

**ADNA CRISTINA BARBOSA DE SOUSA**

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA ATRAVÉS DE MARCADORES  
MOLECULARES E CARACTERÍSTICAS CITOMORFOLÓGICAS  
DE *Colletotrichum gloeosporioides***

**RECIFE – 2004**

**ADNA CRISTINA BARBOSA DE SOUSA**

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA ATRAVÉS DE MARCADORES  
MOLECULARES E CARACTERÍSTICAS CITOMORFOLÓGICAS  
DE *Colletotrichum gloeosporioides***

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

**ORIENTADORA:**

Profa. Dra. Elza Áurea de Luna Alves-Lima

**CO-ORIENTADORA:**

Profa. Dra. Neiva Tinti de Oliveira

**RECIFE – 2004**

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA ATRAVÉS DE MARCADORES  
MOLECULARES E CARACTERÍSTICAS CITOMORFOLÓGICAS DE  
*Colletotrichum gloeosporioides***

**ADNA CRISTINA BARBOSA DE SOUSA**

ORIENTADORA: Profa. Dra. Elza Áurea de Luna Alves Lima

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Neiva Tinti de Oliveira

Dissertação de mestrado apresentada e aprovada no 03 de fevereiro de 2004, pela  
Banca Examinadora, composta dos seguintes membros:

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Profa. Dra. Elza Áurea de Luna Alves Lima (Departamento de Micologia/UFPE)

---

Profa. Dra. Luzinete Aciole de Queiroz (Departamento de Micologia/UFPE)

---

Profa. Dra. Janete Magali de Araújo (Departamento de Antibióticos/UFPE)

**SUPLENTE:**

---

Profa. Dra. Ana Célia Rodrigues de Athayde (Departamento de Medicina  
Veterinária/UFPB)

---

Profa. Dra. Rejane Pereira Neves (Departamento de Micologia/UFPE)

RECIFE – 2004

**Sousa, Adna Cristina Barbosa de**

**Análise da diversidade genética através de marcadores moleculares e características citomorfológicas de *Colletotrichum gloeosporioides* / Adna Cristina Barbosa de Sousa. – Recife : O Autor, 2004.**

**viii, 85 folhas : il., fig., tab., fotos.**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biologia de Fungos, 2004.**

**Inclui bibliografia.**

**1. Genética – Microorganismos. 2. Fungos (*Colletotrichum gloeosporioides*) - Taxonomia e marcadores moleculares. 3. Citomorfologia – Fungos fitopatogênicos – Micro e macroscopia . 4. Fungos fitopatogênicos – Antracnose – Análise microscópica. I. Título.**

“Aquilo que escolhemos é aquilo que somos;  
e aquilo que amamos é aquilo que seremos”.

Faichney, T. T.

Com muita gratidão e sinceridade no coração, dedico primeiramente ao meu grande Mestre, o Senhor Jesus Cristo, razão do meu existir. Aos meus pais e minhas irmãs por terem contribuído para que eu chegasse até aqui. E a todos que sonham dar o melhor de si para ver a Ciência atingir sua essência, contando para isso com a cumplicidade de Deus.

## AGRADECIMENTOS

Num momento de completa seriedade, presto minhas homenagens e agradecimentos a Deus pela sua imprescindível companhia e inspiração outorgada a mim.

Em especial, agradeço aos meus queridos pais, Severino Alves de Sousa e Isabel Sousa, pelo apoio, inestimável confiança, carinho e incentivo para que eu chegasse a essa conquista.

Às minhas mui amadas irmãs, Ana Sousa e Nadja Sousa, pela compreensão e união em todos os momentos, pois, por isso somos uma verdadeira família.

À memória do meu querido cunhado, Josenildo Francisco da Silva, que vibrava com meu sucesso, e cujos exemplos continuam a somar.

Com carinho, expresso minha gratidão e reconhecimento à minha orientadora Profa. Dra. Elza Áurea de Luna Alves Lima, pela dedicação, exemplo de vida, competência na arte de ensinar e de pesquisar, pela feliz oportunidade de poder conviver e compartilhar de seus conhecimentos, e por me conceder a honra de tê-la como orientadora.

À minha Co-orientadora, Profa. Dra. Neiva Tinti de Oliveira, minha sincera apreciação pelo apoio encorajador, sugestões, atenção e estímulo.

À Profa. Dra. Janete Magali de Araújo do Departamento de Antibióticos pela possibilidade de uso de parte dos equipamentos que contribuíram expressamente para viabilizar o término do meu trabalho.

Às colegas, Gláucia e Cláudia do Departamento de Antibióticos, pelas orientações cedidas em todos os momentos em que foram solicitadas.

Ao graduando Franklin Magliliano, pelo excelente trabalho fotográfico da morfologia dos isolados estudados.

Às doutorandas, Meiriana Vila Nova Xavier, Maria do Livramento Ferreira Lima e Ana Cristina Barreto, pela ajuda que me tem prestado no desempenho deste trabalho.

À doutora Bereneuza Tavares, pela disponibilidade, sugestões e amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro.

Enfim, sou grata a todos que, com sinceridade, acreditaram em mim e a tantos colegas e amigos que colaboraram, e mesmo sem saber, gerando um ambiente positivo e favorável para a elaboração deste trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE TABELAS .....	vi
RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	03
2.1. Aspectos taxonômicos de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	03
2.2. Aspectos biológicos de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	04
2.3. Patogenicidade, controle químico e biológico .....	06
2.4. Marcadores moleculares para análise do polimorfismo genético .....	10
2.4.1. <i>Polimerase Chain Reaction</i> (PCR) .....	10
2.4.2. <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> (RAPD) .....	11
2.4.1. Microssatélites .....	12
2.4.2. <i>Intron Splice Site Primer</i> .....	13
2.4.3. Região ITS do DNA ribossomal .....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	15
3.1. Procedência das linhagens de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	15
3.2. Meios de cultura .....	16
3.2.1. Meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) .....	16
3.2.2. Meio Czapek Modificado Líquido .....	16
3.3. Soluções de tampões .....	17
3.3.1. Solução “Tween” 80 0,1%(v/v) .....	17
3.3.2. Tampão Fenol .....	17
3.3.3. Solução Clorofil .....	17
3.3.4. Solução Clorofane .....	17
3.3.5. Solução de brometo de etídio .....	17
3.3.6. Solução albumina .....	18
3.3.7. Solução HCl 1N .....	18



	Página
3.3.8. Solução NaOH 1N .....	18
3.3.9. Solução tampão fosfato .....	18
3.3.10. Solução corante de HCL-Giemsa .....	19
3.3.11. NaCl 0,3M .....	19
3.3.12. Tris (hidroximetil) aminometano (Tris-HCl 1M) pH 8,0 .....	19
3.3.13. Tampão TE pH 8,0 .....	19
3.3.14. Tampão de extração de DNA para fungos filamentosos .....	20
3.3.15. Tampão TBE 10X .....	20
3.3.16. Tampão TBE 1X .....	20
3.3.17. Dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% .....	20
3.3.18. Ácido etileno diamino tetracético (EDTA 0,5 M) pH 8,0 .....	21
3.3.19. Tampão de amostra para eletroforese de DNA .....	21
3.3.20. Gel de agarose para eletroforese do DNA total (0,8%) .....	21
3.3.21. Gel de agarose à 1,0% .....	21
3.3.22. Gel de agarose à 1,4% .....	22
3.3.23. Solução salina (0,85%) .....	22
3.4. Análise da diversidade genética detectada por marcadores moleculares .....	23
3.4.1. Obtenção do micélio para extração de DNA .....	23
3.4.2. Extração do DNA genômico .....	23
3.4.3. Quantificação do DNA genômico .....	24
3.4.4. Amplificação do DNA .....	24
3.4.5. RAPD .....	24
3.4.6. Microsatélites .....	26
3.4.7. <i>Intron Splice Site Primer</i> .....	27
3.4.8. Região ITS do rDNA .....	28
3.4.9. Análise estatística .....	30
3.5. Técnicas de manipulação .....	30
3.5.1. Manipulação da cultura .....	30
3.5.2. Cultura monospórica .....	30
3.5.3. Análise citomorfológica das colônias de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ....	31

	Página
3.5.4. Cultura sob lamínula .....	31
3.5.5. Coloração de HCl-Giemsa .....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	32
4.1. Extração e quantificação do DNA genômico de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	32
4.2. Análise do RAPD .....	33
4.3. Análise das regiões de SSR.....	41
4.4. Análise da região intron .....	48
4.5. Região ITS do DNA ribossomal .....	51
4.6. Análise citomorfológica das linhagens de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	58
5. CONCLUSÕES .....	71
6. REFERÊNCIAS .....	72

## LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1: Quantificação do DNA genômico das linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides*. Nos poços 1, 2 e 3, encontram-se os marcadores do DNA do fago  $\lambda$  nas concentrações de 10, 15 e 20 ng/ $\mu$ L, respectivamente. Nos poços 4 a 5 encontra-se o DNA de *Glomerella cingulata* 4643 e 4644. Nos poços de 6 a 23 o DNA das linhagens 2334, 2335, 2336, 4596, 4597, 3882, 2060, 3102, 4627, 2980, 2681, 2684, 2543, 2018, 3623, 2494, 2460 e 3147 respectivamente.....32

Figura 2: Perfis de RAPD das linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos com o *primer* OPA-02. Nos poços M, marcador de peso molecular do DNA do fago  $\lambda$  clivado com *Hind* III; nos poços 1 e 2 o DNA de *Glomerella cingulata* 4643 e 4644 e nos poços de 3 a 20 encontram-se o DNA das linhagens 2334, 2335, 2336, 4596, 4597, 3882, 2060, 3102, 4647, 2980, 2681, 2684, 2543, 2018, 3923, 2494, 2460 e 3147, respectivamente.....34

Figura 3: Perfis de RAPD das linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos com o *primer* OPA-09. Nos poços M, marcador de peso molecular do DNA do fago  $\lambda$  clivado com *Hind* III; nos poços 1 e 2 o DNA de *Glomerella cingulata* 4643 e 4644 e nos poços de 3 a 20 encontram-se o DNA dos isolados 2334, 2335, 2336, 4596, 4597, 3882, 2060, 3102, 4647, 2980, 2681, 2684, 2543, 2018, 3923, 2494, 2460 e 3147, respectivamente.....35

Figura 4: Perfis de RAPD das linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos com o *primer* OPW-06. Nos poços M, marcador de peso molecular do DNA do fago  $\lambda$  clivado com *Hind* III; nos poços 1 e 2 o DNA de *Glomerella cingulata* 4643 e 4644 e nos poços de 3 a 20 encontram-se o DNA das linhagens 2334, 2335, 2336, 4596, 4597, 3882, 2060, 3102, 4647, 2980, 2681, 2684, 2543, 2018, 3923, 2494, 2460 e 3147, respectivamente..... 36

Figura 5: Perfis de RAPD das linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos com o *primer* OPW-17. Nos poços M, marcador de peso molecular do DNA do fago  $\lambda$  clivado com *Hind* III; nos poços 1 e 2 o DNA de *Glomerella cingulata* 4643 e 4644 e nos poços de 3 a 20 encontram-se o DNA das linhagens 2334, 2335, 2336, 4596, 4597, 3882, 2060, 3102, 4647, 2980, 2681, 2684, 2543, 2018, 3923, 2494, 2460 e 3147, respectivamente.....37

Figura 6: Perfis de RAPD das linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos com o *primer* OPX-04. Nos poços M, marcador de peso molecular do DNA do fago  $\lambda$  clivado com *Hind* III; nos poços 1 e 2 o DNA de *Glomerella cingulata* 4643 e 4644 e nos poços de 3 a 20 encontram-se o DNA das linhagens 2334, 2335, 2336, 4596, 4597, 3882, 2060, 3102, 4647, 2980, 2681, 2684, 2543, 2018, 3923, 2494, 2460 e 3147, respectivamente.....38

Figura 7: Dendrograma das linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtido através de RAPD com os *primers* OPA-02, OPA-09, OPW-06, OPW-17 e OPX-04.....39

Figura 8: Perfis das regiões de SSR das linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtido com o trinucleotídeo (GTG)<sub>5</sub>. Nos poços M, marcador de peso molecular de 100 pb; nos poços 1 e 2 o DNA de *Glomerella cingulata* 4643 e 4644 e nos poços de 3 a 20 encontram-se o DNA das linhagens 2334, 2335, 2336, 4596, 4597, 3882, 2060, 3102, 4647, 2980, 2681, 2684, 2543, 2018, 3923, 2494, 2460 e 3147, respectivamente.....42

Figura 9: Dendrograma das linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides* obtido através dos perfis das regiões de SSR com o trinucleotídeo complementar (GTG)<sub>5</sub>.....43

Figura 10: Perfis das regiões de SSR das linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos com o tetranucleotídeo (GACA)<sub>4</sub>. Nos poços M, marcador de peso molecular de 100 pb; nos poços 1 e 2 o DNA de *Glomerella cingulata* 4643 e 4644 e nos poços de 3 a 20 encontram-se o DNA das linhagens 2334, 2335, 2336, 4596, 4597, 3882, 2060, 3102, 4647, 2980, 2681, 2684, 2543, 2018, 3923, 2494, 2460 e 3147, respectivamente.....46

Figura 11: Dendrograma das linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides* obtido através dos perfis das regiões de SSR obtidos com o tetranucleotídeo complementar (GACA)<sub>4</sub>.....47

Figura 12: Perfis da região *intron splice site primer* das linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos com o *primer* EI-1. Nos poços M, marcador de peso molecular de 100 pb; nos poços 1 e 2 o DNA de *Glomerella cingulata* 4643 e 4644 e nos poços de 3 a 20 encontram-se o DNA das linhagens 2334, 2335, 2336, 4596, 4597, 3882, 2060, 3102, 4647, 2980, 2681, 2684, 2543, 2018, 3923, 2494, 2460 e 3147, respectivamente.....49

Figura 13: Dendrograma das linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides* obtido através dos perfis da região *intron splice site primer* com o *primer* EI-1.....50

