-PN. O experimento foi realizado em estufa plástica.

O teste estatístico utilizado para avaliar a diferença de severidade, entre híbridos enxertados e não enxertados, foi Scott Knott ao nível de 5% de significância, com o auxílio do software para análises estatísticas Sisvar (DEX/UFLA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação e caracterização molecular de isolados de *D. bryoniae*

A amplificação por PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos ITS4/ITS5, resultou em produtos de PCR com fragmentos de aproximadamente 600 pares de base para todas as amostras. As seqüências de DNA dos isolados apresentaram homologia superior a 97% com acessos do *GenBank* identificados como *D. bryoniae*. Todos os isolados, exceto Db-Px e 80 e Db-M4 foram seqüenciados e alinhados com as seqüências descritas no quadro 3.

A análise filogenética foi baseada em 487 caracteres totais dos quais 405 foram constantes, 43 foram variáveis não informativos e 39 foram informativos.

O alinhamento das seqüências dos isolados deste estudo diferenciou na população um grupo maior de isolados (*bootstrap* de 81 e 55% para as árvores filogenéticas inferidas pelos métodos *neighbor joining* e máxima parcimônia, respectivamente), uma ramo com apenas um isolado (Db-M5 melão) e dois isolados (Db-PH pepino e Db-PJ pepino) ficaram não resolvidos, fora do clado principal (FIGURAS 2 e 3). No grupo 2 estão isolados de pepino, melão, melancia e *muskmelon*, mostrando a ocorrência de polimorfismo no rDNA entre os isolados de *D. bryoniae* analisados por este estudo. O isolado L2, de *muskmelon*, procedente dos EUA, se agrupou no grupo 2, tendo similaridade de 98% com o isolado Db-M3, o qual possui o genótipo idêntico à maioria dos isolados brasileiros utilizados no estudo em análise das regiões ITS1, ITS2 e gene 5.8S do rDNA.

Quadro 3- Espécies utilizadas no alinhamento de seqüências de nucleotídeos com os respectivos hospedeiros capturados no GenBank

Nº acesso	Isolado	Hospedeiro	Origem
AB266850.	<i>Didymella bryoniae</i>	Melão de São Caetano japonês	Japão
AB266849	<i>Didymella bryoniae</i>	Melão de São Caetano japonês	Japão
AB266848.	<i>Didymella bryoniae</i>	Melão de São Caetano japonês	Japão
EU167573.	<i>Didymella bryoniae</i>	--	--
AY293804.	<i>Didymella cucurbitacearum</i>	--	EUA
EF107642.	<i>Didymella bryoniae</i>	grafted watermelon	Tunisia
AF297228.	<i>Didymella bryoniae</i>	melão	EUA
EF160074.	<i>Didymella bryoniae</i>	melão	China
EF160075.	<i>Didymella bryoniae</i>	melão	China
EF160076.	<i>Didymella bryoniae</i>	melão	China
AY293798.	<i>Phoma</i> sp. 200		EUA
EF107641.	<i>Didymella bryoniae</i>	grafted watermelon	Tunisia
DQ026014	<i>Phoma medicaginis</i>	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	--
AJ972865.	<i>Phoma</i> sp.	Marble	Turquia
EF120412.	<i>Phoma</i> sp.	<i>Acropora formosa</i>	
AY157883.	<i>Didymella ligulicola</i>	<i>Tanacetum cineariifolium</i>	Australia
AY157875.	<i>Didymella ligulicola</i>	<i>Tanacetum cineariifolium</i>	--
AY131201.	<i>Didymella lentis</i> (anamorph: <i>Ascochyta lentis</i>)	<i>Medicago truncatula</i>	Australia
EU167600	<i>Didymella rabiei</i> (anamorph: <i>Ascochyta rabiei</i>)	<i>Cicer</i> sp	Alemanha

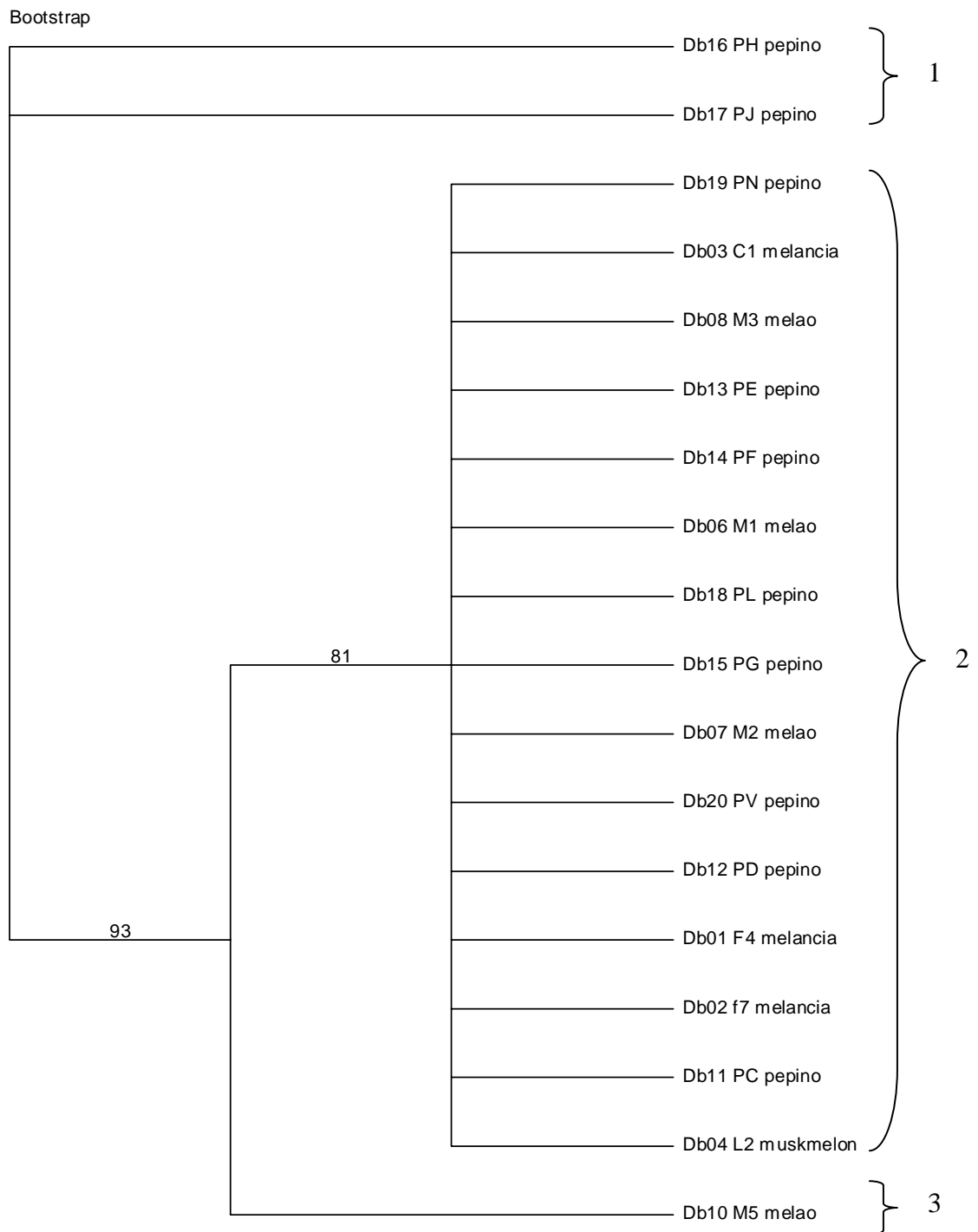


Figura 2- Árvore filogenética inferida pelo método *Neighbor Joining* a partir de seqüências de nucleotídeos do gene 5.8S e regiões ITS1 e ITS2 do DNA ribossômico de isolados de *D. bryoniae*. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual as ramificações foram observadas.