Figura 14: Perfis de amplificação da região ITS do rDNA das linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos com os *primers* ITS1 e ITS4. Nos poços M, marcador de peso molecular de 100 pb; nos poços 1 e 2 o DNA de *Glomerella cingulata* 4643 e 4644 e nos poços de 3 a 20 encontram-se o DNA das linhagens 2334, 2335, 2336, 4596, 4597, 3882, 2060, 3102, 4647, 2980, 2681, 2684, 2543, 2018, 3923, 2494, 2460 e 3147, respectivamente.....52

Figura 15: Perfis de restrição dos fragmentos de DNA da região ITS do rDNA das linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos com a enzima *Msp* I. Nos poços M, marcador de peso molecular de 100 pb; nos poços 1 e 2 o DNA de *Glomerella cingulata* 4643 e 4644 e nos poços de 3 a 20 encontram-se o DNA das linhagens 2334, 2335, 2336, 4596, 4597, 3882, 2060, 3102, 4647, 2980, 2681, 2684, 2543, 2018, 3923, 2494, 2460 e 3147, respectivamente.....53

Figura 16: Perfis de restrição dos fragmentos de DNA da região ITS do rDNA das linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos com a enzima *Hae* III. Nos poços M, marcador de peso molecular de 100 pb; nos poços 1 e 2 o DNA de *Glomerella cingulata* 4643 e 4644 e nos poços de 3 a 20 encontram-se o DNA das linhagens 2334, 2335, 2336, 4596, 4597, 3882, 2060, 3102, 4647, 2980, 2681, 2684, 2543, 2018, 3923, 2494, 2460 e 3147, respectivamente.....54

Figura 17: Perfis de restrição dos fragmentos de DNA da região ITS do rDNA das linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos com a enzima *Dra* I. Nos poços M, marcador de peso molecular de 100 pb; nos poços 1 e 2 o DNA de *Glomerella cingulata* 4643 e 4644 e nos poços de 3 a 20 encontram-se o DNA das linhagens 2334, 2335, 2336, 4596, 4597, 3882, 2060, 3102, 4647, 2980, 2681, 2684, 2543, 2018, 3923, 2494, 2460 e 3147, respectivamente.....55

Figura 18: Dendrograma das linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides* obtido através dos perfis dos fragmentos de restrição da região de ITS do rDNA com as enzimas de restrição *Hae* III, *Msp* I e *Dra* I.....56

Figura 19: Colônia de *Colletotrichum gloeosporioides* com 10 dias de crescimento em BDA (Linhagens a. 2334; b. 2336, c. 2335, d. 4596; e. 4597) .....59

	Página
Figura 20: Colônia de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> com 10 dias de crescimento em BDA (Linhagens f. 3882; g. 2060, h. 3102, i. 3147; j. 2494) .....	60
Figura 21: Colônia de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> com 10 dias de crescimento em BDA (Linhagens l. 2681; m. 2684, n. 4627, o. 2980; p. 2543) .....	61
Figura 22: Colônias de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Linhagens q. 3923; r. 2460) e <i>Glomerella cingulata</i> (s. 4643, t. 4644) com 10 dias de crescimento em BDA .....	62
Figura 23: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . Anastomose ( ↑ ). 48 horas. 640x.....	64
Figura 24: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . Conidióforo simples e ( ) ↑ conídios. 72 horas. 640x.....	65
Figura 25: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . Conídios cilíndricos, hialinos e uninucleados. Coloração HCl – Giemsa. 72 horas. 640x.....	66
Figura 26: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . Apressórios. 96 horas. 640x.....	67
Figura 27: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . Acérvulo jovem. 96 horas. 640x.....	68
Figura 28: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . Acérvulo em estágio avançado mostrando setas ( ↑ ). 120 horas. 640x.....	69
Figura 29: <i>Glomerella cingulata</i> . Peritécios. 120 horas. 640x.....	70

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Linhagens de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> utilizadas nesse trabalho .....	15
Tabela 2: Componentes da reação de amplificação do DNA e respectivas concentrações utilizadas na reação de RAPD .....	25
Tabela 3: Componentes da reação de amplificação da região de SSR e respectivas concentrações.....	26
Tabela 4: Componentes da reação de amplificação da região intron e respectivas concentrações .....	27
Tabela 5: Componentes da reação de amplificação da região ITS do rDNA e respectivas concentrações .....	28
Tabela 6: Componentes da reação de digestão dos produtos de amplificação da região ITS do rDNA com as enzimas de restrição e respectivas concentrações .....	29



**ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA ATRAVÉS DE MARCADORES  
MOLECULARES E CARACTERÍSTICAS CITOMORFOLÓGICAS  
DE *Colletotrichum gloeosporioides***

**ADNA CRISTINA BARBOSA DE SOUSA**

**RESUMO**

Foram analisadas 20 linhagens de *C. gloeosporioides* quanto às características genéticas e citomorfológicas. Os marcadores moleculares, RAPD, microssatélites, *Intron Splice Site Primer* e região ITS do DNA ribossomal, foram utilizados para avaliar a diversidade genética entre as linhagens. A análise de agrupamento através do método UPGMA confirmou a diversidade genética intraespecífica reconhecida em *C. gloeosporioides*. Com a técnica de RAPD foi detectada uma maior similaridade genética entre as linhagens. As regiões de microssatélites investigadas, demonstraram alto polimorfismo genético e os *introns* discriminaram todas as linhagens apenas com o *primer* (EI-1), e revelaram maior diversidade genética em relação aos outros marcadores moleculares utilizados. As três enzimas de restrição testadas, *HaeIII*, *DraI* e *MspI* evidenciaram a diversidade genética entre as linhagens nos produtos de amplificação dos loci ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA com os *primers* ITS1 e ITS4. Todos os marcadores empregados, foram eficientes em demonstrar o alto grau de polimorfismo genético, constatado pela formação de grupos altamente diversificados, sem apresentar correlação entre os hospedeiros. Os aspectos macroscópicos exibiram uma variação na coloração, textura e segregação de setores nas colônias, e as observações microscópicas demonstraram a formação de estruturas vegetativas e reprodutivas peculiares da espécie. A condição nuclear investigada através da técnica de HCl-Giemsa, evidenciou conídios 100% uninucleados.

**Palavras-Chave:** *Colletotrichum gloeosporioides*, RAPD, região ITS-rDNA, microssatélite e *Intron Splice Site Primer*

**ANALYSIS OF THE GENETIC DIVERSITY USING MOLECULAR  
MARKERS IS CHARACTERISTIC CYTOMORFOLOGICAL  
IN *Colletotrichum gloeosporioides***

**ADNA CRISTINA BARBOSA DE SOUSA**

**ABSTRACT**

20 strains of *Colletotrichum gloeosporioides* were analyzed as the genetic characteristics and cytomorfological. The molecular markers RAPD, microsatelites, *Intron Splice Site Primer* and analyze the region ITS of the rDNA, they were used to evaluate the genetic diversity among the strains. Analyze of grouping through the method UPGMA it confirmed the diversity genetic intraspecific recognized in *C. gloeosporioides*. With the technique of RAPD presented a larger genetic similarity among the strains ones. The region of investigated microsatelites, demonstrated high genetic polymorphism and the *introns* they just discriminated all the strains with the *primer* (EI-1), and revealed larger genetic diversity in relationship the other techniques. The three restriction enzymes tested, *HaeIII*, *DraI* and *MspI* evidenced the genetic diversity among the strains in the products of amplification of the loci ITS with the *primers* ITS1 and ITS4. All the employed markers, were efficient in demonstrating the high degree of genetic polymorphism, verified by the formation of groups highly diversified, without presenting correlation among the hosts. The macroscopic aspects exhibited a variation in the coloration, texture and segregation of sections, in the colonies, and the observations microscopic demonstrated the formation of vegetative and reproductive structures peculiar of the species. The nucleate condition investigated through the technique of HCl-Giemsa, it evidenced spores 100% onenucleate.

**Key Words:** *Colletotrichum gloeosporioides*, RAPD, microsatelite, *Intron Splice Site primer* and region ITS-rDNA.

## 1. INTRODUÇÃO

*Colletotrichum gloeosporioides* (teleomorfo *Glomerella cingulata*) é um fungo fitopatogênico amplamente disseminado que sobrevive tanto parasitando vegetais quanto saprobicamente em materiais orgânicos em decomposição. É o agente etiológico da antracnose, que ocorre em condições de alta temperatura e umidade, sendo mais severa em regiões tropicais e subtropicais do Brasil. Esta doença limita o cultivo de diversas plantas economicamente importantes, tais como *Anacardium occidentale*, *Passiflora edulis*, *Psidium guajava*, *Allium sp*, dentre outros. Pode atingir toda a planta desde a semente até o fruto pré e pós-colheita, ocasionando grandes prejuízos. A severidade da doença depende das condições ambientais e especificidade ao hospedeiro (DODD, *et al.*, 1992; KIMATI, *et al.*, 1997; CABERA & ALVAREZ, 2002; VARZIA *et al.*, 2002).

Antes do surgimento dos marcadores moleculares, a caracterização dos isolados fúngicos era muito restrita, devido à variação nas características morfológicas, citológicas e patogênicas que dificultam a classificação (MENEZES, 2002). Atualmente, técnicas moleculares têm sido uma ferramenta poderosa, proporcionando grandes avanços na taxonomia e na caracterização fúngica. Marcadores moleculares podem ser usados para avaliar níveis de diversidade genética e relações filogenéticas intra e interespecíficas e caracterizar linhagens (MATIN & FIGUERES, 1999).

Uma ferramenta que tem sido muito utilizada é a técnica *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) que vem contribuindo consideravelmente para a detecção de polimorfismo genético e diagnóstico molecular em vários organismos, inclusive em espécies fúngicas (FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1998; FUNGARO, 2001).

Os microssatélites (*Simple Sequence Repeat* - SSR) são pequenas regiões repetidas em *tandem*, distribuídas aleatoriamente no genoma. Essas regiões são amplificadas individualmente através da *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pela utilização de *primers* específicos que são complementares às seqüências únicas que flaqueiam os microssatélites. Este método é aplicado para avaliar a similaridade e a diversidade genética entre linhagens fúngicas (GRUPTA *et al.*, 1994; JIMÈNEZ & COLLADA, 2000).

Os *introns* são segmentos não codificados quando processados para dar origem ao mRNA. Estes segmentos são amplamente encontrados no genoma dos eucariotos. Os oligonucleotídeos *intron splice site primer* têm sido sintetizados com seqüências complementares do genoma fúngico, podendo auxiliar na taxonomia clássica e no estudo da diversidade genética (PATARO *et al.*, 2000; LEWIN, 2001).

Um outro marcador bastante utilizado baseia-se na amplificação das regiões ITS do rDNA (*Internal Transcribed Spacer - ITS*). Estas regiões aparecem várias vezes no genoma fúngico, permitindo caracterizar diferentes níveis taxonômicos entre gênero e espécies (LODOLO *et al.*, 1995; MATIOLI, 2001).

O presente trabalho teve por objetivo detectar a diversidade genética através de marcadores moleculares e analisar as características citomorfológicas entre linhagens de *C. gloeosporioides* obtidos de diferentes hospedeiros.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Aspectos taxonômicos de *Colletotrichum gloeosporioides*

*Colletotrichum* Corda é um anamorfo, que foi estabelecido baseado nas suas características morfológicas e especificidade ao hospedeiro, em 1837. O teleomorfo *Glomerella* Scherenk e Spaulding foi descrito em 1903 (SUTTON, 1992).

A taxonomia do gênero continuou controversa, sendo que, cerca de 20 espécies foram descritas para *Colletotrichum* e mais de 80 para *Glomerella*. Nessa ocasião, todos os conceitos de gênero e espécies foram baseados nas características citomorfológicas e patogênicas (MANNERS *et al.*, 1992). A taxonomia moderna não despreza essas características e leva em consideração também a análise do DNA através de marcadores moleculares, o que a torna mais eficiente.

O gênero continuou controverso, incluindo as espécies que apresentavam conídios hialinos, encurvados e fusiformes em acérvulos com setas. Apesar dessas nítidas descrições, o gênero foi organizado por SUTTON (1992), que incluiu as espécies do gênero *Colletotrichum* no gênero *Vermicularia*, posteriormente o gênero foi novamente reorganizado sob vários nomes distintos, sendo os mais comumente empregados: *Dicladium*, *Ellisieola*, *Vermicularia*, *Colletotrichum* e *Gloeosporium*. Durante os séculos XIX e XX, esses e outros nomes foram utilizados de forma alterada para várias espécies que hoje estão incluídas no gênero *Colletotrichum*. As espécies do gênero foram distinguidas por CLEMENTS & SHEAR (1931) pela presença de setas marginais, enquanto os representantes do gênero *Vermicularia* por setas dispersas no acérvulo. A presença ou a ausência e arranjo de setas nos acérvulos são características extremamente variáveis, e, portanto, sem significado ao nível taxonômico, resultando na transferência de espécies do gênero *Vermicularia* para o gênero *Colletotrichum*. Muitas espécies deste gênero foram descritas inclusive *Colletotrichum gloeosporioides*.

A diferenciação e a nomenclatura de espécies de *Colletotrichum* foi inicialmente baseada no tipo de hospedeiro onde os isolados foram detectados (SREENIVASSAPRAD *et al.*, 1996). Com base neste aspecto, diferentes nomes foram dados aos isolados

morfologicamente iguais, obtidos de hospedeiros distintos, este critério não revelou claramente as relações intra-específicas (JEFFRIES *et al.*, 1999).

Outras espécies foram descritas com base na morfologia, fisiologia, metabolismo e perfis de proteínas solúveis, causando permanente polêmica sobre a classificação do gênero (SMITH & BLACK, 1990; AGOSTINI *et al.*, 1992). Levando em consideração a morfologia conidial, reta ou falcada, e a especificidade com o hospedeiro desses fungos, SUTTON (1992) refinou a sistemática de alguns grupos, adicionando *C. gloeosporioides* var. *minus* (teleomorfo: *G. cingulatta* var. *minus*) e sugeriu a manutenção da espécie *C. gossypii* var. *cephaloporioides* (teleomorfo: *G. gossypii*) como uma categoria distinta de *C. gloeosporioides*.

Além dos isolados de *C. gloeosporioides* apresentarem uma considerável variação morfológica e patogênica, ocorria mais de uma espécie em um mesmo hospedeiro, ocasionando sintomas complexos, conseqüentemente, foi sugerido a *formae speciales* para diferenciações intra espécies, o que veio tornar a taxonomia mais polêmica (SHERRIFF *et al.*, 1994; KAUFMANN & WEIDEMANN, 1996). Posteriormente, vários sistemas alternativos têm sido propostos, incluindo perfis isoenzimáticos e técnicas moleculares que buscam detectar as relações inter e intraespecíficas para auxiliarem na taxonomia do gênero (GUTHRIEE *et al.*, 1992; LOPEZ, 1999), de modo que esses problemas sejam minimizados.

### **2.2.2. Aspectos biológicos de *Colletotrichum gloeosporioides***

*C. gloeosporioides* se caracteriza por apresentar conídios hialinos, uninucleados e cilíndricos, em acérvulos com ou sem setas que, em condições úmidas, exibem uma massa conidial de coloração alaranjada ou creme, na superfície do tecido afetado. No processo de infecção, os conídios do patógeno, em contato com a superfície do hospedeiro, germinam, produzindo apressórios que possibilitam a fixação e a penetração direta em qualquer órgão da planta. O teleomorfo, *G. cingulatta*, pode apresentar formas homotáticas e heterotáticas, dando origem aos peritécios contendo ascos e ascosporos unicelulares e hialinos (MENEZES & HANLIN, 1996).

Em seringueira e cajueiro a infecção inicial por diferentes isolados de *C. gloeosporioides* varia acentuadamente. Embora todo isolado seja capaz de penetrar na cutícula da folha após a formação de apressórios, alguns podem invadir o hospedeiro através dos estômatos com ou sem formação de apressórios. Em alguns casos, a penetração é seguida da produção de hifas intracelulares, que colonizam rapidamente o tecido do hospedeiro e causam degradação extensa da parede celular (ZULFIQAR, *et al.*, 1996).

VERAS *et al.* (1997) verificaram a ocorrência do *C. gloeosporioides* em cultura de cajueiro, mangueira e citros, lesionando folhas, ramos e frutos. Nas folhas as lesões surgem próximas ou sobre as nervuras apresentando manchas concêntricas e quebradiças, o que leva as folhas a caírem precocemente. Nos ramos, a doença manifesta-se como manchas deprimidas e escuras que podem levar a morte. Os frutos afetados apresentam enrugamento e mudança na textura e na cor da epiderme. As lesões são deprimidas e recobertas por uma massa de esporos de coloração rósea. Uma semana após o aparecimento dos sintomas, surgem pontuações negras, consistindo de setas dos acérvulos do patógeno.

*C. gloeosporioides* é patogênico para diversas culturas e pouco se conhece sobre as bases genéticas desse fungo. A atividade patogênica pode estar associada à presença do ciclo sexual, ou mesmo do ciclo parassexual, que representa uma possibilidade de recombinação genética, muito embora ainda não tenha sido descrita a parassexualidade nesta espécie (MORIN *et al.*, 1996).

## **2.2. Patogenicidade, controle químico e biológico**

*Colletotrichum* agrega diversas espécies fitopatógenas e sapróbias. Os patógenos ocorrem em diversos hospedeiros, como culturas agrícolas e plantas medicinais, arbustos e árvores silvestres, podendo causar lesões necróticas ou manchas em folhas, ramos, pecíolos, pedúnculos, inflorescências e frutos pré e pós-colheita (AGOSTINI *et al.*, 1992; TAVARES *et al.*, 1998), ocasionando prejuízos variáveis dependendo do grau de suscetibilidade das plantas e das condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento da doença (DODD *et al.*, 1992; NETO *et al.*, 1994; MUNIZ *et al.*, 1997; 1998). A condição de sapróbio ocorre no tecido morto, podendo ser facilmente disseminado através

dos insetos, respingos de chuva, mudas infectadas, ação de ventos e água de irrigação, dentre outros (DAVIS *et al.*, 1992).

*C. gloeosporioides* é o agente etiológico da antracnose, que se prolifera em condições de alta temperatura (22-28°C) e umidade, principalmente quando ocorre chuva freqüente coincidindo com o ativo crescimento e florescimento da planta. Essas condições são ideais para o desenvolvimento de epidemias (ANDRADE & DUCROQUET, 1994; 1998). A antracnose é mais severa em regiões tropicais e subtropicais do Brasil e do mundo. Sendo no Brasil a doença de maior importância e de distribuição generalizada nas diversas áreas de cultivo (TEIXEIRA *et al.*, 2001).

Os prejuízos causados por *Colletotrichum spp.* principalmente em países tropicais, resultam tanto na redução direta da qualidade quanto na quantidade dos produtos, aumento dos custos de produção e de pós-colheita, nas quais as infecções latentes não foram detectadas durante o cultivo. Assim, o fungo permanece inativo no tecido do hospedeiro por longo período, antes de formar lesões. Esta característica torna o *C. gloeosporioides* um dos mais importantes patógenos pós-colheita, produzindo infecções quiescentes nos tecidos vegetativos e casca dos frutos de várias culturas. Quando os tecidos tornam-se senescentes, o fungo pode colonizá-los produzindo abundantes acérvulos, em condições úmidas e favoráveis. Infecções em frutos podem causar danos significativos, podendo chegar a uma estimativa de perda de até 100% da produção, entre frutos jovens, próximos a maturação e maduros (SKIPP *et al.*, 1995).

A presença de *C. gloeosporioides* foi constatada em abacate, citros, mamão, pimentão e seringueira, cujos, isolados apresentavam patogenicidade e virulência, principalmente quando inoculados frutos de abacate, mamão, maçã e pimentão, em folhas de mangueira e em folículos de seringueira (STRADIOTO, 1993). A ocorrência deste fungo intensificou os estudos, de maneira que muitas pesquisas surgiram no sentido de se obter maior conhecimento sobre a patogenicidade deste fungo. MADEIRA & REIFSCHNEIDER (1997) demonstraram a patogenicidade de *C. gloeosporioides* em plantas e frutos de goiabeira e constaram que a inoculação com ferimento no ápice e a inoculação na planta inteira, com e sem ferimento, apresentaram danos superiores, portanto um potencial para uso em teste de pré-seleção. Nos frutos, somente o método de inoculação por injeção do fungo provocou os sintomas da doença, assegurando a severa patogenicidade em diversas



partes da planta. A ocorrência de *C. gloeosporioides* foi verificada pela primeira vez na região Nordeste do Brasil, em plantio de mangabeira, com frutos apresentando manchas necróticas. As observações morfológicas revelaram a presença deste fungo, cuja patogenicidade foi testada e confirmada em frutos sadios (MUNIZ, *et al.*, 1997). Já a primeira confirmação de antracnose em cultura de umbu, no Brasil ocorreu com o trabalho de TAVARES *et al.* (1998) quando isolaram *C. gloeosporioides* de umbuzeiro da região irrigada do Médio de São Francisco, de folhas, ramos e frutos apresentando manchas escuras, após inoculação em mudas sadias através de pulverizações e disposição de disco de micélio sobre as folhas.

A patogenicidade de *C. gloeosporioides* também foi demonstrada por FEITOSA (1998) ao analisarem os sintomas da antracnose em folhas de cajueiro com sintomas de antracnose em frutos de acerola, mamão, manga e maracujá. Também foi estudada na Venezuela a antracnose causada por *G. cingulata*, em maracujazeiro, neste caso o patógeno produziu lesões de coloração castanho claro no centro e castanho escuro nas bordas, nos sítios de inserção dos ramos, pecíolos e pedúnculos CEDEÑO *et al.* (2003).

O controle das epidemias causadas por *C. gloeosporioides* é realizado por meio de uma associação com métodos culturais e químicos. Desta forma, as seguintes medidas devem ser tomadas: maior espaçamento favorecendo a ventilação e insolação das plantas; podas leves abrindo a copa para penetração dos raios solares; podas de limpeza reduzindo as fontes de inóculo; instalações dos pomares em regiões mais secas; rotação de culturas; uso de cultivares resistentes; utilização de sementes sadias, cuidado no manuseio pós-colheita, ensacamento dos frutos e pulverizações com fungicidas protetores e sistêmicos (KIMATI *et al.*, 1997).

Durante o período de alta precipitação pluviométrica, as infecções causadas por *C. gloeosporioides* podem ser controladas por diversos grupos de fungicidas: benzimidazoles, triazoles, ditiocarbonatos e compostos de cobre. Outros produtos, tais como clorotalomil, imazalil piperazine (triforine) e imidazoles também são eficientes no controle dessas doenças (LONSDALE *et al.*, 1993; PRUSKY *et al.*, 1995).

NASCIMENTO *et al.* (2000) avaliaram o efeito *in vitro* dos fungicidas prochloraz, azoxystrobin e bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) na inibição do crescimento micelial e *in vivo*, para tratamento dos frutos pós-colheita, no controle de *C. gloeosporioides* isolado de

manga. Constataram que os fungicidas Prochloraz em todas as dosagens, e o Azoxystrobin a  $50\mu\text{g.mL}^{-1}$ , inibiram *in vitro* em 100% o crescimento micelial do fungo, enquanto que o bicarbonato de sódio inibiu 76,6% e 92,6% nas dosagens 5,0 e  $50\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Os fungicidas Prochloraz *in vivo* diferiram significativamente das testemunhas (0,0 $\mu\text{g}$ ), nas dosagens 0,05 e  $0,5\mu\text{g.mL}^{-1}$ , azoxystrobin, nas dosagens 5,0 e  $50\mu\text{g.mL}^{-1}$ , enquanto o bicarbonato de sódio em todas as dosagens não diferiu significativamente da testemunha. BOTELHO *et al.* (2000), também utilizaram diferentes concentrações de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$ ) em tratamento pós-colheita de goiaba pelo método de temperatura diferenciada. Constataram que o cloreto de cálcio estimula o desenvolvimento do fungo até uma determinada concentração, acima da qual verificou-se um efeito inibidor.

A crescente restrição ao uso de fungicidas em pós-colheita, tem levado à busca de novas alternativas de controle de doenças e técnicas de conservação, sendo que, a utilização de cálcio pode ser uma opção, já que este elemento apresenta inúmeras funções no tecido vegetal, podendo retardar a senescência e proporcionar textura mais firmes aos frutos, conferindo-lhes maior resistência às injúrias de natureza fisiológica, microbiana e mecânica (MOOTOO, 1991). Contudo o uso intensivo de fungicidas no controle da antracnose tem favorecido o surgimento de resistência aos mesmos (JEFFRIES *et al.*, 1999; WALLER, 1992). As aplicações não programadas podem ainda interferir na microflora natural das culturas, afetando os mecanismos de biocontrole e favorecendo de alguma forma o aumento na severidade da doença (MASABA & WALLER, 1992). Além disso, há também limitações impostas pela legislação de proteção ao consumidor quanto ao uso de fungicidas (DICKMAN *et al.*, 1995).

O uso de agentes biológicos para controlar doenças causadas por *C. gloeosporioides* ainda não foi bem estabelecido. O biocontrole tem se mostrado como uma promissora alternativa ao uso de produtos químicos. Isolados de *C. gloeosporioides* de folhas de cajueiro, demonstraram alta sensibilidade a *Trichoderma harzianum*, *T. polysporum* e *T. pseudokonigii*, que além de inibirem o crescimento do patógeno, induziram profundas alterações morfológicas nas células das hifas do patógeno, indicando o potencial desses antagonistas no biocontrole da antracnose (LIBERATO & TATAGIBA, 2002). Com a mesma finalidade ROCHA & OLIVEIRA (1998) também avaliaram a possibilidade do controle biológico de *C. gloeosporioides* quando testaram três isolados de *T. konigii* (Ti2,

Ti17 e Ti25) e um isolado de *T. harzianum* (T-25) *in vitro*, em frutos e plantas de maracujá. Os antagonistas *T. koningii* limitaram a ação do fitopatógeno em frutos, reduzindo a área necrosada em torno de ferimentos na epiderme do tecido vegetal, confirmando assim sua ação antagonista e o potencial uso desses fungos no controle de *C. gloeosporioides*.

## **2.3. Marcadores moleculares para análise do polimorfismo do DNA**

### **2.3.1. Polimerase Chain Reaction (PCR)**

As primeiras técnicas que permitiram a detecção do polimorfismo de DNA surgiram na década de 80. A partir de então, elas foram aprimoradas e outras surgiram visando à simplificação dos procedimentos experimentais, à diminuição dos custos e o aumento da resolução (SERAFINI *et al.*, 2001). Entre essas, a técnica da PCR tem revolucionado a genética molecular, tanto nas áreas aplicadas, quanto na pesquisa básica contribuindo para detecção da diversidade genética, emprego na taxonomia e na filogenia em diversos organismos, principalmente em fungos. Também é utilizado em programas de melhoramento genético de plantas e animais (EVANS *et al.*, 1997; AZEVEDO, 1998; FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1998; BRIOSO, 2000).

A técnica da PCR consiste na síntese enzimática *in vitro* de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. A reação de PCR se baseia no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores (*primers*) que delimitam a seqüência de DNA da fita dupla alvo da amplificação. Estes iniciadores são sintetizados artificialmente de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares às seqüências específicas que flaqueiam a região alvo (McPHERSON, *et al.*, 1991; MULLIS, *et al.*, 1998). Resumidamente, cada ciclo da PCR envolve três etapas baseadas em variações de temperatura: desnaturação, anelamento e extensão. Ao final de cada ciclo, ocorre a duplicação do DNA-alvo e depois de 30 a 40 ciclos, obtém-se bilhões de cópias do DNA. Após a reação de amplificação via PCR, os produtos amplificados são analisados por eletroforese em géis de agarose e corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta (BUSCOT *et al.*, 1996; MICHELMORE & HULBERT, 1998; FUNGARO, 2000; AZEVEDO, 2001).