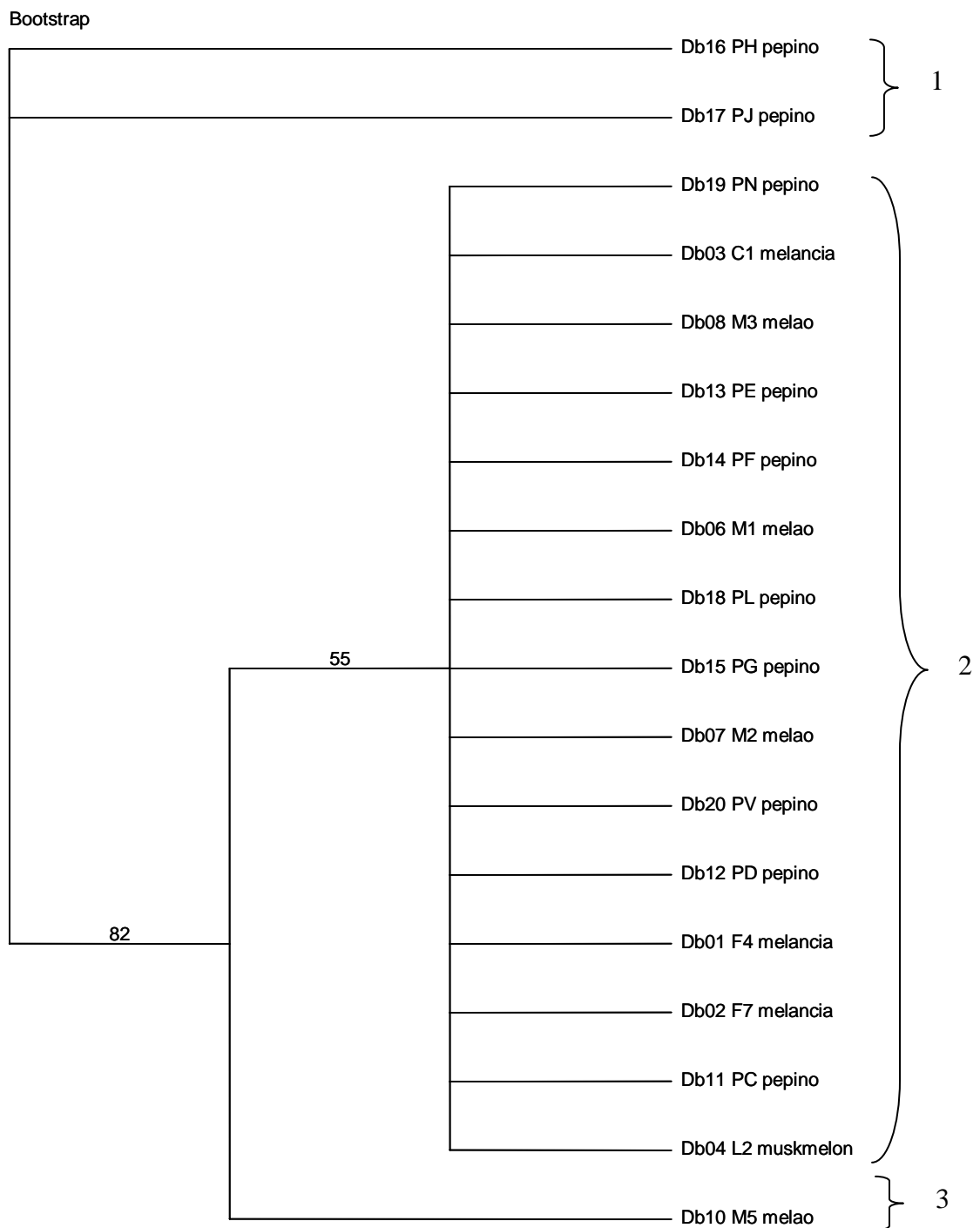


Figura 3- Árvore filogenética inferida pelo método máxima parcimônia a partir de seqüências de nucleotídeos do gene 5.8S e regiões ITS1 e ITS2 do DNA ribossômico de isolados de *D. bryoniae*. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual as ramificações foram observadas.

A análise por máxima parcimônia dos isolados deste estudo em conjunto com sequências de isolados do *GenBank* mostrou a ocorrência de um ramo maior (100% *bootstrap*) o qual agrupou os isolados brasileiros com os isolados do *GenBank* e ainda alguns isolados de *Phoma* e *D. ligulicola*. Diferenciaram-se desse grupo as espécies *D. lentis* e *D. rabiei* (FIGURA 4). Internamente a esse grupo foram observados os sub-grupos I (dois acessos de *Phoma*), II (isolados brasileiros de *D. bryoniae* de pepino e melão), III (acessos de isolados de *D. bryoniae* do *GenBank*) e IV (dois acessos de *D. ligulicola*). Surpreendentemente, a maioria dos isolados deste estudo não formaram subgrupo, juntamente com alguns acessos de *D. bryoniae* do *GenBank* (EU167573 e AF297228).

Pode-se supor que isso indica que apesar da grande similaridade genotípica entre todos os isolados de *D. bryoniae* utilizados nesse estudo conforme descrito anteriormente, o isolado L2 é mais semelhante aos isolados capturados no *GenBank* que aos encontrados no Brasil, tanto de melancia quanto pepino japonês e melão rendilhado, os quais as sementes são importadas do Japão.

Os resultados deste estudo mostram a ocorrência de variabilidade na população de isolados de *D. bryoniae* obtidos no Brasil. Um grupo menor com os isolados Db-M5, Db-PJ e Db-PH, e um grupo maior com os demais isolados. Anteriormente, Somai et al. (2002a) também constataram a ocorrência de variabilidade genética em *D. bryoniae* com base na análise de polimorfismos das regiões ITS e gene 5.8S do rDNA. .

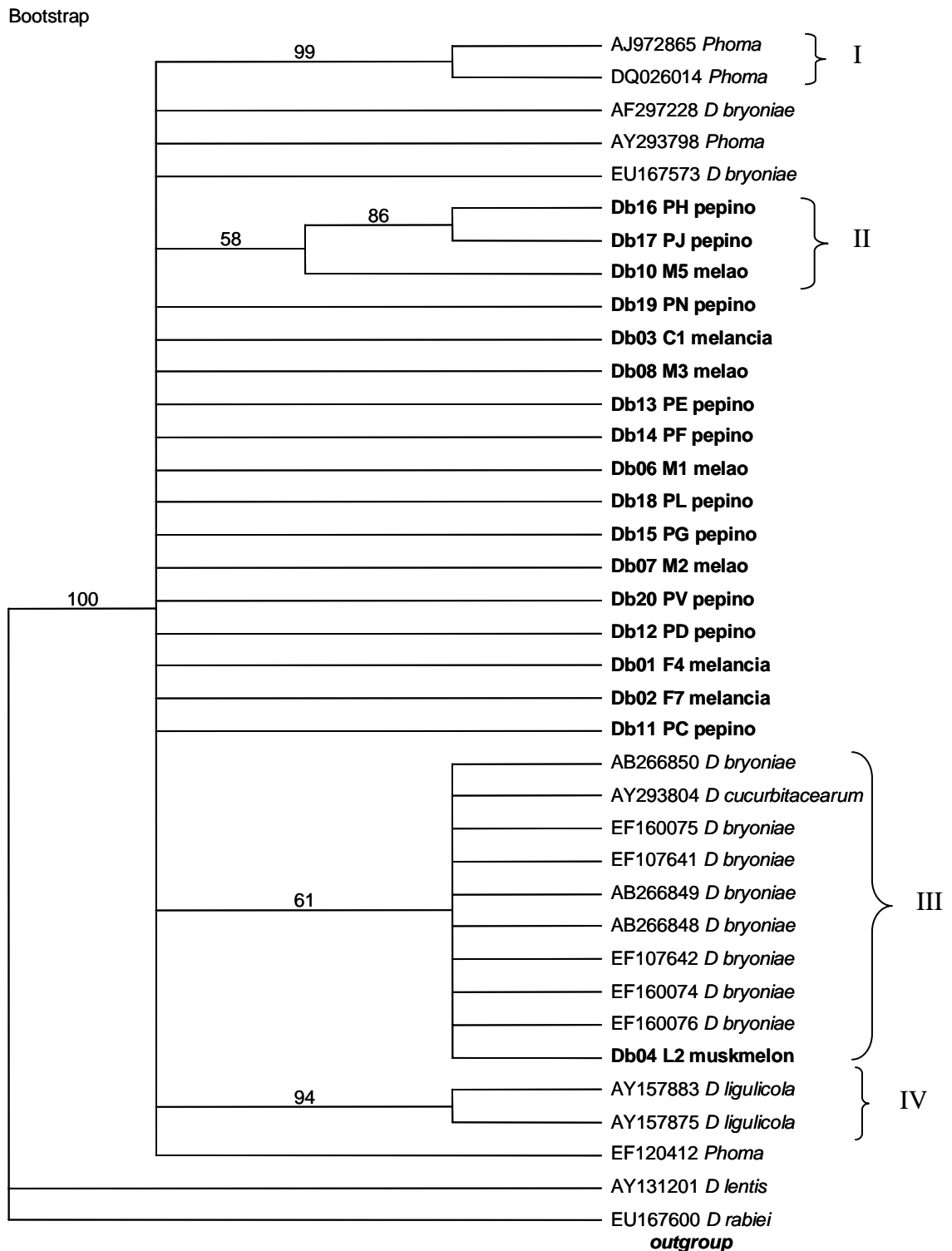


Figura 4- Árvore filogenética inferida pelo método de máxima parcimônia a partir de seqüências de nucleotídeos do gene 5.8S e regiões ITS1 e ITS2 do DNA ribossômico de isolados de *Didymella* e *Phoma*. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual as ramificações foram observadas.

4.2. Caracterização cultural

A caracterização cultural mostrou que as colônias apresentaram coloração cinza variando de claro á escuro com e sem setores, que são áreas onde o micélio apresenta coloração ou aspecto diferentes do exibido pela colônia (FIGURA 5), da mesma forma a parte inferior das colônias, vista pelo fundo da placa de Petri, também apresentou variação de escuro ou com setores (FIGURA 6). As bordas da colônia apresentaram padrões de crescimento regulares e irregulares em um mesmo isolado (QUADRO 4).

Os setores foram repicados separadamente para verificar se mantinham as características de cor e aspecto de micélio diferentes da colônia, porém o micélio, ao se desenvolver apresentava as mesmas características da colônia de origem, repetindo ou não a ocorrência de setores.