Pela sua versatilidade, a técnica da PCR, gerou um grande avanço nas técnicas de diagnóstico molecular, cujo objetivo é revelar a diversidade e, conseqüentemente, detectar diferenças entre indivíduos (FUNGARO, 2000). O uso de marcadores moleculares permite descrever eventos antes impossíveis de serem detectados. Esses marcadores possibilitam a determinação da variação do DNA por meio de diferenças de homologia (presença ou ausência de alelos, padrão de bandas ou diferenças de nucleotídeos em uma dada parte do genoma) entre dois ou mais indivíduos (LANZA *et al.*, 2000).

### **2.3.2. *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)***

O ponto referencial do grande avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu em 1990, com a idéia de se utilizar *primers* mais curtos e de seqüência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando o conhecimento prévio da seqüência. Esta técnica descrita foi chamada de RAPD (WILLIAMS *et al.*, 1990), que se baseia na amplificação de fragmentos não específicos de DNA. A estratégia é utilizar oligonucleotídeos de 10 – 15 pares como iniciadores (*primers*) para amplificar o DNA genômico utilizando a reação de polimerase em cadeia. Os produtos da PCR são produzidos em regiões do genoma flanqueadas por dois sítios que se apresentam complementares aos “*primers*”. Para que ocorra a amplificação, estes dois sítios devem estar à uma distância máxima de 4000 pares de base, uma vez que este é o limite máximo da PCR. Os produtos amplificados são analisados por eletroforese em géis de agarose. O polimorfismo genético gerado pelos marcadores RAPD são reconhecidos pela presença de um fragmento amplificado em um dos genótipos em relação à ausência desse mesmo fragmento em outro genótipo (MILACAB, 1998; JIMÉNEZ & COLLADA, 2000). Esta técnica tornou-se amplamente utilizada em estudos de diversidade genética, identificação de organismos, resolução de grupos taxonômicos e identificação do grau de similaridade entre genótipos ao nível inter e intraespecífico (FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1998).

A diversidade genética de *C. gloeosporioides* e *C. lindemuthianum* foi analisada por VILARINHOS *et al.* (1995) através de marcadores RAPD. Com base nos resultados os

autores revelaram o alto grau de diversidade em *C. gloeosporioides* e confirmaram a identificação dessas espécies. Outro estudo com RAPD das variedades *C. gossypii* (P13, A26 e Cg2) e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (P15, Cgcl, Cgc4, Chc5, Cgc6 e A25), associada às sementes de algodoeiro, foram analisadas por SILVA-MANN *et al.* (2002). Os resultados mostraram grande diversidade em torno de 51,7% de similaridade para os dois grupos formados. Estes resultados confirmaram a potencialidade do uso da técnica de RAPD para diferenciar fungos. Todavia muitos estudos sucederam de modo que essa técnica tem sido de grande importância para a identificação de *formae speciales* de *Fusarium graminearum*. Os perfis de DNA gerados por um pequeno número de *primers* aleatórios e pela clivagem de alguns produtos originados por estes *primers*, foram suficientes para distinguir todos os isolados testados (MILLER *et al.*, 1991; QUELLET & SEIFERT, 1993). Essa técnica também é extensamente utilizada para a caracterização de fungos entomopatogênicos, para avaliação de epizootias causadas após a aplicação do fungo no campo. Exemplos de diferenciação de espécies são diversos, como nos fungos *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride* e *Beauveria bassiana* (BIDOCHKA *et al.*, 1994; DRIVER *et al.*, 2000; FREIRE *et al.*, 2001).

O polimorfismo genético através da técnica de RAPD também foi detectado por SAHA *et al.* (2002) em *C. gloeosporioides* (antracnose e lesões nas folhas) e *C. acutatum* (manchas largas) isolados de *Hevea*; os isolados foram agrupados de acordo com os sintomas causados no tecido vegetal. A análise do dendrograma permitiu a visualização de dois grupos distintos, confirmando assim, a eficiência da técnica para discriminar as duas espécies.

### **2.3.3. Microssatélites**

As regiões de microssatélites consistem de pequenas seqüências simples repetidas (SSR – *Simple Sequence Repeats*), altamente polimórficas com 1 a 6 nucleotídeos, encontradas no genoma de vários organismos (MATIOLI, 2001). Esses marcadores são indicados para o mapeamento genético e o físico do genoma para identificação e discriminação de genótipos e para estudos genéticos de populações. Este método já foi testado em fungos detectando polimorfismo inter e intraespecíficos nos patógenos (HAN *et*

*al.*, 2002). Esta técnica exibe vantagem em relação ao RAPD, por apresentar grande reprodutibilidade, e por ser um marcador codominante, permitindo a visualização do heterozigoto (CARVALHO *et al.*, 2000; JIMÈNEZ & COLLADA, 2000). Essa técnica também foi eficiente para se detectar polimorfismo intraespecífico em *Beauveria brongniartii* (ENKERLI *et al.*, 2001), *Saccharomyces cerevesiae* (BARNES *et al.*, 2001), *Armillaria cepistipes* (HANTULA *et al.*, 1996), *Phytophythora cactorum* (COUTO *et al.*, 1996), utilizando diferentes iniciadores complementares às regiões de microssatélites representados pelos trinucleotídeos (GAC)<sub>5</sub> e (GTG)<sub>5</sub>, e constataram uma diversidade genética ao nível intraespecíficos. No mesmo sentido, estudos sobre a diversidade genética em *Colletotrichum spp* utilizando microssatélites, demonstraram o alto polimorfismo nas regiões de tri, tetra e pentanucleotídeos, confirmando assim a grande diversidade genética existente neste fungo (FREEMAN *et al.*, 1993).

#### **2.3.4. Intron Splice Site Primer**

O genoma dos eucariotos apresenta cromossomos que contém *exons* e *introns*. A existência de *exons* codificantes de proteínas e *introns* não codificantes, foi demonstrada em 1977, a partir do estudo de transcritos de pré-RNA mensageiro produzidos nos núcleos da células eucarióticas, infectadas por adenovírus. A análise através da microscopia eletrônica, demonstrou a existência da alça R no interior de heteroduplexes formados entre mRNAs e sua seqüência complementar do DNA genômico. A alça R representa um *intron* no interior do DNA, que se encontra transcrito no pré-mRNA, mas é removido por montagem (*Splicing*) do RNA durante o processamento do mRNA, estando ausente, conseqüentemente, no transcrito final do mRNA. Os *introns* constituem marcadores moleculares, que podem auxiliar na taxonomia e no estudo da diversidade genética intra e interespecies (DE BARROS *et al.*, 1996; BROWN, 1999; LEWIN, 2001). Esses estudos também foram realizados em *M. anisopliae var. anisopliae*, um fungo entomopatogênico, usando *primers* heterólogos do gene 28S de rDNA de *Verticillium dahliae*, foram identificados *introns* em espaços na região 28S do rDNA e revelaram a presença de 5 grupos distintos de *introns* em três diferentes sítios de inserção (MAVIDOU *et al.*, 2000).

Também foram detectados diferentes perfis e alto grau de polimorfismo genético entre linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de três destilarias, utilizando o *primer* EI-1 da região *intron* grupo I (PATARO *et al.*, 2000).

### 2.3.5. Região ITS do DNA ribossomal

A análise da região ITS por ser conservada através de gerações, tem sido uma ferramenta poderosa para o estudo de filogenia e de identificação genética. (ANDERSON & STAVOSKI, 1992; BERRETA *et al.*, 1998; FUNGARO 2000). Essa técnica foi usada, juntamente com a RAPD para investigar a diversidade genética entre isolados de *Colletorichum spp* de diferentes hospedeiros e regiões. MILLS *et al.* (1992). Constataram que as regiões ITS1 e ITS4 analisadas de *C. gloeosporioides* revelaram um alto grau de polimorfismo entre os isolados, possibilitando a discriminação das espécies relacionadas e as variedades de uma mesma espécie. Todavia muitos fungos têm os estudos taxonômicos facilitados pelo uso da análise da região ITS. Em *Beauveria brongniartii*, *Metarhizium anisopliae*, *Fusarium sambucinum* e *Paecilomyces variotii*, alta diversidade intraespecífica foi observada, sendo esta região útil para caracterização de isolados dessas espécies (O'DONNELL, 1992; WARD & GRAY 1992; LEAL, *et al.*, 1996; NEUVÈGLISE *et al.*, 1994).

MUNAUT *et al.* (2002), detectaram a variação no DNA ribossomal de *C. gloeosporioides*, *C. musae*, *C. fuscum* e *C. fragariae*, isolados de diferentes regiões e hospedeiros. Os resultados analisados utilizando as regiões ITS1 e ITS2 revelaram a presença de bandas polimórficas entre as linhagens e a separação das mesmas em cinco grupos, mostrando nitidamente a distância entre as espécies. Por outro lado, VINNERE *et al.* (2002) examinaram *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. fragariae*, *G. cingulata*, e *C. dematium* em lesões escuras em *Rhododendron*. Os isolados foram separados com base na dimensão e na forma dos conídios, como também na presença ou ausência de apressórios. A análise das regiões ITS1, ITS2 e 5.8S do rDNA confirmou a existência de um grupo de isolados de *C. gloeosporioides* geneticamente distinto.

### 3. MATERIAL E MÉTODO

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Citologia e Genética de Fungos e de Genética Molecular de Fungos da Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

#### 3.1. PROCEDÊNCIA DAS LINHAGENS DE *Colletotrichum gloeosporioides*

Vinte linhagens de *C. gloeosporioides* foram obtidas da Coleção de Cultura de Fungos (Micoteca-URM) do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (Tabela 1).

**Tabela 1:** Linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides*, utilizadas nesse trabalho.

NÚMERO DE ACESSO	SUBSTRATO
NA MICOTECA - URM	
4643 <sup>1</sup>	<i>Passiflora edulis</i>
2681	<i>Passiflora edulis</i>
4644 <sup>1</sup>	<i>Anacardium occidentale</i>
4597	<i>Anacardium occidentale</i>
2334	<i>Punica granatum</i>
2335	<i>Psidium guajava</i>
2336	<i>Eugenia pitanga</i>
4596	<i>Mangifera indica</i>
2494	<i>Mangifera indica</i>
3882	<i>Marana sp</i>
3102 <sup>2</sup>	<i>Paulicorrea marcgravii</i>
4627	<i>Allium spp</i>
2018	<i>Allium spp</i>
2684	<i>Brassica oleracea</i>
2543	<i>Sechium edule</i>
2060	Folhedo
2460	Folhedo



2980	Solo marinho
3147	Solo marinho
3923	Água do Rio Capibaribe

Obs.: <sup>1</sup> Teleomorfo *Glomerella cingulata*.

<sup>2</sup> Linhagem originária de São Paulo, as demais de Pernambuco.

## 3.2. MEIOS DE CULTURA

### 3.2.1. Meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) - Oxoid

Batata-dextrose-ágar	39,0g
Água destilada	1000mL

O pH foi ajustado para 6.8 com solução de NaCl 1N ou HCl 1N. O meio foi autoclavado durante 15 minutos à 120°C.

### 3.2.2. Meio Czapek Modificado Líquido

FeSO <sub>4</sub>	0,10g
KCl	0,50g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,00g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,00g
NaNO <sub>3</sub>	3,00g
ZnSO <sub>4</sub>	0,01g
Sacarose	30,00g
Extrato de levedura	1,00g
Caseína	1,00g
Peptona de carne	1,00g
Água destilada	1000mL

O pH foi ajustado para 6.8 com solução NaCl 1N ou HCl 1N. O meio foi autoclavado durante 15 minutos à 120°C.

### **3.3. SOLUÇÕES E TAMPÕES**

#### **3.3.1. Solução “Tween” 80 0,1%(v/v)**

“Tween” 80	1,00 mL
Água destilada	1000mL

Esta solução foi distribuída em tubos com tampa rosqueada, autoclavada durante 15 minutos à 120°C, em seguida mantidos à temperatura ambiente.

#### **3.3.2. Tampão Fenol**

Foi utilizado fenol pronto para o uso, fornecido pela Gibco BRL Life Technologies.

#### **3.3.3. Solução Clorofil**

Obtida a partir da mistura de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 24:1 (v/v).

#### **3.3.4. Solução Clorofane**

Obtida a partir da mistura de fenol e clorofil na proporção de 1:1 (v/v).

#### **3.3.5. Solução de brometo de etídio (SAMBROOK *et al.*, 1989)**

Brometo de etídio	0,01g
Água destilada	100mL

Manipulou-se uma solução estoque de 10mg/mL pela adição de 1g de brometo de etídio a 100mL de água destilada. Esta solução foi colocada em um agitador magnético por uma hora e posteriormente acondicionada em um frasco escuro e mantidos à 4°C. No momento de uso, 20µL dessa solução foram adicionados a 200mL de tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X.

### **3.3.6. Solução albumina**

Clara de ovo	0,50 mL
Água destilada autoclavada	95,00mL

A mistura foi acondicionada em frasco escuro e mantida à 4°C.

### **3.3.7. Solução HCl 1N**

HCl	85,00 mL
Água destilada	1000mL

A solução foi mantida à temperatura ambiente.

### **3.3.8. Solução NaOH 1N**

NaOH	40,00g
Água destilada	1000mL

A solução foi mantida à temperatura ambiente.

### **3.3.9. Solução tampão fosfato (FURTADO, 1968)**

#### Solução A

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	3,73g
Água destilada	1000mL

#### Solução B

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,40g
Água destilada	1000mL

Sete partes da solução A foram adicionadas a três partes da solução B. O pH foi ajustado para 7,0.

#### **3.3.10. Solução corante de HCL – Giemsa (FURTADO, 1968)**

Solução estoque Giemsa	1,00mL
Solução tampão	10,00mL

As soluções foram misturadas no momento de uso.

#### **3.3.11. NaCl 0,3M**

NaCl	17,50g
Água deionizada	1000mL

A solução foi autoclavada durante 15 minutos à 120°C e mantida a 4°C.

#### **3.3.12. Tris (hidroximetil) aminometano (Tris-HCl 1M) pH 8,0**

Trizma base	121g
Água deionizada	1000mL

Ao Tris foram adicionados 800mL de água deionizada e o pH foi ajustado para 8,0 com HCl concentrado. Em seguida, a solução foi aquecida e deixada à temperatura ambiente para esfriar, e completado o volume com água deionizada para 1000mL. Esta solução foi autoclavada durante 15 minutos à 120°C e estocada à 4°C.

### **3.3.13. Tampão TE pH 8,0**

Tris-HCL 1M pH 8,0	1,00mL
EDTA 0,5 pH 8,0	0,20mL

O volume foi completado para 100mL com água deionizada. O tampão foi autoclavado durante 15 minutos à 120°C e mantido a 4°C.

### **3.3.14. Tampão de extração de DNA para fungos filamentosos (READER & BRODA, 1985).**

Tris-HCl 1M	2,00mL
EDTA 0,5 pH 8,0	0,50mL
SDS 10%	1,00mL
NaCl 5M	0,50mL
Água deionizada	6,00mL

O tampão foi preparado somente no momento do uso.

### **3.3.15. Tampão TBE 10X**

Trizma base	54,00g
Ácido Ascórbico	27,50g
EDTA 5M.	20,00mL
Água deionizada.	1000mL

O pH foi ajustado para 8,0 com HCl concentrado. O tampão foi autoclavado a 120°C por 15 minutos. No momento do uso foi diluído em água deionizada autoclavada para obter uma concentração de 1X.

### **3.3.16. Tampão TBE 1X**

Tampão TBE 10X	100mL
Água deionizada	900mL

A diluição foi realizada no momento do uso.

### **3.3.17. Dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%**

SDS	20,00g
Água deionizada	200mL

Foram dissolvidos 20g de SDS em água deionizada autoclavada. A solução foi mantida a temperatura ambiente.

### **3.3.18. Ácido etileno diamino tetracético (EDTA 0,5 M) pH 8.0**

EDTA	37,22g
Água deionizada	1000L

A solução foi agitada até a completa dissolução dos compostos sólidos e o volume completado para 1000mL com água deionizada.

O pH foi ajustado com pastilhas de NaOH para 8.0 em seguida a solução foi autoclavada e mantida à 4°C.

### **3.3.19. Tampão de amostra para eletroforese de DNA**

Azul de bromofenol	0,25g
Ficol	15,0g
Água deionizada	100mL

A solução foi aquecida sem atingir o ponto de ebulição e estocada à 4°C.

### **3.3.20. Gel de agarose para eletroforese de DNA total (0,8%)**

Agarose	0,56g
TBE 1X	90,00mL

A solução foi aquecida até a total fusão.

### **3.3.21. Gel de agarose à 1,0%**

Agarose	0,90g
TBE 1X	90mL

A solução foi aquecida até total fusão.

### **3.3.22. Gel de agarose à 1,4%**

Agarose	1,26g
TBE 1N	90,00mL

A solução foi aquecida até total fusão.

### **3.3.23. Solução salina (0,85%)**

NaCl	8,50g
Água destilada	1000mL

Esta solução foi distribuída para tubo com tampa de rosca e autoclavada a 120°C por 15 minutos, e, em seguida conservada à temperatura ambiente.

## **3.4. ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DETECTADA POR MARCADORES MOLECULARES**

### **3.4.1. Obtenção do micélio para extração de DNA**

Conídios das linhagens de *C. gloeosporioides* foram suspensos em 3,0mL de solução “Twenn” 80 em tubos de ensaio e transferidos para frascos de Erlenmeyer contendo 100mL de meio czapeck modificado líquido. Após a inoculação, estes frascos foram mantidos sob agitação de 120 rpm à temperatura ambiente por 96 horas para o crescimento do fungo. Após este período o micélio foi coletado por filtração a vácuo em papel filtro, lavado com água destilada autoclavada, determinada a massa úmida e estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento de uso para a extração de DNA.

#### **4.4.2. Extração do DNA genômico**

A extração de DNA genômico a partir do micélio de *C. gloeosporioides*, foi realizada conforme a técnica descrita por RAEDER & BRODA (1985). O micélio foi triturado com nitrogênio líquido até a completa pulverização e transferido para um microtubo, onde foi adicionado cerca de 800 $\mu\text{L}$  de tampão de extração, e incubado por 15 minutos a  $65^{\circ}\text{C}$ . Após homogeneização os microtubos foram incubados por 15 minutos a  $65^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente foi adicionado um volume de tampão fenol e centrifugado a 12.000 rpm por 15 minutos. A fase aquosa recuperada e transferida para um novo microtubo foi adicionada um volume de clorofane, homogeneizada e centrifugado novamente. Recuperado o sobrenadante e transferido para outro microtubo foi adicionado um volume de clorofil, homogeneizado e centrifugado nas concentrações anteriores, recuperando o sobrenadante. Em seguida, o DNA foi precipitado com NaCl 0,3M e dois volumes de etanol absoluto resfriados a  $-20^{\circ}\text{C}$  (overnight). Os tubos foram submetidos a centrifugação nas mesmas condições anteriores e o precipitado lavado com etanol a 70%, seco em câmara de fluxo laminar e ressuspendido em tampão TE pH 8.0 e preservado sob refrigeração.

#### **3.4.3. Quantificação do DNA genômico**

A concentração de DNA foi estimada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%, a  $3\text{ V/cm}^{-1}$  de distância entre os eletrodos, utilizando tampão de corrida 1X TBE, por comparação com o marcador de peso molecular DNA do fago  $\lambda$  (Invitrogen Life Technologies). Após a migração eletroforética, o gel foi corado em solução de brometo de



etídio durante 20 minutos, observado em transiluminador de luz ultravioleta e fotografado usando filme Polaroid 667.

#### **3.4.4. Amplificação do DNA**

A amplificação das amostras de DNA foi realizada através da PCR. Para a técnica de RAPD, foram utilizados os *primers* OPA-02 (5'TGCCGCGCTG3'), OPA-09 (5'GGGTAACGCC3'), OPW-06 (5'AGGCCCGATG3'), OPW-17 (5'GTCCTGGGTT3') e OPX-04 (5'CCGCTACCGA3') da Operon Technologies. Para as regiões de microssatélites foram utilizados os nucleotídeos complementares (GTG)<sub>5</sub> (5'GTGGTGGTGGTGGTG3') e (GACA)<sub>4</sub> (5'GACAGACAGACAGACA3') da Invitrogen. Para amplificação da região *intron* foi utilizado o *primer* EI-1 (5'CTGGCTTGGTGTATGT3') da Invitrogen e a reação de amplificação da região ITS (ITS1-5.8S-ITS2) foi realizada utilizando os *primers* ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTCCG3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') da Invitrogen.

#### **3.4.5. RAPD**

##### **3.4.5i. Seleção dos *Primers***

O DNA genômico da linhagem 4596 foi utilizado para seleção dos *primers*, com finalidade de avaliar a capacidade de amplificação de cada um deles. Os kits testados foram: OPA, OPW e OPX da Operon Technologies CA, USA.

### 3.4.5ii. Amplificação do DNA

Para as reações de amplificação foram empregados um volume final de 25µL, cujas concentrações e componentes estão descritos na Tabela 2. A etapa de desnaturação inicial foi constituída de 5 minutos a 92°C, seguidos por 40 ciclos de 1 minuto a 92°C, 1 minuto e 30 segundos a 39°C e 52 minutos a 72°C, e uma extensão final de 5 minutos a 72°C. Foram retirados 20µL de cada um dos produtos de amplificação das amostras de *C. gloeosporioides*, separadamente, e misturados a 4µL do tampão de amostra para serem submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,4%, à 3 V/cm<sub>-1</sub> de distância entre os eletrodos em tampão de corrida 1X TBE. A quantificação foi feita por comparação de concentrações crescentes de fago λ clivado com *Hind*III (Invitrogen Life Technologies). Após eletroforese o DNA foi visualizado através da coloração em brometo de etídio por 20 minutos, visualizados em transiluminador de luz UV e fotografado posteriormente com filme preto e branco 667 ASA Polaroid, com filtro laranja.

**Tabela 2:** Componentes da reação de amplificação do DNA e respectivas concentrações utilizadas na reação de RAPD.

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO INICIAL	CONCENTRAÇÃO FINAL	VOLUME POR REAÇÃO (µL)
Água Milli-Q			11,1
Tampão de amplificação	10X		2,50
dNTPs	2,50mM	0,25mM	2,50
<i>Primers</i>	4,00pmol/µL	0,4pmol/µL	2,50
MgCL <sub>2</sub>	10,00mM	3,4mM	1,00
Taq polimerase	5,00U/µL	2,0U/µL	0,40
DNA	5,00ng/µL	25ng/µL	5,00
<b>TOTAL</b>			<b>25,00µL</b>

### 3.4.6. Microssatélites

#### 3.4.6i. Nucleotídeos (GTG)<sub>5</sub> e (GACA)<sub>4</sub>

As reações de amplificação das regiões de microssatélites com os nucleotídeos (GTG)<sub>5</sub> e (GACA)<sub>4</sub> foram feitas para um volume final de 25µL nas concentrações descritas na Tabela 6. A amplificação para (GTG)<sub>5</sub> foi programada para um ciclo inicial de desnaturação a 93°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de 20 segundos a 93°C, 45 segundos a 55°C e 90 segundos a 72°C, e uma extensão final de 6 minutos a 72°C. Para o tetranucleotídeo (GACA)<sub>4</sub> foi utilizada a mesma programação. Da reação dos produtos amplificados das regiões de SSR, foram retirados 20µL e misturados a 4µL de tampão de amostra e submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% , à 3 V/cm<sup>-1</sup> de distância entre os eletrodos em tampão de corrida 1X TEB utilizando-se o marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen Life Technologies). Após eletroforese o gel foi corado em brometo de etídio por 20 minutos, visualizados em transiluminador de luz UV e fotografado.

**Tabela 3:** Componentes da reação de amplificação da região de SSR e respectivas concentrações.

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO INICIAL	CONCENTRAÇÃO FINAL	VOLUME POR REAÇÃO (µL)
Água Milli-Q			12,0
Tampão de amplificação	10X	1X	2,50
BSA	0,50mg/µL	0,02	2,50
dNTPs	2,00mM	0,20mM	2,50
<i>Primer</i>	25pmol/µL	0,25pmol/µL	2,50
MgCL <sub>2</sub>	5,00mM	0,20mM	1,50
Taq polimerase	5,00U/µL	2,0U/µL	0,50
DNA	5,00ng/µL	25,0ng/µL	1,00

*TOTAL*

*25,00 $\mu$ L*

### **3.4.7. INTRON SPICE SITE PRIMER**

Foi utilizado um volume final de 25 $\mu$ L nas concentrações descritas para a reação de amplificação (Tabela 4). Os ciclos de amplificação constaram de uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 45°C e 1 minuto e 30 segundos a 74°C, e uma extensão final de 5 minutos a 74°C. Dos produtos amplificados da região Intron, foram retirados 20 $\mu$ L e misturados a 4 $\mu$ L de tampão de amostra e submetidos a eletroforese (agarose a 1,4%), à 3 V/cm-1 de distância entre os eletrodos em tampão de corrida 1X TBE, usando-se o marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen Life Technologies). Após eletroforese, o gel foi corado em brometo de etídio por 20 minutos, visualizado em transiluminador sob luz UV e fotografado.

**Tabela 4:** Componentes da reação de amplificação da região intron e respectivas concentrações.

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO INICIAL	CONCENTRAÇÃO FINAL	VOLUME POR REAÇÃO ( $\mu$ L)
Água Milli-Q			12,30
Tampão de amplificação	10X	1X	2,50
BSA	0,50mg/mL	0,05	2,50
dNTPs	2,00mM	0,20mM	2,50
<i>Primer</i>	5,00pmol/ $\mu$ L	0,50pmol/ $\mu$ L	2,50
MgCL <sub>2</sub>	10,00mM	3,40mM	1,50
Taq polimerase	5,00U/ $\mu$ L	2,0U/ $\mu$ L	0,20
DNA	50ng/ $\mu$ L	25ng/ $\mu$ L	1,00

*TOTAL*  
**25,00µL**

---

---

### 3.4.8. Região ITS do rDNA

#### 3.4.8i. Amplificação de DNA da região ITS do rDNA

Inicialmente a reação de amplificação foi feita para um volume final de 25µL, cujas concentrações e componentes são mostrados na Tabela 5. Os ciclos de amplificação foram constituído por uma etapa de desnaturação inicial de 4 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de 1 minuto a 92°C, 1 minuto a 55°C e 2 minutos a 72°C, e uma extensão final de 5 minutos a 72°C. Foram retirados 4µL dos produtos amplificados do locus ITS1-S.8.S-ITS2 do rDNA e misturados a 2,0 µL do tampão de amostra, e submetidos a eletroforese (agarose 1%) à 3 V/cm<sup>-1</sup> de distância entre os eletrodos em tampão de corrida 1X TBE, usando o marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen Life Technologies). Após corrida eletroforetica o gel foi corado em brometo de etídio por 20 minutos, observados em transiluminador de luz UV e fotografado.

**Tabela 5:** Componentes da reação de amplificação da região ITS do rDNA e respectivas concentrações.

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO INICIAL	CONCENTRAÇÃO FINAL	VOLUME POR REAÇÃO (µL)
Água Milli-Q			15,75
Tampão de amplificação	10X	1X	2,50
dNTPs	2,50mM	0,25mM	2,50
ITS 1	12,50pmol/µL	2,0pmol/µL	1,00
ITS 2	12,50pmol/µL	2,0pmol/µL	1,00

MgCL <sub>2</sub>	10,00mM	3,4mM	0,75
Taq polimerase	5,00U/μL	2,0U/μL	0,50
DNA	5,00ng/μL	25ng	1,00
<b>TOTAL</b>			<b>25,00μL</b>

### 3.4.8ii. Restrição dos fragmentos amplificados das regiões ITS do rDNA.

A digestão enzimática foi realizada pela mistura de 4μL dos produtos amplificados das regiões ITS do rDNA com 16μL da reação de restrição descrito na Tabela 6. Após a incubação por 2 horas à 37°C com cada uma das três enzimas de restrição *DraI*, *MspI* e *HaeIII* (Invitrogen Life Technologies), os fragmentos da digestão foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,0% para as enzimas *DraI* e *HaeIII*, utilizando o marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen Life Technologies). Em gel de agarose a 1,4% para a enzima *MspI*, utilizando o mesmo marcador descrito acima. Após corrida eletroforetica à 3 V/cm<sup>-1</sup> de distância entre os eletrodos, imerso em tampão de corrida TBE 1X, o gel foi corado em brometo de etídio por 20 minutos, visualizado em transiluminador de luz UV e fotografado.