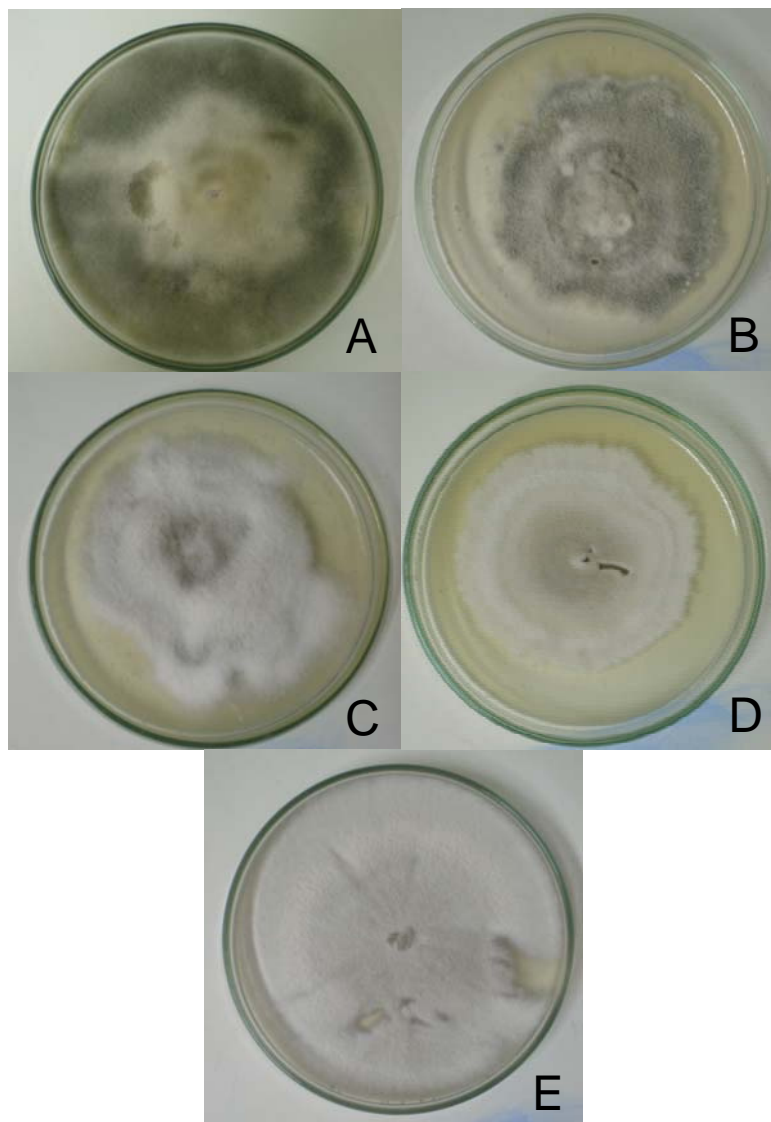


Figura 5- Coloração da parte superior do micélio de colônias de *Didymella bryoniae* observados na caracterização cultural, onde A é cinza escuro, B, cinza e C, D e E representam cor de micélio cinza claro.

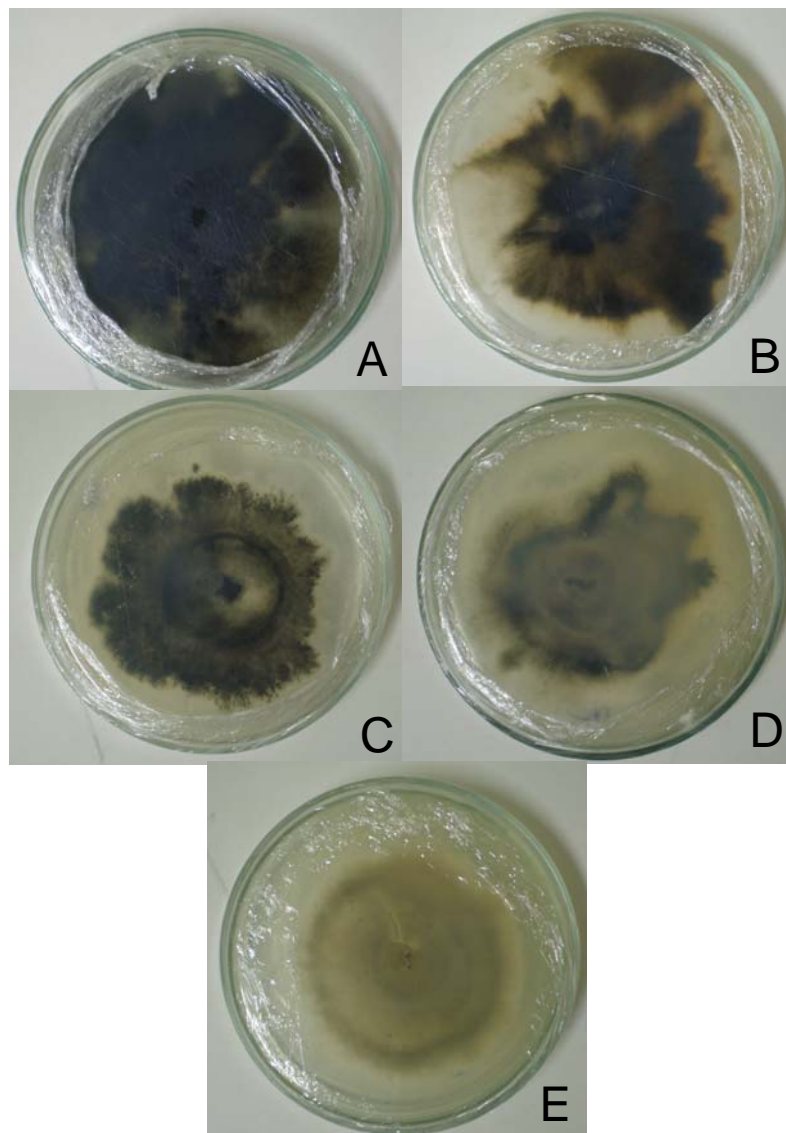


Figura 6-Coloração da parte inferior do micélio de colônias de *Didymella bryoniae* observados na caracterização cultural onde: A representa parte inferior do micélio escuro e B, C, D, e E representam parte inferior do micélio escuro com seções.

Quadro 4- Resultado da caracterização cultural de colônias de *D. bryoniae*

Isolado	Cor		Tipo de micélio	Característica da borda da colônia
	superior	inferior		
Db-M1(M1)	cinza	escuro	aéreo	regular
Db-M2(M2)	cinza claro/seções	escuro/seções	aéreo	regular/irregular
Db-M3(M3)	cinza	escuro	aéreo	regular
Db-M4(M4)	cinza claro	escuro	aéreo	regular/irregular
Db-M5(M5)	cinza/seções	seções	rasteiro	regular
Db-PC(PC)	cinza claro	seções	aéreo /rasteiro	irregular
Db-PD(PD)	cinza claro	seções	aéreo	irregular
Db-PE(PE)	cinza claro/seções	seções	aéreo	irregular
Db-PF(PF)	cinza com seções	seções	aéreo	irregular
Db-PG(PG)	cinza claro/escuro	escuro	aéreo	regular
Db-PH(PH)	cinza claro	seções	aéreo	regular
Db-PJ(PJ)	cinza	escuro	aéreo	regular
Db-PL(PL)	cinza claro	escuro	aéreo	regular
Db-PN(PN)	cinza claro	seções	aéreo	irregular
Db-PV(PV)	cinza claro	seções	aéreo	regular
Db-PX(PX)	cinza claro	escuro	aéreo/rasteiro	regular
Cenar-1(C1)	cinza escuro com seções	escuro/seções	aéreo	irregular
FO-4(F4)	cinza claro a cinza	escuro/seções	aéreo	regular
FO-7(F7)	cinza claro a cinza	escuro	aéreo	regular
80	cinza claro	seções	rasteiro	regular
L2	cinza	escuro	rasteiro	regular

Os isolados Db-M2, Db-M4, Db-PE e Db-PG apresentaram variação de cor da parte superior da colônia com algumas colônias apresentando micélio com setores e outras com coloração uniforme. Todos os isolados apresentaram coloração cinza, variando de claro a escuro, diferente do citado por Keinath et al. (1995), que mostraram micélio branco a esverdeado. Da mesma forma, a parte inferior das colônias nos isolados Db-M2, Cenar-1 e FO-04 também apresentaram variação nas diferentes colônias mostrando padrões escuros ou com setores. A mesma variação foi observado na característica tipo de micélio, onde os isolados Db-PC e Db-PX apresentaram colônias com micélio aéreo e outras rasteiro, mas na maioria dos casos o micélio apresentou-se aéreo, também estando de acordo com o citado por Keinath et al. (1995). No aspecto característica de borda do micélio, os isolados Db-M2 e Db-M4 apresentaram diferenças no padrão, os demais apresentaram tipo de crescimento uniforme, regular ou irregular em todas as placas.

O resultado obtido na caracterização cultural de *D. bryoniae* demonstra que existe baixa variabilidade nos aspectos cor, tipo de micélio e borda do micélio entre diferentes isolados mesmo quando se trabalhando com culturas puras.

4.3. Análise da patogenicidade e virulência dos isolados

Todos os isolados de *D. bryoniae*, originários de diferentes espécies de plantas da família Cucurbitaceae, se mostraram patogênicos aos hospedeiros nos quais foram inoculados. Com base na escala de notas de severidade, verificou-se a ocorrência de diferenças significativas de virulência entre os isolados ($P=0,05$). Os isolados foram comparados em relação à virulência em sete genótipos de cucurbitáceas (híbridos e variedades de pepino, melão, melancia e abóbora), no entanto o ranqueamento dos isolados em relação à virulência não foi consistente entre os genótipos analisados (QUADRO 5).

Outra maneira de mostrar que o ranqueamento dos isolados em relação à virulência não foi consistente entre os genótipos analisados está apresentada no quadro 6, onde os isolados foram agrupados com base em intervalos de comprimento das lesões causadas nas hospedeiras. Por exemplo, o isolado Db-PC ficou no grupo 1 nos hospedeiros pepino caipira Safira e melão Bônus

II, grupo 2 nos melões Gaúcho e Valenciano Amarelo, grupo 3 em abóbora, grupo 4 em melancia e grupo 5 no hospedeiro pepino Hokushin em contrapartida, o isolado Db-PL se encaixou no grupo 2 para todos os melões, grupo 3 pra os pepinos e abóbora e grupo 4 para melancia mostrando-se com virulência constante para pepino e melão independente do híbrido, os foram grupos de severidade onde foi observada a diferença de virulência dos isolados em relação a cada hospedeiro. Entre os isolados oriundos de melão também foi observada variação na virulência sendo exemplificado pelos isolados Db- M1, que obteve comportamento, quanto à virulência, mais constante em relação aos isolados de pepino, ficando distribuído no grupo 2 para todos os hospedeiros pepino e melão e no grupo 3 pra abóbora e melancia diferentemente do isolado Db-M4 que apresentou maior variabilidade entre os isolados de melão, se distribuindo nos grupos 1 pra pepino Safira e melão Bônus II, grupo 2 pra melões Gaúcho e Valenciano Amarelo, grupo 3 pra pepino Hokushin, grupo 4 para melancia e grupo 5 para abóbora. Já entre os isolados de melancia, também foi observado variabilidade na virulência como exemplificado pelo isolado F4, que ficou no grupo 2 em melão gaúcho e abóbora, grupo 3 no pepino Hokushin e melões Bônus II e valenciano Amarelo, grupo 5 pra pepino safira e grupo 6 pra melancia, mas se mostraram, de forma geral, mais virulentos que os demais ficando em sua maioria agrupados a partir do grupo 3.