**Tabela 6:** Componentes da reação de digestão dos produtos de amplificação da região ITS do rDNA com enzima de restrição, e respectivas concentrações.

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO INICIAL	CONCENTRAÇÃO FINAL	VOLUME POR REAÇÃO (μL)
Enzima	10U/μL	4,0U/μL	0,20
Tampão da enzima	1X	0,01X	2,00
Água Milli-Q			13,80
<b>TOTAL</b>			<b>16,00μL</b>

---

### **3.4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados obtidos dos cinco marcadores moleculares foram analisados pelo programa NTSYS – PC (Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs) (ROHLF, 1988; BUSSAB *et al.*, 1990). Esses dados foram introduzidos na forma de variáveis binárias, ou seja, o número 1 (um) significando presença de banda, e o número 0 (zero), ausência. Desta forma, foi construída uma matriz de similaridade, utilizando-se o coeficiente de JACCARD (1908), calculado de acordo com a fórmula:  $J = A : (P - D)$ , sendo A, o número de concordâncias positivas (variáveis presentes), P o número total de variáveis e D, número de concordância negativa (variáveis ausentes). A partir da construção da matriz de similaridade foi gerado um dendrograma pelo método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetical Average).

### **3.5. TÉCNICA DE MANIPULAÇÃO**

#### **3.5.1. Manutenção da cultura**

As amostras foram repicadas em meio BDA contido em tubo de ensaio, onde as culturas permaneceram à temperatura ambiente, durante 15 dias e em seguida, mantidas sob refrigeração à 4°C.

### **3.5.2. Cultura monospórica**

Os conídios das amostras de *C. gloeosporioides* foram transferidos para tubo com tampa de rosca, contendo 1mL de solução “Tween” 80 em seguida, a suspensão foi agitada em vórtex para desagregação dos conídios, os quais foram contados em câmara de Neubauer e efetuadas diluições apropriadas em solução salina. Uma gota desta suspensão foi colocada em meio BDA contido em placa de Petri. A germinação dos conídios foi observada a partir das 12 horas até o 10º dia de crescimento; em seguida as colônias foram transferidas para BDA contido em tubos de ensaio.

### **3.5.3. Análise citomorfológica das colônias de *Colletotrichum gloeosporioides***

Discos de micélio-ágar com 4mm de diâmetro foram retirados de colônias de *C. gloeosporioides* com 08 dias de crescimento em BDA e transferidos para o centro da placa de Petri contendo meio BDA. As placas foram deixadas em temperatura ambiente e o crescimento das 20 colônias de *C. gloeosporioides* foi acompanhado até o 15º dia, através de observações macroscópicas, quanto a forma, textura e coloração das colônias.

### **3.5.4. Cultura sob lamínula**

Inóculo do fungo foi colocado na superfície do meio BDA contidos em placas de Petri em pontos equidistantes. As lamínulas previamente flambadas foram colocadas sobre cada inóculo. Às 24, 48, 72, 96 e 120 horas de crescimento, as lamínulas foram retiradas, coradas com azul de Amann e observadas ao microscópio.



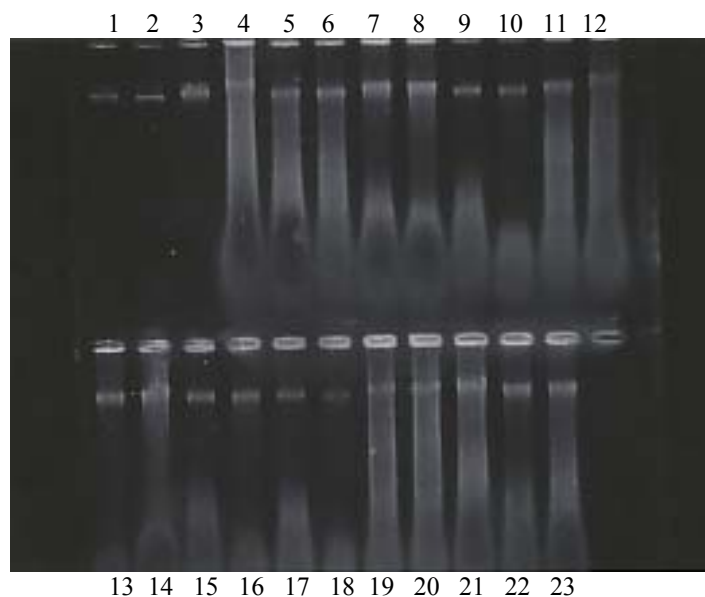
### **3.5.5. Coloração de HCl-Giemsa (LUNA-ALVES & AZEVEDO, 1983)**

Uma lâmina albuminada foi pressionada sobre a cultura fúngica e em seguida foi submersa em 6mL de etanol acrescido de 1mL de ácido láctico e 1 mL de ácido acético glacial, por 40 minutos para a fixação. Para a hidratação, a lâmina passou por uma série etílica decrescente (90, 70 e 50%), mantendo-se por 5 minutos em cada placa. Posteriormente foi ligeiramente lavado em água destilada. Para a hidrólise, a lâmina hidratada foi submersa em HCl 1N contido em um Becker, por 8 minutos, à temperatura ambiente, logo após, foi colocada em HCl 1N, aquecido (61°–63°C) em banho maria por 5 minutos. Após a hidrólise, a lâmina foi lavada com água destilada autoclavada, passando por três trocas de 10 minutos. A tamponagem foi realizada em tampão fosfato, durante 60 minutos. Em seguida a lâmina foi transferida para 10mL de tampão fosfato e 1mL de corante HCl- Giemsa, onde permaneceu por 20 minutos; a lâmina foi retirada, lavada com tampão fosfato e coberta com uma lamínula. A análise foi realizada em microscópio.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE *Colletotrichum gloeosporioides*

O DNA extraído de cada linhagem foi quantificado e avaliado quanto a sua integridade, gerando fragmentos de alto peso molecular, que possibilitaram a obtenção de quantidades razoáveis de DNA variando de 8,0 a 250 ng/μL de DNA genômico (Figura 1). Tendo como referencial o marcador de peso molecular do DNA do fago λ, nas concentrações de 10, 15 e 20 ng/μL.



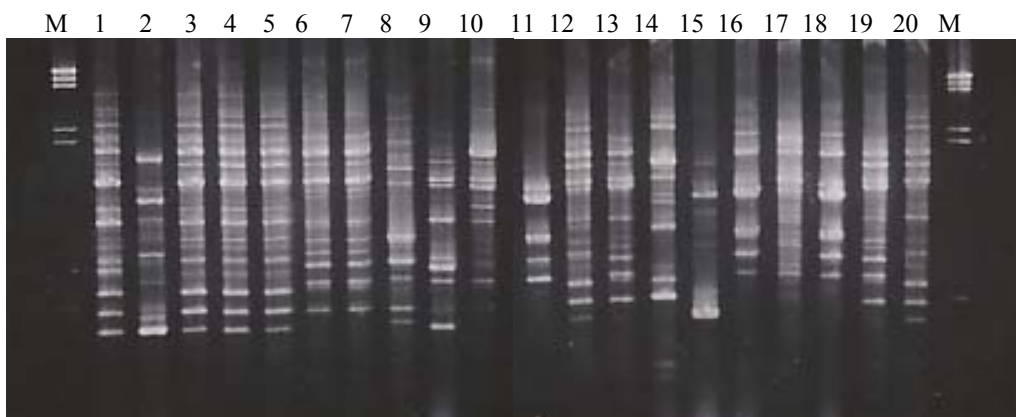
**Figura 1:** Quantificação do DNA genômico das linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides*. Nos poços 1, 2 e 3, encontram-se os marcadores do DNA do fago λ nas concentrações de 10, 15 e 20 ng/μL, respectivamente. Nos poços 4 e 5 encontra-se o DNA de *Glomerella cingulata* 4643 e 4644. Nos poços de 6 a 23 o DNA das linhagens 2334, 2335, 2336, 4596, 4597, 3882, 2060, 3102, 4627, 2980, 2681, 2684, 2543, 2018, 3623, 2494, 2460 e 3147 respectivamente.

## 4.2. Análise do RAPD

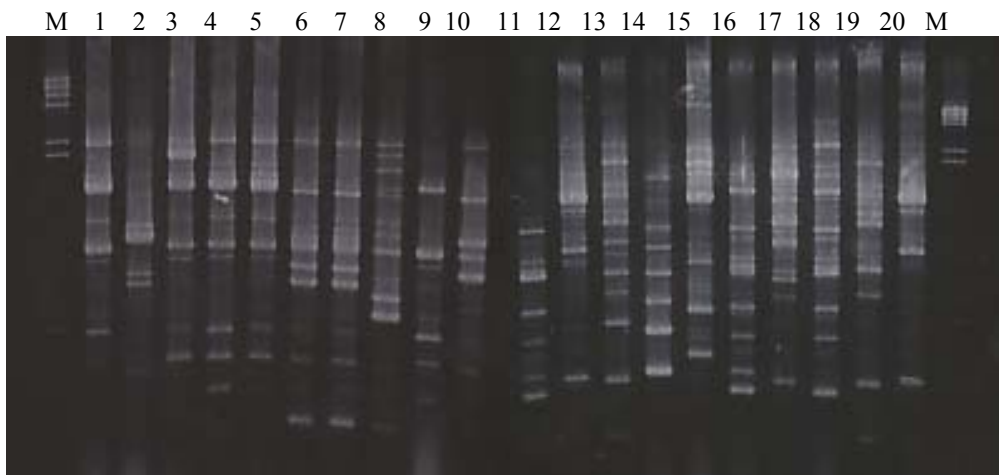
Para análise do polimorfismo de DNA amplificado ao acaso, foram testados 36 *primers* arbitrários da Operon Technologies, mais nem todos mostraram produtos de amplificação. Portanto, foram selecionados os que exibiram um maior número de fragmentos de DNA com um padrão de nitidez e com boa reprodutibilidade.

Os produtos de amplificação de RAPD do DNA das linhagens de *C. gloeosporioides* com cinco *primers* selecionados produziram um total de 814 fragmentos de DNA, sendo que 140 fragmentos gerados pelo *primer* OPA-02 (Figura 2), 144 pelo OPA-09 (Figura 3), 195 pelo OPW-06 (Figura 4), 105 pelo OPW-17 (Figura 5) e 230 fragmentos monomórficos pelo *primer* OPX-04 (Figura 6). Esses dados permitiram a construção de uma matriz de similaridade, utilizando o coeficiente de Jaccard, que gerou um dendrograma (Figura 7) pelo método de agrupamento UPGMA, suficiente para discriminar todas as linhagens. Nove grupos diversificados foram evidenciados com aproximadamente 41% de similaridade. No primeiro grupo estão as linhagens: 4644 e 2334 com 86% de similaridade entre elas e as linhagens 2335 e 2336 são totalmente idênticas com 92% de similaridade com o grupo. O segundo grupo é representado por duas linhagens: 4596 e 4597 com 96% de similaridade entre elas. Já o terceiro grupo é composto unicamente pela linhagem 3882 com 65% de similaridade com o primeiro e segundo grupo. O quarto grupo é representado por duas linhagens: 2018 e 2494 com aproximadamente 88% de similaridade entre si. O quinto grupo é composto pela linhagem 4627 com cerca de 50% de similaridade com o terceiro grupo. O sexto grupo compreende as duas linhagens: 2060 e 3102 com 50% de similaridade com o quinto grupo. O sétimo grupo é constituído por quatro linhagens: 2980, 3147, 2681 e 2460 com 45% de similaridade em relação aos grupos anteriores. O oitavo grupo é formado por uma única linhagem: 2684 com similaridade em torno de 49% com o sexto e sétimo grupo. O nono e último grupo compreende três linhagens: 4643, 2543 e 3923 com 41% de similaridade com os demais grupos. As linhagens 2980 e 3147 isoladas de solo marinho formaram um único grupo com 73% de similaridade entre elas.

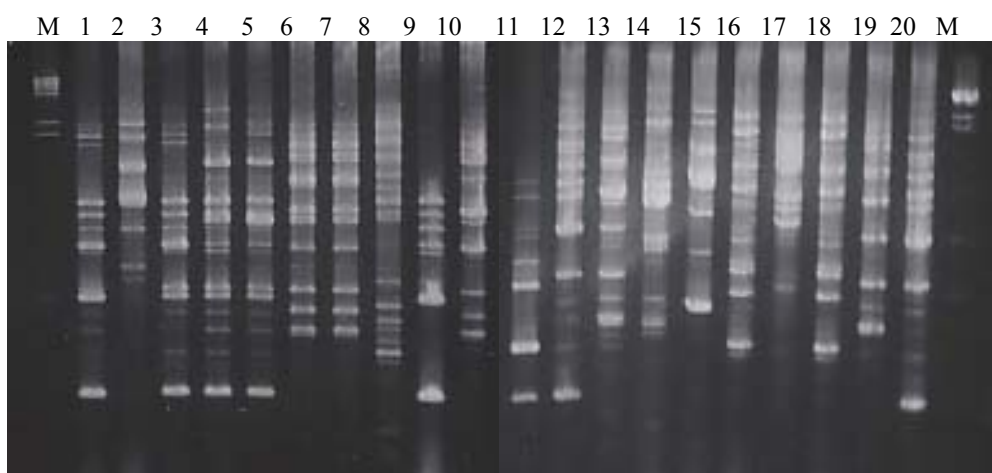
Através da análise de agrupamento foi possível observar que os substratos onde as linhagens foram coletadas não determinaram formação de grupos. A variação molecular



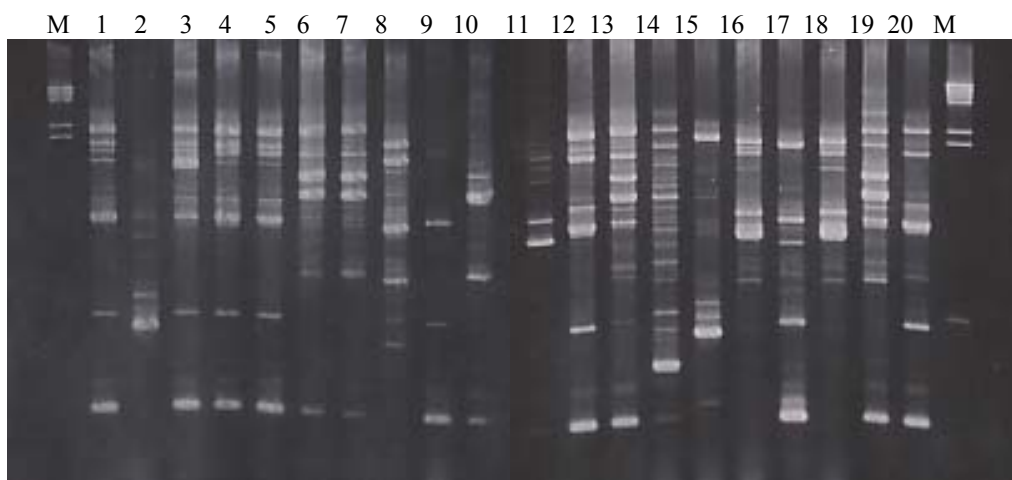
**Figura 2:** Perfis de RAPD das linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos com o *primer* OPA-02. Nos poços M, marcador de peso molecular do DNA do fago  $\lambda$  clivado com *Hind* III; nos poços 1 e 2 o DNA de *Glomerella cingulata* 4643 e 4644 e nos poços de 3 a 20 encontram-se o DNA das linhagens 2334, 2335, 2336, 4596, 4597, 3882, 2060, 3102, 4627, 2980, 2681, 2684, 2543, 2018, 3923, 2494, 2460 e 3147, respectivamente.



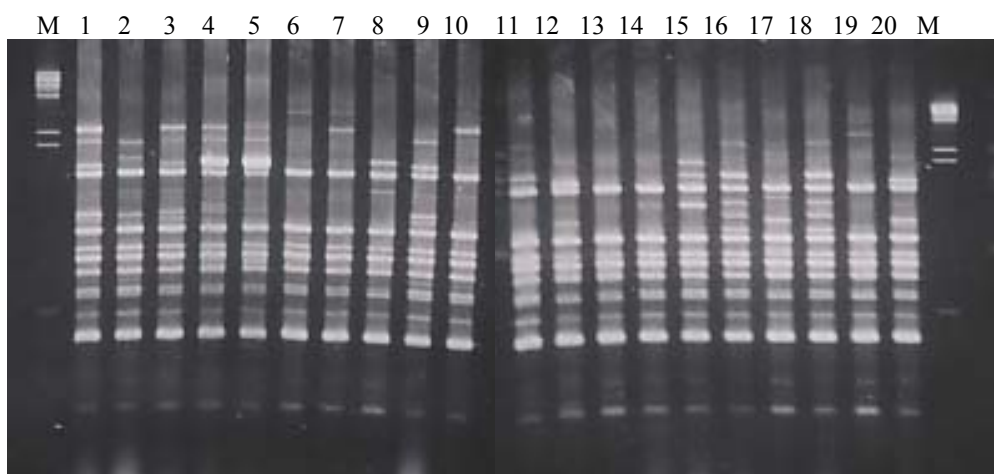
**Figura 3:** Perfis de RAPD das linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos com o *primer* OPA-09. Nos poços M, marcador de peso molecular do DNA do fago  $\lambda$  clivado com *Hind*III; nos poços 1 e 2 o DNA de *Glomerella cingulata* 4643 e 4644 e nos poços de 3 a 20 encontram-se o DNA das linhagens 2334, 2335, 2336, 4596, 4597, 3882, 2060, 3102, 4627, 2980, 2681, 2684, 2543, 2018, 3923, 2494, 2460 e 3147, respectivamente.



**Figura 4:** Perfis de RAPD das linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtido com o *primer* OPW-06. Nos poços M, marcador de peso molecular do DNA do fago  $\lambda$  clivado com *Hind* III; nos poços 1 e 2 o DNA de *Glomerella cingulata* 4643 e 4644 e nos poços de 3 a 20 encontram-se o DNA das linhagens 2334, 2335, 2336, 4596, 4597, 3882, 2060, 3102, 4627, 2980, 2681, 2684, 2543, 2018, 3923, 2494, 2460 e 3147, respectivamente.



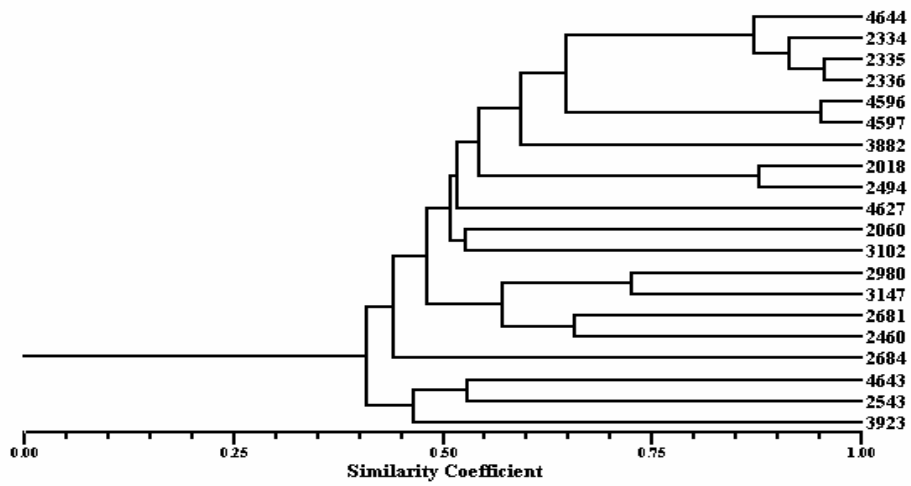
**Figura 5:** Perfis de RAPD das linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos com o *primer* OPW-17. Nos poços M, marcador de peso molecular do DNA do fago  $\lambda$  clivado com *Hind* III; nos poços 1 e 2 o DNA de *Glomerella cingulata* 4643 e 4644 e nos poços de 3 a 20 encontram-se o DNA das linhagens 2334, 2335, 2336, 4596, 4597, 3882, 2060, 3102, 4627, 2980, 2681, 2684, 2543, 2018, 3923, 2494, 2460 e 3147, respectivamente.



**Figura 6:** Perfís de RAPD das linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos com o *primer* OPX-04. Nos poços M, marcador de peso molecular do DNA do fago  $\lambda$  clivado com *Hind* III; nos poços 1 e 2 o DNA de *Glomerella cingulata* 4643 e 4644 e nos poços de 3 a 20 encontram-se o DNA das linhagens 2334, 2335, 2336, 4596, 4597, 3882, 2060, 3102, 4627, 2980, 2681, 2684, 2543, 2018, 3923, 2494, 2460 e 3147, respectivamente.



$r = 0.86450$



**Figura 07:** Dendrograma das linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtido através dos perfis de RAPD com os *primers* OPA – 02, OPA – 09, OPW – 06, OPW – 17 e OPX – 04.

constatada neste trabalho em *C. gloeosporioides* também foi observada por VILARINHOS *et al.* (1995) através de marcadores RAPD em linhagens de *C. gloeosporioides* e *C. lindemuntianum*, não havendo relação aparente entre os genótipos e os hospedeiros. MILLS *et al.* (1992) também detectaram alta diversidade genética em espécies de *Colletotrichum* e constataram que não houve formação de grupos relacionados ao hospedeiro de origem e à região geográfica.

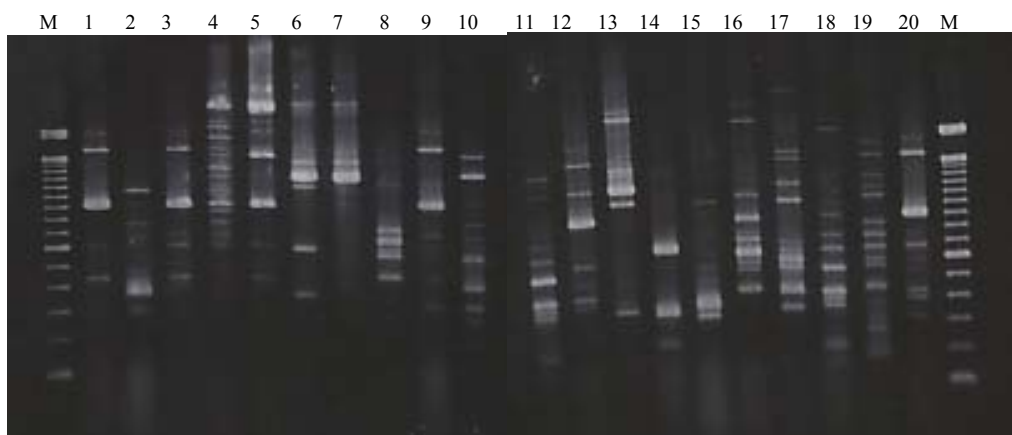
A técnica de RAPD também tem sido utilizada para diferenciar e avaliar a relação genética entre espécies. SILVA – MANN *et al.* (2002) conseguiram diferenciar duas variedades fitopatogênicas, *C. gossypii* e *C. gossypii var. cephalosporioides* isolados de sementes de algodoeiro, e concluíram alta diversidade genética em torno de 51,7% de similaridade. SAHA *et al.* (2002) também discriminaram *C. gloeosporioides* e *C. acuntatum* isolados de *Hevea* através da técnica de RAPD e ITS. Confirmando a eficácia das técnicas para distinguir as espécies. Já QUELLET & SEIFERT (1993) testaram o potencial de RAPD para diferenciar *formae speciales* de *F. graminearum* através de um pequeno número de *primers* aleatórios, que foi suficiente para distinguir todos as linhagens testadas.

### **4.3. Análise das regiões de SSR**

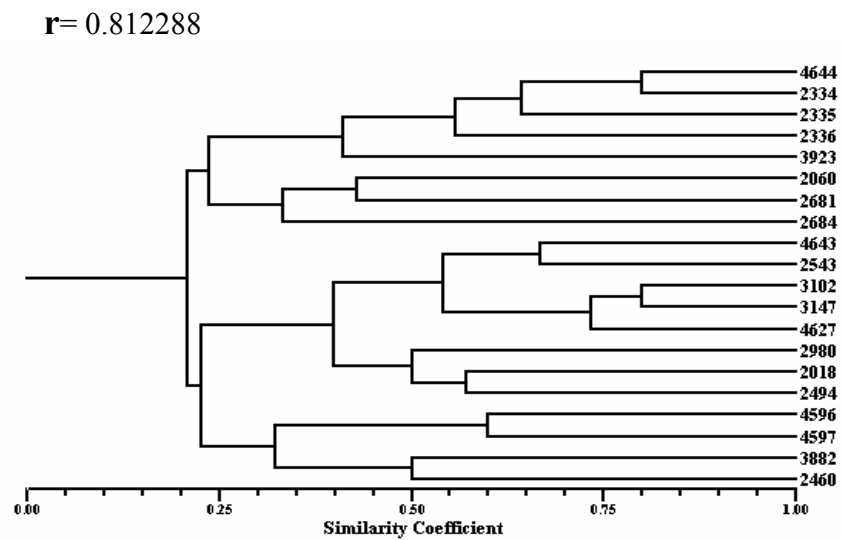
#### **4.3.1. Trinucleotídeo (GTG)<sub>5</sub>**

Os perfis de amplificação das regiões de SSR com o trinucleotídeo (GTG)<sub>5</sub> das linhagens de *C. gloeosporioides* estão ilustrados na Figura 8.

Através da análise do dendrograma (Figura 9) foram observados seis grupos altamente diversificados, em um ponto de ramificação com aproximadamente 21% de similaridade genética intraespecífica. O primeiro grupo é constituído por cinco linhagens: 4644, 2334, 2335, 2336 e 3923 com cerca de 24% de similaridade com o segundo grupo, que agrupou três linhagens: 2060, 2681 e 2684. O terceiro grupo é formado por cinco linhagens: 4643, 2543, 3102, 3147 e 4627 com aproximadamente 40% de similaridade com o quarto grupo, correspondente as linhagens 2980, 2018 e 2494. O quinto grupo é formado pelas linhagens 4596 e 4597 com similaridade em torno de 60% entre si e o sexto e último grupo representado também por duas linhagens: 3882 e 2460 com similaridade de aproximadamente 50% entre elas.



**Figura 8:** Perfis das regiões de SSR das linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos com o trinucleotídeo (GTG)<sub>5</sub>. Nos poços M, marcador de peso molecular de 100 pb; nos poços 1 e 2 o DNA de *Glomerella cingulata* 4643 e 4644 e nos poços de 3 a 20 encontram-se o DNA das linhagens 2334, 2335, 336, 4596, 4597, 3882, 2060, 3102, 4627, 2980, 2681, 2684, 2543, 2018, 3923, 2494, 2460 e 3147, respectivamente.



**Figura 09:** Dendrograma das linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtido através dos perfis das regiões de SSR obtidos com o trinucleotídeo complementar (GTG)<sub>5</sub>.

#### 4.3.2. Tetranucleotídeo (GACA)<sub>4</sub>

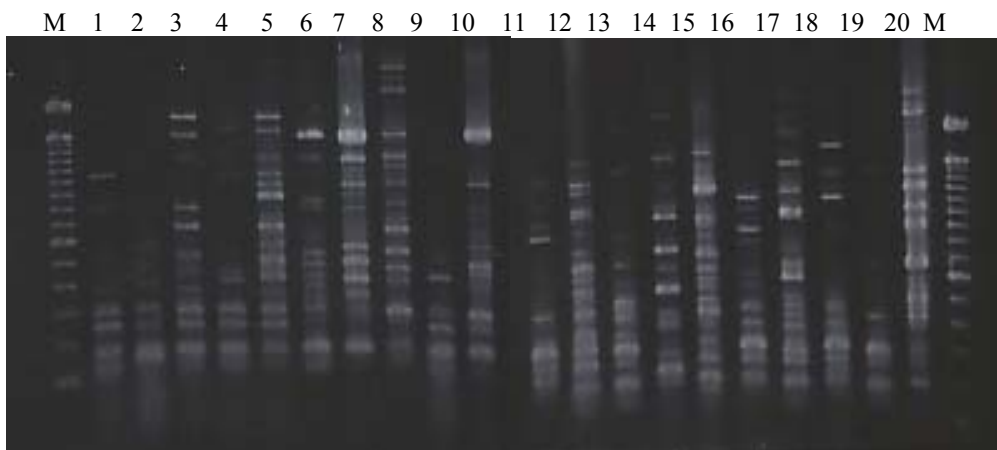
Os perfis de amplificação das regiões de SSR com o tetranucleotídeo (GACA)<sub>4</sub> das linhagens de *C. gloeosporioides*, estão ilustrados na Figura 10.