Não foi observada maior resistência de alguma das espécies utilizadas como hospedeiro em relação a outras contrariando Lee et al. (1983) e Chiu e Walker (1949) que relatam que pepino e abóbora são mais resistentes à infecção por *D. bryoniae* que outras espécies de cucurbitáceas.

Os dados mostraram que não houve interação hospedeiro x isolado conforme citado por Keinath et al. (1995). A existência de diferença de virulência entre isolados é relatada por Kothera et al. (2003), Somai et al. (2002a) e St. Amand e Wehner (1995), mas no presente trabalho, não pôde ser associada ao hospedeiro de origem do isolado, assim sendo essa variação na virulência parece estar relacionada com as condições climáticas de temperatura e umidade relativa, já que estas foram as variáveis que não permaneceram constantes nos diferentes ensaios (hospedeiros) uma vez que,

cada ensaio, foi realizado em períodos diferentes e não ter ocorrido um padrão claro de virulência entre os isolados.

Quadro 5 - Média do comprimento das lesões de caule (cm) causadas pelos diferentes isolados nos hospedeiros.

Tratamento (isolado)	Hospedeiro						
	Pepino Japonês Hokushin	Pepino Caipira Safira	Melão Rendilhado Bônus II	Melão Caipira Gaúcho	Melão Valência- no Amarelo	Melancia Creeson Sweet	Abóbora Caipira Menina
PC	4,9g ¹	1,1b	1,5c	1,8c	2,0b	3,2d	2,2c
PD	3,2e	3,3d	2,1d	2,6d	2,2b	3,7e	3,2d
PE	3,0e	1,9c	1,6c	2,0c	2,0b	3,7e	1,6b
PF	1,9c	1,6c	2,1d	2,1c	2,5b	2,2c	1,9b
PG	2,6d	2,4d	2,3d	1,6c	2,0b	2,2c	1,9b
PH	1,9c	3,0d	1,9c	2,4d	2,0b	3,4d	1,8b
PJ	4,2f	3,1d	2,2d	2,2d	2,0b	3,5d	2,2c
PL	2,5d	2,2c	1,9c	1,8c	2,0b	3,3d	2,7c
PN	3,9f	3,2d	1,8c	2,0c	2,0b	3,8e	2,4c
PV	3,8f	2,4d	2,4d	2,4d	2,0b	2,0c	2,6c
PX	3,5e	3,0d	2,0c	1,9c	2,1b	3,0d	2,4c
M1	1,9c	1,9c	1,9c	1,9c	1,7b	2,7d	2,2c
M2	1,6c	1,2b	1,9c	1,5c	4,0c	2,0c	2,3c
M3	2,1c	2,1c	1,6c	2,0c	4,0c	2,8d	2,1b
M4	2,3d	2,9d	1,5c	2,0c	1,7b	3,2d	3,7d
M5	2,9d	2,5d	2,5d	2,3d	2,0b	3,3d	4,3e
FO4	2,7d	3,8e	2,6d	1,9c	2,8c	4,5e	1,9b
FO7	4,5g	3,1d	2,1d	2,3d	1,5b	4,2e	3,2d
C1	4,0f	4,3e	2,6d	2,0c	3,2c	3,0d	2,3c
L2	2,7d	2,0c	2,3d	2,7d	2,0b	3,8e	1,9b
80	1,0b	1,0b	1,0b	1,0b	1,0b	1,0b	2,4c
T	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a
CV	30,03	43,63	27,46	24,12	71,72	32,22	28,74

¹Médias na vertical seguidas de uma mesma letra não diferiram entre si pelo teste de media Scott Knott (5%)

Quadro 6- Agrupamento dos isolados de *D. bryoniae* em grupos de virulência de acordo com o comprimento de lesão

Comprimento de lesão	Hospedeiros						
	Pepino japonês Hokushin	Pepino caipira Safira	Melão rendilhado Bônus II	Melão caipira Gaúcho	Melão valenciano Amarelo	Abóbora caipira Menina Brasileira	Melancia Creeson Sweet
Grupo 1 1,0-1,5cm	80	80, PC, M2, M4	80, PC, M4	80, M2	80, F7	--	80
Grupo 2 1,6-2,1cm	PF, PH, M1, M2, M3	PE, PF, M1, M3, L2	PD, PE, PF, PH, PL, PN, PX, M1, M2, M3, F7	PC, PE, PF, PG, PL, PN, PX, M1, M3, M4, F4, C1	PC, PE, PG, PH, PJ, PL, PN, PV, PX, M1, M4, M5, L2	PE, PF, PG, PH, M3, F4, L2	PV, M2
Grupo 3 2,2-2,9cm	PG, PL, M4, M5, F4, L2	PG, PL, PV, M4, M5	PG, PJ, PV, M5, F4, C1, L2	PD, PH, PJ, PV, M5, F7, L2	PD, PF, F4	PC, PJ, PL, PN, PV, PX, M1, M2, C1, 80	PF, PG, M1, M3
Grupo 4 3,0-3,5cm	PD, PE, PX	PD, PH, PJ, PN, PX, F7	--	--	C1	PD, F7	PC, PJ, PH, PL, PX, M4, M5, C1
Grupo 5 3,6-4,2cm	PJ, PN, PV, C1	F4	--	--	M2, M3	M4	PD, PE, PN, F7, L2
Grupo 6 4,3cm -maior	PC, F7	C1	--	--	--	M5	F4

4.4. Análise da interação dos isolados de *D. bryoniae* e as hospedeiras pepino e melão

Na análise de variância dos resultados obtidos na inoculação em caule, a interação entre híbridos e isolados não se mostrou significativa. (QUADRO 7). Na análise separada dos fatores 'híbridos' e 'isolados', os híbridos Bônus II, Sunrise, ambos de melão e Hokushin, de pepino, se mostraram mais suscetíveis ao patógeno *D. bryoniae*, diferindo dos demais. Já entre os isolados, Db-M5 e Db-PF foram mais agressivos que os demais nos hospedeiros inoculados. Esses resultados corroboram a evidência de que não há relação entre origem (hospedeiro) do isolado e sua agressividade e sim que existem diferentes níveis de virulência entre isolados, independente de sua origem.

Quadro 7 - Severidade¹ no caule de isolados de *D. bryoniae* obtidos em pepino e melão em inoculação cruzada.

Híbridos	Isolados			
	Db-PG (pepino)	Db-M2 (melão)	Db-M5 (melão)	Db-PF (pepino)
Pepino japonês Samurai	1,00Aa	0,86Aa	1,08Aa	1,22Aa
Pepino japonês Natsubayashi	0,84Aa	0,90Aa	1,80Ba	1,08Aa
Pepino japonês Taisho	0,86Aa	1,28Aa	1,20Aa	1,34Aa
Melão rendilhado Royal Sweet	1,04Aa	1,34Aa	1,32Aa	1,30Aa
Melão rendilhado Bônus II	1,04Aa	1,34Aa	1,70Aa	1,38Aa
Melão rendilhado Sunrise	1,22Aa	1,24Aa	1,44Aa	1,66Aa
Pepino japonês Hokushin	1,48Aa	1,36Aa	1,18Aa	2.30Bb

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância

¹ comprimento da lesão, em cm.

Na análise de variância dos resultados obtidos na inoculação em folha, a interação entre híbridos e isolados se mostrou altamente significativa (QUADRO 8). Os isolados Db-M5 se mostrou mais severo em folhas de melão Bônus II e Sunrise que nos demais híbridos. Já o isolado Db-PF se mostrou mais severo somente no melão Bônus II. Os demais isolados não apresentaram diferença de severidade entre os híbridos inoculados. Quanto aos híbridos, o melão Bônus II se mostrou mais suscetível aos isolados Db-M5 e Db-PF enquanto o Sunrise se mostrou mais suscetível apenas ao isolado Db-M5.

Quadro 8 - Severidade¹ na folha de isolados de *D. bryoniae* obtidos em pepino e melão em inoculação cruzada

Híbridos	Isolados			
	Db-PG (pepino)	Db-M2 (melão)	Db-M5 (melão)	Db-PF (pepino)
Pepino japonês Samurai	0,34Aa	0,33Aa	0,64Aa	0,76Aa
Pepino japonês Natsubayashi	0,26Aa	0,28Aa	1,14Aa	0,86Aa
Pepino japonês Taisho	0,26Aa	0,32Aa	1,18Aa	0,90Aa
Melão rendilhado Royal Sweet	0,58Aa	0,48Aa	1,87Aa	0,90Aa
Melão rendilhado Bônus II	0,61Aa	0,63Aa	3,27 Bb	2,45 Bb
Melão rendilhado Sunrise	0,74Aa	0,83Aa	4,35 Bb	0,97Aa
Pepino japonês Hokushin	0,35Aa	0,32Aa	0,96Aa	0,88Aa

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância

¹ Diâmetro médio de lesão em cm

Também nas folhas, os isolados Db-M5 e Db-PF mostraram-se mais severos nos híbridos que os demais isolados, entretanto, apenas os híbridos de melão Bônus II e Sunrise diferiram dos demais, mostrando-se mais suscetíveis a *D. bryoniae* quando comparados com os outros híbridos.

Comparando os resultados obtidos entre inoculação em folha e em caule foi observado que existe diferença entre a suscetibilidade do caule e da folha de um mesmo híbrido à *D. Bryoniae*. Quando inoculados em caule, os híbridos de pepino Natsubayashi e Hokushin na interação, apresentaram maior suscetibilidade aos isolados Db-M5 e Db-PF, respectivamente, porém com a inoculação em folha, ambos mostraram-se mais resistentes. Já os híbridos de melão Bônus II e Sunrise mostraram-se mais suscetíveis que os demais híbridos a algum dos isolados em ambos os casos, inoculação em caule e folha.

A caracterização molecular não apresentou qualquer relação com as outras características analisadas. Os grupos de severidade formados não são refletidos na árvore filogenética, mesmo porque, não foi observado um padrão na virulência desses grupos com relação ao hospedeiro. Esse resultado diferiu do encontrado por St. Amand e Wehner (1995), Kothera et al. (2003) e Somai et al. (2002a) que identificaram molecularmente diferentes grupos de *D. bryoniae* em relação a virulência. O mesmo foi observado quanto à caracterização cultural, que mostrou um padrão de cor, na maioria dos isolados, cinza e micélio aéreo, independente da virulência ou agrupamento filogenético observados, fato também observado por Somai et al. (2002a).

4.5. Efeito da enxertia de plantas de pepino susceptíveis em plantas de abóbora resistentes na intensidade do crestamento gomoso

Os híbridos Hokushin, Taisho, Samurai e Tsuyataro não diferiram entre si e obtiveram uma maior resistência ao patógeno quando comparados com os híbridos Natsubayashi e Soundai em plantas enxertadas (QUADRO 9).

Já em plantas não enxertadas, os híbridos Natsubayashi e Taisho mostraram maior resistência á doença, indicando que a enxertia proporciona uma maior eficiência na resistência nos híbridos Hokushin, Tsuyataro e Samurai em comparação com o híbrido Taisho e uma menor eficiência no híbrido Soundai.

Com exceção do híbrido de pepino japonês Natsubayashi, que não apresentou diferença entre a severidade da doença em plantas enxertadas e não enxertadas, os demais híbridos utilizados no ensaio obtiveram um aumento significativo na resistência à podridão gomosa quando comparadas plantas enxertadas e plantas não enxertadas.

Os resultados mostraram que a eficiência da enxertia em abóbora Shelper, na redução da severidade da doença podridão gomosa nos híbridos de pepino japonês utilizados no experimento, foi altamente significativa, assim como a interação entre híbrido e enxerto.

Quadro 9 - Diferenças entre híbridos de pepino, enxertados e não enxertados, na severidade da doença podridão gomosa causada por *D. bryoniae*

Híbrido de pepino japonês	Enxertia	
	Enxertado	Não-enxertado
Hokushin	1,25 Aa	3,25 Bb
Natsubayashi	2,00 Ab	2,50 Aa
Samurai	1,00 Aa	3,00 Bb
Soudai	1,75 Ab	3,50 Bb
Taisho	1,25 Aa	2,50 Ba
Tsuyataro	1,25 Aa	3,50 Bb

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância

5. CONCLUSÕES

- A análise de seqüências de um segmento do DNA ribossomal, compreendendo as regiões ITS1, ITS2 e do gene 5.8S, permitiu a identificação molecular das espécies dos isolados, no entanto revelou baixa variabilidade dentre os 18 isolados analisados.
- Os isolados apresentaram diferenças significativas de virulência entre si. No entanto o ranqueamento dos isolados em relação à virulência não foi consistente entre os genótipos analisados.
- A análise da interação entre genótipos do hospedeiro e a virulência do patógeno, baseada em dois isolados do patógeno obtidos de pepino e dois isolados obtidos de melão e quatro genótipos de pepino e três de melão, mostrou ausência de interação quando a inoculação foi realizada no caule porém ocorrência de interação com inoculação na folha.
- Não foi observada relação entre patogenicidade, aspecto de colônia e agrupamento filogenético entre os isolados avaliados.
- A enxertia de híbridos de pepino em abóbora Shelper mostrou redução na severidade da podridão gomosa;

6. REFERÊNCIAS

ARNY, C.J.; ROWE, R.C. Effects of temperature and duration s surface wetness on spore production and infection of cucumbers by *Didymella bryoniae*. **Phytophatology**, v.81, p.206-209, 1991.

BANKOLE, S.A.; JODA, A.O. Effect of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) powder and essential oil on mould deterioration and aflatoxin contamination of melon seeds (*Colocynthis citrullus* L.). **African Journal of Biotechnology**. v. 3,n.1, p. 52-59, January, 2004

CAÑIZARES, K. A. L.; GOTO, R. Enxertia em Cucurbitáceas. In: GOTO, R.; SANTOS, H. S.; CAÑIZARES, K. A. L. (Org.). **Enxertia em Hortaliças**. 1. ed. São Paulo: Fundação Editora UNESP, v. 1, 2003. p. 55-56.

CARDOSO, R.M.G.; FIGUEIREDO, R.B.; PALAZZO, D.; MARTINEZ, J.A. Epidemiology of fruit rot (*Mycosphaerella melonis*, (Pass.) Chiu; J. C. Walker) on italian squash (*Cucurbita pepo* L). **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.41, n. 1, p.35-37, 1974.

CASTRO, R. M. **Seleção *in vitro* e *in vivo* de fungicidas e agentes biológicos para o controle de *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm em melão (*Cucumis melo* L.)**. 1994. 103 f. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1994.

CHIU, W.F. WALKER, J.C. Physiology and pathogenicity of the cucurbit black-rot fungus. **Journal of Agricultural Research**, v.78, n. 12, p.589-615, 1949.

CLUSTAL W. Disponível em :< <http://www.ebi.ac.uk/clustalw> >.

FAO/FAOTAST. Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/paginas/hortalicas_em_numeros/situacao%20das%20hortalicas%20no%20brasil%202005.pdf> acessado em 15 nov 2007.

FERRAZ, D.V.; VILELA, H.B.; COTA, M.F. ; MALUF, W.R. Melancia vermelha e doce. Boletim técnico de hortaliças, n.48, 2000. disponível em <<http://www3.ufla.br/~wrmaluf/bth048/bth048.html>>. Acessado em 05/12/2005 .

FERREIRA, S.A.; BOLEY, R.A. *Didymella bryoniae*. Disponível em <http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/d_bryon.htm>. Acessado em 5/12/2005

FIGUEIREDO, M.B.; CARDOSO, R.M.; HARRUDA, H.V. Blossom excision as method of controlling fruit rot infection caused by *Mycosphaerella melonis* (Pass.) Chiu and J.C. Walker in Italian squash (*Cucurbita pepo* L.). **Arquivo do Instituto Biológico** - São Paulo, v.37, n.4, p.285-292, 1970)

FIORI, A.C.G.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; VIDA, J.B.; SCAPIM, C.A.; CRUZ, M.E.S.; PASCHOLATI, S.F. Antifungal Activity of Leaf Extracts and Essential Oils of some Medicinal Plants against *Didymella bryoniae*. **Journal of Phytopathology**, v.148, p.483-487, 2000.

FNP Consultoria & Comércio. **Agrianual 2000**. São Paulo, 2000. 546p.

GENBANK on line, disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>.

GUSMINI, G.; ELLINGTON, T.L.; WEHNER, T.C. Mass Production of Gummy Stem Blight Spores for Resistance Screening. **Cucurbit Genetics Cooperative Report**. v.26, p.26-30, 2003

GUSMINI, G.; SONG, R.; WEHNER, T.C. New Sources of Resistance to Gummy Stem Blight in Watermelon. **Crop Science**, v.45, p.582-588, 2005.

KEINATH, A. P. Survival of *Didymella bryoniae* in buried watermelon vines in South Carolina. **Plant Disease**, v. 86, p.32-38, 2002.

KEINATH, A. P. Effect of protectant fungicide application schedules on gummy stem blight epidemics and marketable yield of watermelon. **Plant Disease**, v.84, p.254-260, 2000.

KEINATH, A. P.; ZITTER, T. A. Resistance to benomyl and thiophanate-methyl in *Didymella bryoniae* from South Carolina and New York. **Plant Disease**, v. 82, n.5, p.479-484, 1998 a

KEINATH, A. P.; ZITTER, T. A. Resistance to benomyl and thiophanate-methyl in *Didymella bryoniae* from South Carolina and New York. **Plant Disease**, v.82, p.479-484, 1998 b.

KEINATH, A. P. Genetic characterization of *Didymella bryoniae* infecting cucurbits, 1996. Disponível em <<http://www.nal.usda.gov/pgdic/pggrantinfo/1996/0174156.html>>. Acessado em 5/12/2005.

KEINATH, A. P.; FARNHAM, M. W.; ZITTER, T. A. Morphological, pathological, and genetic differentiation of *Didymella bryoniae* and *Phoma* spp. Isolated from cucurbits. **Phytopathology**, v. 85, p. 364-369, 1995.

KOCH, C.A.; LI, P.C.H.; UTKHEDE, R.S. Evaluation of thin films of agarose on glass for hybridization of DNA to identify plant pathogens with microarray technology. **Analytical Biochemistry**, v.342, p.93-102, 2005

KOCH, C.A.; UTKHEDE, R.S. Development of a multiplex classical polymerase chain reaction technique for detection of *Didymella bryoniae* in infected cucumber tissues and greenhouse air samples. **Canadian Journal of Plant Pathology**. v. 26, p.291-298, 2004.

KOENIG, R.L.; PLOETZ, R.C.; KISTLER, H.C. *Fusarium oxysporium* f. sp. *cubensi* consists of a small number of divergent and globally distributed clonal lineages. **Phytopathology**, St Paul, v.87, n.9, p.915-923, 1997

KOTHEA, R.; KEINATH, A.; RALPH, D. AFLP analysis of a worldwide collection of *Didymella bryoniae*. **Mycological research**. V.107, p.297-304, 2003.

KRUGNER, T.L.; BACCHI, L.M.A. Fungos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (eds). **Manual de fitopatologia princípios e conceitos**. v.1. 3.ed. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres LTDA, 1995. cap.4, p.46-96.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A.; REZENDE, J.A.M. Doenças das cucurbitáceas in: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**. São Paulo, ed. Agronômica Ceres, 4ªed. v.2, p.293-310, 2005.

LEE, D.; MATHUR, S.B.; NEEGAARD, P. Detection and location of seed-borne inoculum of *Didymella bryoniae* and its transmission in seedlings of cucumber and pumpkin. **Phytopathology Z**, v.109, p.301-308, 1984.

MALATHRAKIS, N.E.; VAKALOUNAKIS, D.J. Resistance to benzimidazole fungicides in the gummy stem blight pathogen *Didymella bryoniae* on cucurbits. **Plant Pathology**, v.32, p.395-399, 1983.

MATTA, E.A.F.; LUNA, A.M.F.; BENEVIDES, L.E. Ocorrência de *Mycosphaerella melonis* (PASS) Chiu ; Walker no Nordeste, na região do médio São Francisco, em cultivos de melão (*Cucumis melo* L). **B. IBB Salvador**, v.13, n.1, p.71-75, 1974.

PASCHOLATI, S.F., MORAES, W.B.C., FIGUEIREDO, M.B.; OLIVEIRA, A.R. Induced protection in melon plants against *Mycosphaerella melonis* by prior inoculations with *Helminthosporium carbonum* or heat-inactivated *M. melonis*. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, p.507-514, 1986.

PASCHOLATI, S.F.; FIGUEIREDO, M.B.; MORAES, W.B.C. Efeito da temperatura e idade da cultura na germinação, crescimento e esporulação de *Mycosphaerella melonis* (PASS) Chiu; Walker. **Fitopatologia Brasileira**, v.8, p.109-117, 1983.

RIZZO, A.A.N.; CHAVES, F.C.M.; LAURA, V.A.; GOTO, R. Avaliação de métodos de enxertia e porta-enxertos para melão rendilhado. **Horticultura Brasileira**, v.22, n.4, p.808-810, 2004

RIZZO, A.A.N.; FERREIRA, M.R.; BRAZ, L.T. Ação de acibenzolar-s-methyl (BTH) isolado e em combinação com fungicidas no controle do cancro da haste em melão rendilhado. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 238-240, 2003.

SANTOS, G.R.; CAFÉ-FILHO, A.C.; LEÃO, F.F.; CÉSAR, M.; FERNANDES, L.E. Progresso do crestamento gomoso e perdas na cultura da melancia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.2, p.228-232, abr-jun 2005 a.

SANTOS, G.R., CAFÉ-FILHO, A.C.; SABOYA, L.M.F. Controle químico do crestamento gomoso do caule na cultura da melancia. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, n.2, p.155-163. 2005 b.

SCHENCK, N.C. *Mycosphaerella* fruit of watermelon. **Phytopathology**, v.52, p.635-638, 1962.

SITTERLY, W.R.; KEINATH, A.P. Gummy stem blight. 2000. Disponível em <<http://www.apsnet.org/online/feature/pumpkin/gummy.html>>. Acessado em 5/12/2005

SITTERLY, W.R. Effect of crop rotation on cucumber gummy stem blight. **Plant Disease Reporter**, v.53, n. 6, p.417-419, 1969.

SOMAI, B. M., DEAN, R. A., FARNHAM, M. W., ZITTER, T. A., AND KEINATH, A. P. Internal transcribed spacer regions 1 and 2 and random amplified polymorphic DNA analysis of *Didymella bryoniae* and related *Phoma* species isolated from cucurbits. **Phytopathology**, v.92, p.997-1004, 2002 a

SOMAI, B. M.; KEINATH, A. P.; DEAN, R. A. 2002. Development of PCR-ELISA for detection and differentiation of *Didymella bryoniae* from related *Phoma* species. **Plant Disease.**, v.86, p.710-716. 2002 b.

St. AMAND, P.C.; WEHNER, T.C. Eight isolates of *Didymella bryoniae* from geographically diverse areas exhibit variation in virulence but no isolate by cultivar interaction on *Cucumis sativus*. *Plant Disease*, v.79, p.1136-1139, 1995.

SVEDELIUS, G. Effects of environmental factors and leaf age on growth and infectivity of *Didymella bryoniae*. **Mycological Research**, v.97, n.4, p. 885-889, 1990.

TSUTSUMI, C. Y.; SILVA, N. Screening of Melon Populations for Resistance to *Didymella bryoniae* in Greenhouse and Plastic Tunnel Conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.47, n.2 , p.171-177, June, 2004

UTKHEDE, R. BOGDANOFF, C. Influence of lysozyme, yeast, azoxystrobin, and myclobutanil on fungal diseases of cucumbers grown hydroponically. **Crop Protection**, v.22, p. 315-320, 2003.

VAN STEEKELENBURG, N.A.M.; WELLES, G.W.H. Influence of day/night humidity and cation ratios and concentration in the nutrient solution on incidence of *Didymella bryoniae* in glasshouse cucumbers. **Netherlands journal of Agricultural Science**, v.36, p.225-230, 1988

VAN STEEKELENBURG, N.A.M. Epidemiological aspects of *Didymella bryoniae*, the cause of stem and fruit rot of cucumber. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.89, p.75-86, 1983.

VAN STEEKELENBURG, N.A.M. Factors influencing external fruit rot of cucumber caused by *Didymella bryoniae*. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.88, p.47-56, 1982.

VAN STEEKELENBURG, N.A.M. Chemical control of *Didymella bryoniae* in cucumbers. **Netherlands Journal Plant of Pathology**, v.84, p.27-34, 1978.

VIANA, F.M.P.; SANTOS, A.A.; JÚNIOR, R.S.; CARDOSO, J.E.; FREIRE, F.C.O. Monitoramento de Doenças na Produção Integrada do Meloeiro. EMBRAPA agroindústria tropical. **Documento 64**. Fortaleza, CE, 33p. 2002

VIDA, J.B., TESSMANN, D.J., ZAMBOLIM, L., VERZIGNASSI, J.R.; BRANDÃO FILHO, J.U.T. Controle da podridão gomosa em melão rendilhado em cultivo protegido por sanitização de ferramenta de poda. **Fitopatologia Brasileira**, v.29,n.6, p.626-630. 2004.

VIDA, J.B; BRANDÃO FILHO, J.U.T.; NUNES, W.M.C.; SOUTO, E.R. Avaliação de perdas causadas por *Didymella bryoniae* na cultura do melão em estufas plásticas. **Fitopatologia Brasileira**, v.21,p.409, 1996. resumo

WHITE, T.J.,BRUNS, T., LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. in: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (eds). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. Academic Press, San Diego, CA. 1990, p.315-322.

WIANT, J.S. Mycosphaerella black rot of cucurbits. **Journal of agricultural Research**, v .71, n.5, p.193-213, 1945.

ZITTER, A.T. Cucurbit disease update, 2004. Disponível em <http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_352.pdf> acessado em 5/12/2005

7. APÊNDICE

7.1. Alinhamento de nucleotídeos de sequência das regiões ITS1 e ITS2 e gene 5.8S de isolados de *D. bryoniae* isolados de diferentes hospedeiros e seqüências obtidas no *GenBank*

```

AJ972865_Phoma                TGCCATCTCTACCCATGTCTTTTGAGTACCTT-CGTTTCCTCGGCGGGT 49
DQ026014_Phoma                TGCCATCTCTACCCATGTCTTTTGAGTACCTT-CGTTTCCTCGGCGGGT 49
AB266850_D_bryoniae          GCC-ATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTT-CGTTTCCTCGGCGGGT 48
AY293804_D_cucurbitacearum  GCC-ATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTT-CGTTTCCTCGGCGGGT 48
AB266849_D_bryoniae          GCC-ATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTT-CGTTTCCTCGGCGGGT 48
EF160074_D_bryoniae          GCC-ATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTT-CGTTTCCTCGGCGGGT 48
EF160075_D_bryoniae          GCC-ATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTT-CGTTTCCTCGGCGGGT 48
Db04_L2_muskmelon            GCC-ATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTT-CGTTTCCTCGGCGGGT 48
AB266848_D_bryoniae          GCC-ATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTT-CGTTTCCTCGGCGGGT 48
EF107642_D_bryoniae          GCC-ATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTT-CGTTTCCTCGGCGGGT 48
EF160076_D_bryoniae          GCC-ATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTT-CGTTTCCTCGGCGGGT 48
EF107641_D_bryoniae          CCCCATCTCTAG---ATGTCTTTTGAGTACCTC-CGTTTCCTCGGCGGGT 46
AY293798_Phoma                TGCCATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTT-CGTTTCCTCGGCGGGT 49
EU167573_D_bryoniae          TGCCATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTT-CGTTTCCTCGGCGGGT 49
AF297228_D_bryoniae          TGCCATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTT-CGTTTCCTCGGCGGGT 49
Db16_PH_pepino                -GCCATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTT-CGTTTCCTCGGCGGGT 48
Db17_PJ_pepino                -GCCATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTT-CGTTTCCTCGGCGGGT 48
Db10_M5_melao                 -GCCATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTT-CGTTTCCTCGGCGGGT 48
Db11_PC_pepino                -GCCATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTT-CGTTTCCTCGGCGGGT 48
Db19_PN_pepino                -GCCATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTT-CGTTTCCTCGGCGGGT 48
Db06_M1_melao                 -GCCATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTT-CGTTTCCTCGGCGGGT 48
Db18_PL_pepino                -GCCATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTT-CGTTTCCTCGGCGGGT 48
Db08_M3_melao                 -GCCATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTT-CGTTTCCTCGGCGGGT 48
Db13_PE_pepino                -GCCATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTT-CGTTTCCTCGGCGGGT 48
Db14_PF_pepino                -GCCATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTT-CGTTTCCTCGGCGGGT 48
Db15_PG_pepino                -GCCATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTT-CGTTTCCTCGGCGGGT 48
Db07_M2_melao                 -GCCATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTT-CGTTTCCTCGGCGGGT 48
Db20_PV_pepino                -GCCATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTT-CGTTTCCTCGGCGGGT 48
Db12_PD_pepino                -GCCATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTT-CGTTTCCTCGGCGGGT 48
Db03_C1_melancia              -GCCATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTT-CGTTTCCTCGGCGGGT 48
Db01_F4_melancia              -GCCATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTT-CGTTTCCTCGGCGGGT 48
Db02_f7_melancia              -GCCATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTT-CGTTTCCTCGGCGGGT 48
AY157883_D_ligulicola         TGCCATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTT-CGTTTCCTCGGTGGGT 49
AY157875_D_ligulicola         TGCCATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTT-CGTTTCCTCGGTGGGT 49
EF120412_Phoma                TGCCATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTTACGTTTCCTCGGCGGGT 50
AY131201_D_lentis             TGCTATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACTTA-CGTTTCCTCGGTGGGC 49
EU167600_D_rabiei             CGCTACCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACTTA-CGTTTCCTCGGCGGGT 49
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

AJ972865_Phoma CCGCCCGCCGATTGGACAAAACCTTAAA-CCCTTTGTAATTGAAATCAGCG 98
DQ026014_Phoma CCGCCCGCCGATTGGACAAAACCTTAAA-CCCTTTGTAATTGAAATCAGCG 98
AB266850_D_bryoniae TCGCCCGCCGATTGGACAAAACCTTAAA-CCCTTTGTAATTGAAATCAGCG 97
AY293804_D_cucurbitacearum TCGCCCGCCGATTGGACAAAACCTTAAA-CCCTTTGTAATTGAAATCAGCG 97
AB266849_D_bryoniae TCGCCCGCCGATTGGACAAAACCTTAAA-CCCTTTGTAATTGAAATCAGCG 97
EF160074_D_bryoniae TCGCCCGCCGATTGGACAAAACCTTAAA-CCCTTTGTAATTGAAATCAGCG 97
EF160075_D_bryoniae TCGCCCGCCGATTGGACAAAACCTTAAA-CCCTTTGTAATTGAAATCAGCG 97
Db04_L2_muskmelon TCGCCCGCCGATTGGACAAAACCTTAAA-CCCTTTGTAATTGAAATCAGCG 97
AB266848_D_bryoniae TCGCCCGCCGATTGGACAAAACCTTAAA-CCCTTTGTAATTGAAATCAGCG 97
EF107642_D_bryoniae TCGCCCGCCGATTGGACAAAACCTTAAA-CCCTTTGTAATTGAAATCAGCG 97
EF160076_D_bryoniae TCGCCCGCCGATTGGACAAAACCTTAAA-CCCTTTGTAATTGAAATCAGCG 97
EF107641_D_bryoniae TCGCCCGCCGATTGGACAAAACCTTAAA-CCCTTTGTAATTGAAATCAGCG 95
AY293798_Phoma TCGCCCGCCGATTGGACAAAACCTTAAA-CCCTTTGTAATTGAAATCAGCG 98
EU167573_D_bryoniae TCGCCCGCCGATTGGACAAAACCTTAAA-CCCTTTGTAATTGAAATCAGCG 98
AF297228_D_bryoniae TCGCCCGCCGATTGGACAAAACCTTAAA-CCCTTTGTAATTGAAATCAGCG 98
Db16_PH_pepino TCGCCCGCCGATTGGACAAAACCTTAAA-CCCTTTGTAATTGAAATCAGCG 97
Db17_PJ_pepino TCGCCCGCCGATTGGACAAAACCTTAAA-CCCTTTGTAATTGAAATCAGCG 97
Db10_M5_melao TCGCCCGCCGATTGGACAAAACCTTAAA-CCCTTTGTAATTGAAATCAGCG 97
Db11_PC_pepino TCGCCCGCCGATTGGACAAAACCTTAAA-CCCTTTGTAATTGAAATCAGCG 97
Db19_PN_pepino TCGCCCGCCGATTGGACAAAACCTTAAA-CCCTTTGTAATTGAAATCAGCG 97
Db06_M1_melao TCGCCCGCCGATTGGACAAAACCTTAAA-CCCTTTGTAATTGAAATCAGCG 97
Db18_PL_pepino TCGCCCGCCGATTGGACAAAACCTTAAA-CCCTTTGTAATTGAAATCAGCG 97
Db08_M3_melao TCGCCCGCCGATTGGACAAAACCTTAAA-CCCTTTGTAATTGAAATCAGCG 97
Db13_PE_pepino TCGCCCGCCGATTGGACAAAACCTTAAA-CCCTTTGTAATTGAAATCAGCG 97
Db14_PF_pepino TCGCCCGCCGATTGGACAAAACCTTAAA-CCCTTTGTAATTGAAATCAGCG 97
Db15_PG_pepino TCGCCCGCCGATTGGACAAAACCTTAAA-CCCTTTGTAATTGAAATCAGCG 97
Db07_M2_melao TCGCCCGCCGATTGGACAAAACCTTAAA-CCCTTTGTAATTGAAATCAGCG 97
Db20_PV_pepino TCGCCCGCCGATTGGACAAAACCTTAAA-CCCTTTGTAATTGAAATCAGCG 97
Db12_PD_pepino TCGCCCGCCGATTGGACAAAACCTTAAA-CCCTTTGTAATTGAAATCAGCG 97
Db03_C1_melancia TCGCCCGCCGATTGGACAAAACCTTAAA-CCCTTTGTAATTGAAATCAGCG 97
Db01_F4_melancia TCGCCCGCCGATTGGACAAAACCTTAAA-CCCTTTGTAATTGAAATCAGCG 97
Db02_f7_melancia TCGCCCGCCGATTGGACAAAACCTTAAA-CCCTTTGTAATTGAAATCAGCG 97
AY157883_D_ligulicola TCGCCCGCCGTTGGACAACACTTAAA-CCCTTTGTAATTGAAATCAGCG 98
AY157875_D_ligulicola TCGCCCGCCGTTGGACAACACTTAAA-CCCTTTGTAATTGAAATCAGCG 98
EF120412_Phoma CCGCCCGCCGATTGGACAACACTTAAA-CCCTTTGTAAGTTGCAATCAGCG 99
AY131201_D_lentis TCGCCCGCCGATTGGACAAA-ATTTAAA-CCCTTTGCAGTTGCAATCAGCG 97
EU167600_D_rabiei CCGCCCGCCGATTGGACAAA-TCAAA-CCCTTTGCAGTTGCAATCAGCG 97

AJ972865_Phoma TCTGA--AAAA-CCTAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 145
DQ026014_Phoma TCTGA--AAAA-CCTAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 145
AB266850_D_bryoniae TCTGA--AAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 145
AY293804_D_cucurbitacearum TCTGA--AAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 145
AB266849_D_bryoniae TCTGA--AAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 145
EF160074_D_bryoniae TCTGA--AAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 145
EF160075_D_bryoniae TCTGA--AAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 145
Db04_L2_muskmelon TCTGA--AAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 145
AB266848_D_bryoniae TCTGA--AAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 145
EF107642_D_bryoniae TCTGA--AAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 145
EF160076_D_bryoniae TCTGA--AAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 145
EF107641_D_bryoniae TCTGA--AAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 143
AY293798_Phoma TCTGA--AAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 146
EU167573_D_bryoniae TCTGA--AAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 146
AF297228_D_bryoniae TCTGA--AAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 146
Db16_PH_pepino TCTGA--AAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 145
Db17_PJ_pepino TCTGA--AAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 145
Db10_M5_melao TCTGA--AAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 145
Db11_PC_pepino TCTGA--AAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 145
Db19_PN_pepino TCTGA--AAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 145
Db06_M1_melao TCTGA--AAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 145
Db18_PL_pepino TCTGA--AAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 145
Db08_M3_melao TCTGA--AAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 145
Db13_PE_pepino TCTGA--AAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 145
Db14_PF_pepino TCTGA--AAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 145
Db15_PG_pepino TCTGA--AAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 145
Db07_M2_melao TCTGA--AAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 145
Db20_PV_pepino TCTGA--AAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 145
Db12_PD_pepino TCTGA--AAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 145
Db03_C1_melancia TCTGA--AAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 145
Db01_F4_melancia TCTGA--AAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTGGT 145
Db02_f7_melancia TCTGA--AAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 145
AY157883_D_ligulicola TCTGA--AAAA-CCTAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 145
AY157875_D_ligulicola TCTGA--AAAA-CCTAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 145
EF120412_Phoma TCTGA--AAAC-TTAAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 146
AY131201_D_lentis TCTGA--AAAA--CATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 143
EU167600_D_rabiei TCTGA--AAAA--CATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 143

AJ972865_Phoma TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 192
DQ026014_Phoma TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 192
AB266850_D_bryoniae TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 192
AY293804_D_cucurbitacearum TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 192
AB266849_D_bryoniae TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 192
EF160074_D_bryoniae TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 192
EF160075_D_bryoniae TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 192
Db04_L2_muskmelon TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 192
AB266848_D_bryoniae TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 192
EF107642_D_bryoniae TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 192
EF160076_D_bryoniae TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 192
EF107641_D_bryoniae TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 190
AY293798_Phoma TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 193
EU167573_D_bryoniae TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 193
AF297228_D_bryoniae TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 193
Db16_PH_pepino TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 192
Db17_PJ_pepino TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 192
Db10_M5_melao TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 192
Db11_PC_pepino TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 192
Db19_PN_pepino TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 192
Db06_M1_melao TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 192
Db18_PL_pepino TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 192
Db08_M3_melao TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 192
Db13_PE_pepino TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 192
Db14_PF_pepino TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 192
Db15_PG_pepino TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 192
Db07_M2_melao TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 192
Db20_PV_pepino TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 192
Db12_PD_pepino TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 192
Db03_C1_melancia TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 192
Db01_F4_melancia TCTGGCATCATATGAAGAACGCAGCTCAAATGCGATAAGTTAGTGTGAAT 195
Db02_f7_melancia TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 192
AY157883_D_ligulicola TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 192
AY157875_D_ligulicola TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 192
EF120412_Phoma TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 193
AY131201_D_lentis TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 190
EU167600_D_rabiei TCTGGCATCG-ATGAAGAACGCAGCG-AAATGCGATAAGT-AGTGTGAAT 190

AJ972865_Phoma TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 241
DQ026014_Phoma TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 241
AB266850_D_bryoniae TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 241
AY293804_D_cucurbitacearum TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 241
AB266849_D_bryoniae TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 241
EF160074_D_bryoniae TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 241
EF160075_D_bryoniae TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 241
Db04_L2_muskmelon TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 241
AB266848_D_bryoniae TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 241
EF107642_D_bryoniae TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 241
EF160076_D_bryoniae TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 241
EF107641_D_bryoniae TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 239
AY293798_Phoma TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 242
EU167573_D_bryoniae TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 242
AF297228_D_bryoniae TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 242
Db16_PH_pepino TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 241
Db17_PJ_pepino TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 241
Db10_M5_melao TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 241
Db11_PC_pepino TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 241
Db19_PN_pepino TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATATGCGCCCTT 242
Db06_M1_melao TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 241
Db18_PL_pepino TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 241
Db08_M3_melao TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 241
Db13_PE_pepino TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 241
Db14_PF_pepino TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 241
Db15_PG_pepino TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 241
Db07_M2_melao TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 241
Db20_PV_pepino TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 241
Db12_PD_pepino TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 241
Db03_C1_melancia TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 241
Db01_F4_melancia TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 244
Db02_f7_melancia TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 241
AY157883_D_ligulicola TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 241
AY157875_D_ligulicola TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 241
EF120412_Phoma TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 242
AY131201_D_lentis TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 239
EU167600_D_rabiei TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT-TGCGCCCTT 239

AJ972865_Phoma GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 290
DQ026014_Phoma GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 290
AB266850_D_bryoniae GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 290
AY293804_D_cucurbitacearum GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 290
AB266849_D_bryoniae GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 290
EF160074_D_bryoniae GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 290
EF160075_D_bryoniae GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 290
Db04_L2_muskmelon GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 290
AB266848_D_bryoniae GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 290
EF107642_D_bryoniae GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 290
EF160076_D_bryoniae GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 290
EF107641_D_bryoniae GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 288
AY293798_Phoma GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 291
EU167573_D_bryoniae GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 291
AF297228_D_bryoniae GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 291
Db16_PH_pepino GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 290
Db17_PJ_pepino GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 290
Db10_M5_melao GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 290
Db11_PC_pepino GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 290
Db19_PN_pepino GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 291
Db06_M1_melao GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 290
Db18_PL_pepino GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 290
Db08_M3_melao GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 290
Db13_PE_pepino GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 290
Db14_PJ_pepino GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 290
Db15_PG_pepino GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 290
Db07_M2_melao GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 290
Db20_PV_pepino GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 290
Db12_PD_pepino GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 290
Db03_C1_melancia GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 290
Db01_F4_melancia GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 293
Db02_f7_melancia GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 290
AY157883_D_ligulicola GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 290
AY157875_D_ligulicola GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 290
EF120412_Phoma GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 291
AY131201_D_lentis GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 288
EU167600_D_rabiei GGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT-TTGTACCTTCAAGCT 288

AJ972865_Phoma TTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGCGC-AGACT-CG 334
DQ026014_Phoma TTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGCGC-AGACT-CG 334
AB266850_D_bryoniae TTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGCGC-AGACT-CG 334
AY293804_D_cucurbitacearum TTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGCGC-AGACT-CG 334
AB266849_D_bryoniae TTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGCGC-AGACT-CG 334
EF160074_D_bryoniae TTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGCGC-AGACT-CG 334
EF160075_D_bryoniae TTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGCGC-AGACT-CG 334
Db04_L2_muskmelon TTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGCGC-AGACT-CG 334
AB266848_D_bryoniae TTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGCGC-AGACT-CG 334
EF107642_D_bryoniae TTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGCGC-AGACT-CG 334
EF160076_D_bryoniae TTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGCGC-AGACT-CG 334
EF107641_D_bryoniae TTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGCGC-AGACT-CG 332
AY293798_Phoma TTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGCGC-AGACT-CG 335
EU167573_D_bryoniae TTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGCGC-AGACT-CG 335
AF297228_D_bryoniae TTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGCGC-AGACT-CG 335
Db16_PH_pepino CTGCTTGG-TGTAGG-TGTTT-GTTTCGCCTCT-GCGCGC-AGACT-CG 334
Db17_PJ_pepino CTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGCGC-AGACT-CG 335
Db10_M5_melao CTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGCGC-AGACT-CG 334
Db11_PC_pepino CTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGCGC-AGACT-CG 334
Db19_PN_pepino CTGCTTGGGTTGTTGGGTTGTTTGTCTCGCCTCT-GCGCGC-AGACTTGG 339
Db06_M1_melao CTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGCGC-AGACT-CG 334
Db18_PL_pepino CTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGCGC-AGACT-CG 334
Db08_M3_melao CTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGCGC-AGACT-CG 334
Db13_PE_pepino CTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGCGC-AGACT-CG 334
Db14_PJ_pepino CTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGCGC-AGACT-CG 334
Db15_PG_pepino CTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGCGC-AGACT-CG 334
Db07_M2_melao CTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGCGC-AGACT-CG 334
Db20_PV_pepino CTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGCGC-AGACT-CG 334
Db12_PD_pepino CTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGCGC-AGACT-CG 334
Db03_C1_melancia CTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGCGC-AGACT-CG 334
Db01_F4_melancia TTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGCGC-AGACT-CG 337
Db02_f7_melancia TTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGCGC-AGACT-CG 334
AY157883_D_ligulicola CTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGCGC-AGACT-CG 334
AY157875_D_ligulicola CTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGCGC-AGACT-CG 334
EF120412_Phoma CTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGCGC-AGACT-CG 335
AY131201_D_lentis TTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGTGT-AGACT-CG 332
EU167600_D_rabiei TTGCTTGG-TGTTGGG-TGTTT-GTCTCGCCTCT-GCGTGT-AGACT-CG 332

AJ972865_Phoma	A-----GTACTTTTT--TCACTCTTGACC	441
DQ026014_Phoma	A-----GTACTTTTT--TCACTCTTGACC	439
AB266850_D_bryoniae	AGT-----ACATTTTTT--ACACTCTTG-AC	440
AY293804_D_cucurbitacearum	AGT-----ACATTTTTT--ACACTCTTG-AC	439
AB266849_D_bryoniae	AGT-----ACATTTTTT--ACACTCTTG-AC	440
EF160074_D_bryoniae	AGT-----ACATTTTTT--ACACTCTTG-AC	440
EF160075_D_bryoniae	AGT-----ACATTTTTT--ACACTCTTG-AC	440
Db04_L2_muskmelon	AGT-----ACATTTTTT--ACACTCTTG-A-	439
AB266848_D_bryoniae	AGT-----ACATTTTTT--ACACTCTTG-AC	440
EF107642_D_bryoniae	AGT-----ACATTTTTT--ACACTCTTG-AC	440
EF160076_D_bryoniae	AGT-----ACATTTTTT--ACACTCTTG-AC	440
EF107641_D_bryoniae	AGT-----ACATTTTTT--ACACTCTTG-AC	438
AY293798_Phoma	AGT-----ACATTT--T--ACACTCTTG-AC	439
EU167573_D_bryoniae	AGT-----ACATTTT-T--ACACTCTTG-AC	440
AF297228_D_bryoniae	AGT-----ACATTTTTT--ACACTCTTG-AC	441
Db16_PH_pepino	AAGTAA-----CCGTTTTTT--ACCCCTTTTGA-	445
Db17_PJ_pepino	AAGTA-----CA--TTTTT--ACACTCTTTGA-	444
Db10_M5_melao	AAG-----TACATTTTT--ACACTCTTG-A-	439
Db11_PC_pepino	AGT-----ACATTTTTA-CCACTCTTGGA-	440
Db19_PN_pepino	AAAGTACAATTTA-AACACTTCTT--GGACCCTTGAC-	468
Db06_M1_melao	AGT-----ACATTTTT--ACACTCTTG-G-	439
Db18_PL_pepino	AGT-----ACATTTTT--ACACTCTTG-A-	439
Db08_M3_melao	AGT-----ACATTTTT--ACACTCTTG-A-	438
Db13_PE_pepino	AGT-----ACATTTTT--ACACTCTTG-A-	438
Db14_PF_pepino	AGT-----ACATTTTT--ACACTCTTG-A-	438
Db15_PG_pepino	AGT-----ACATTTTT--ACACTCTTG-A-	438
Db07_M2_melao	AGT-----ACATTTTT--ACACTCTTG-A-	438
Db20_PV_pepino	AGT-----ACATTTTT--ACACTCTTG-A-	438
Db12_PD_pepino	AGT-----ACATTTTT--ACACTCTTG-A-	438
Db03_C1_melancia	AGT-----ACATTTTT--TCTCTCTTG-A-	440
Db01_F4_melancia	AGT-----ACATTTTT--ACACTCTTG-AC	443
Db02_f7_melancia	AGT-----ACATTTTT--ACACTCTTG-A-	438
AY157883_D_ligulicola	AGT-----ACATTTTT--ACACTC-----	435
AY157875_D_ligulicola	AGT-----ACATTTTT--ACACTC-----	435
EF120412_Phoma	AGT-----ACATTTTT--ACACTCTTGACC	443
AY131201_D_lentis	GTA-----CATTTTTTA-ACACTCTTGACC	439
EU167600_D_rabiei	GTA-----CATTTTTT--ACACTCTTGACC	437

** * *