Através da análise de agrupamento foram observados seis grupos distintos com cerca de 30% de similaridade entre eles (Figura 11). O primeiro grupo é formado por quatro linhagens 4644, 4643 com aproximadamente 75% de similaridade entre si e o 2335 e 2460 são idênticas com 68% de similaridade com as demais do grupo. O segundo grupo é constituído pela linhagem 2060 com 48% de similaridade com o primeiro grupo. O terceiro grupo agrupou cinco linhagens: 2334, 4596, 2494, 2681 e 2018 com cerca de 50% de similaridade com os grupos quatro e cinco. O quarto grupo considerado o maior, compreende sete linhagens com diferentes níveis de similaridade. A 2336, 2684, 2980, 3923, 4597, 3882 e 2543, variando de 56 a 90% de similaridade. Já o quinto grupo compreende uma única linhagem, 3102 com 65% de similaridade com o sexto grupo, que esta representado por duas linhagens 4627 e 3147 com cerca de 79% de similaridade entre si. As linhagens 4596 e 2494 isoladas de *Mangifera indica* foram agrupadas em um mesmo grupo com 68% de similaridade entre si.

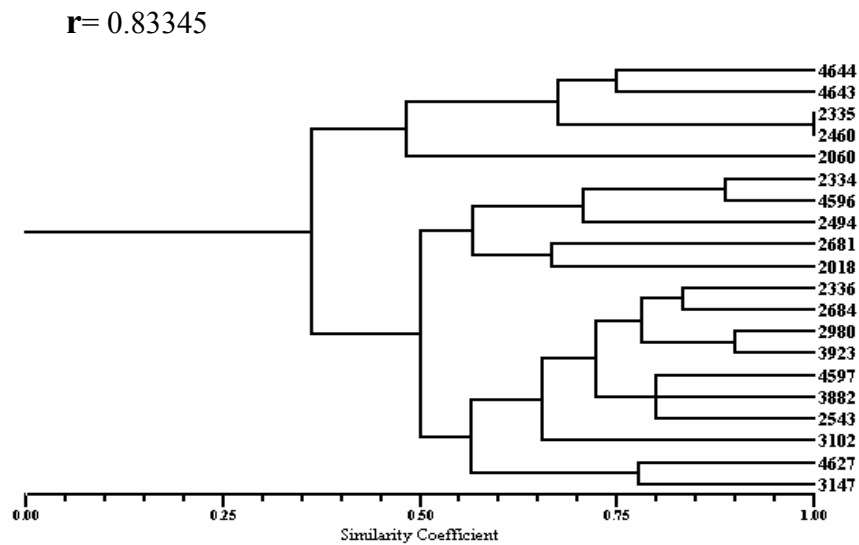
O auto grau de polimorfismo intraespecífico foi observado nas duas regiões de microssatélites, sendo que a região complementar ao trinucleotídeo (GTG)<sub>5</sub> apresentou maior diversidade gerando seis grupos distintos, sem apresentar correlação entre grupos e hospedeiros.

O polimorfismo intraespecífico também foi observado nos fungos *Armillaria cepistipes* (HANTULA *et al.*, 1996), *Gremmeniella abietina* (BALALI *et al.*, 1991), *Heterobasidion annosum* (BOWMAN *et al.*, 1992), *Phytophthora cactorum* (COUTO *et al.*, 1996), *Phlebiopsis gigantea* (CAETANO-ANOLLÉS *et al.*, 1991), *Stereum sanguinolentum* (DESCENZO & HARRINGTON 1994), *B. brongniartii* (ENKERLI *et al.*, 2001) e *Sacharomyces cerevisiae* (BARNES *et al.*, 2001) utilizando as repetições (GAC)<sub>5</sub>, (GTG)<sub>5</sub>, (ACA)<sub>5</sub> e (ATC)<sub>5</sub>.

Não há relato na literatura corrente com a repetição (GTG)<sub>5</sub> para analisar a diversidade genética inter e intra-específica em *C. gloeosporioides*. A diversidade genética intraespecífica entre *Colletotrichum spp* foi avaliada por FREEMAN (1993) utilizando os nucleotídeos (GAG)<sub>5</sub>, (GACA)<sub>4</sub>, (GACAC)<sub>3</sub> e (TGTC)<sub>4</sub> e constataram que não houve correlação entre hospedeiros e origem geográfica. Esses dados concordam com os resultados obtidos no presente trabalho, onde se detectou alta diversidade genética, utilizando a repetição (GACA)<sub>4</sub>, não havendo correlação entre hospedeiro e agrupamentos.



**Figura 10:** Perfis das regiões de SSR das linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos com o tetranucleotídeo (GACA)<sub>4</sub>. Nos poços M, marcador de peso molecular de 100 pb; nos poços 1 e 2 o DNA de *Glomerella cingulata* 4643 e 4644 e nos poços de 3 a 20 encontram-se o DNA das linhagens 2334, 2335, 2336, 4596, 4597, 3882, 2060, 3102, 4627, 980, 2681, 2684, 2543, 2018, 3923, 2494, 2460 e 3147, respectivamente.



**Figura 11:** Dendrograma das linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtido através dos perfis das regiões de SSR com o tetranucleotídeo complementar (GACA)<sub>4</sub>.

#### 4.4. Análise de região Intron

Os perfis de amplificação de região intron com o *primer* EI-1 das linhagens de *C. gloeosporioides* estão ilustrados na Figura 12.

O dendrograma (Figura 13) evidenciou a formação de oito grupos distintos em um ponto de ramificação em torno de 16,5% mostrando uma maior diversidade genética em relação aos outros marcadores moleculares. O primeiro grupo compreende cinco linhagens,

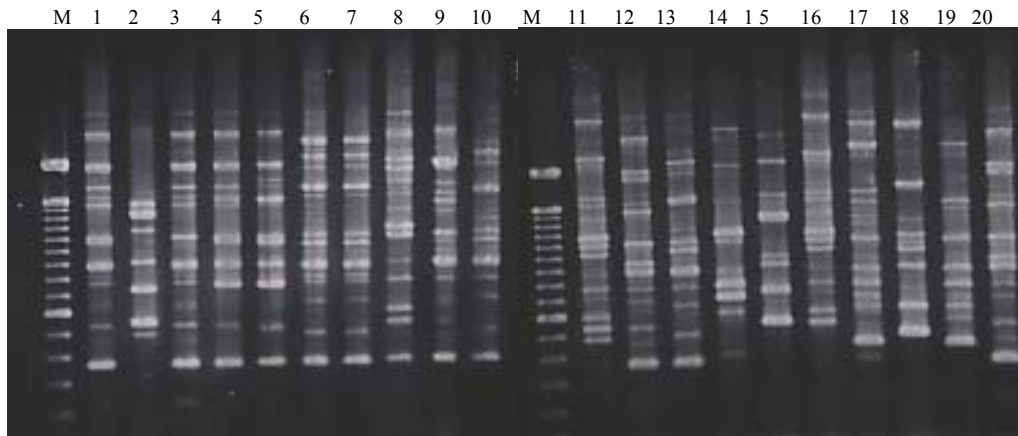


das quais, quatro são idênticas, a 4644, 2334, 2335 e 2336 com 87% de similaridade com a linhagem 2980. O segundo grupo é formado por uma única linhagem, a 3147 com 75 % de similaridade com o primeiro grupo. O terceiro grupo compreende duas linhagens: 2060 e 3923 com 70% de similaridade com o primeiro e segundo grupo. O quarto grupo agrupou quatro linhagens: 4596, 4597, 2681 e 3102 com aproximadamente 70% de similaridade. O quinto grupo é constituído pelas linhagens 2543 e 2460 com 50% de similaridade com os grupos anteriores. O sexto grupo está representado pelas linhagens 3882, 4627 e 2018 com 38% de similaridade com o quinto grupo. O sétimo grupo compreende as linhagens 4643 e 2494 com 33% de similaridade entre si. O oitavo e último grupo é formado por uma única linhagem, a 2684 com aproximadamente 16,5% de similaridade com os demais grupos.

A linhagem 2684 foi a mais distinta através da análise de distância genética pelo método de agrupamento, com aproximadamente 16,5% de similaridade em relação aos outros grupos, as linhagens 4627 e 2018 isoladas de *Allium* sp foram agrupadas em um mesmo grupo com 63% de similaridade entre elas.

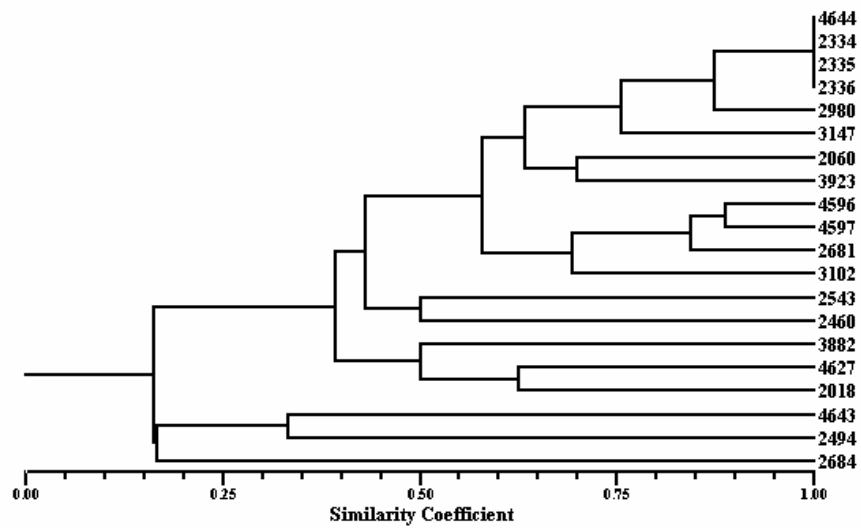
Pela análise de agrupamento foi possível observar que a região intron foi capaz de revelar uma maior diversidade genética em relação aos outros marcadores moleculares. Vale salientar que este é o primeiro relato com uso do *primer* EI-I para análise da diversidade genética intraespecífica de *C. gloeosporioides*.

O polimorfismo genético encontrado nas regiões intron de *M. anisopliae* var. *anisopliae* utilizando *primers* homólogos do gene 28S de rDNA de *verticillium dahliae* revelaram a presença de grupos distintos de *introns* em três diferentes sítios de inserção (MAVIDOU *et al.*, 2000).



**Figura 12:** Perfis das regiões de *intron splice site primer* das linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos com o *primer* EI-1. Nos poços M, marcador de peso molecular de 100 pb; nos poços 1 e 2 o DNA de *Glomerella cingulata* 4643 e 4644 e nos poços de 3 a 20 encontram-se o DNA das linhagens 2334, 2335, 2336, 4596, 4597, 3882, 2060, 3102, 4627, 2980, 2681, 2684, 2543, 2018, 3923, 2494, 2460 e 3147, respectivamente.

$r = 0.92356$



**Figura 13:** Dendrograma das linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtido através dos perfis da região *intron splice site primer* com o *primer* EI-I.

#### 4.5. Região ITS do DNA ribossomal

O produto de amplificação do locus ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA utilizando os *primers* ITS1 e ITS4, apresentou um fragmento de aproximadamente 580pb para todas as linhagens investigadas (Figura 14).

MILLS *et al.* (1992) verificando os produtos de amplificação da região ITS1 e ITS2 com os *primers* ITS1 e ITS4, detectaram fragmentos de 450pb em 25 linhagens de *C.*

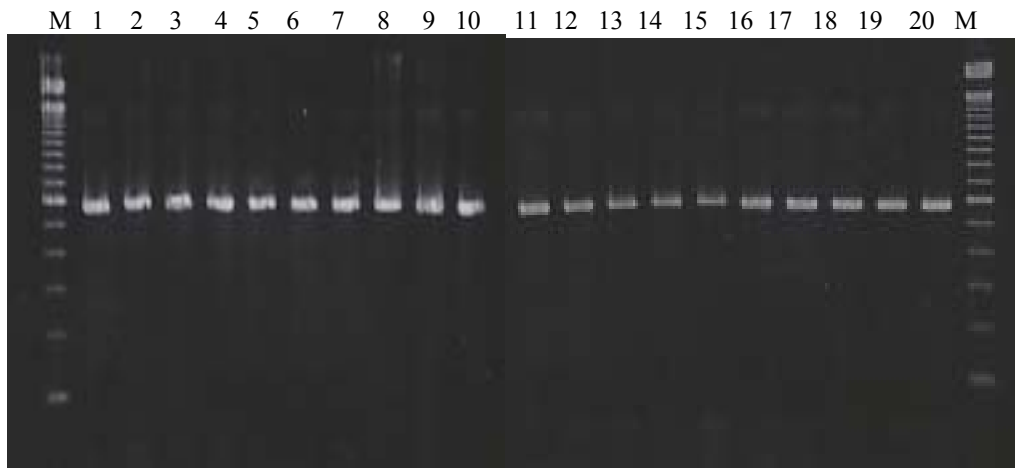
*gloeosporioides*, enquanto que MENAUT *et al.* (2002) detectaram um fragmento de 550pb e VINNERE *et al.* (2001) observaram fragmentos de 550pb em *C. gloeosporioides*.

O polimorfismo genético observado nesta região é de apenas 63%. Este resultado permite que outras regiões variáveis do genoma possam ser selecionadas para este tipo de investigação.

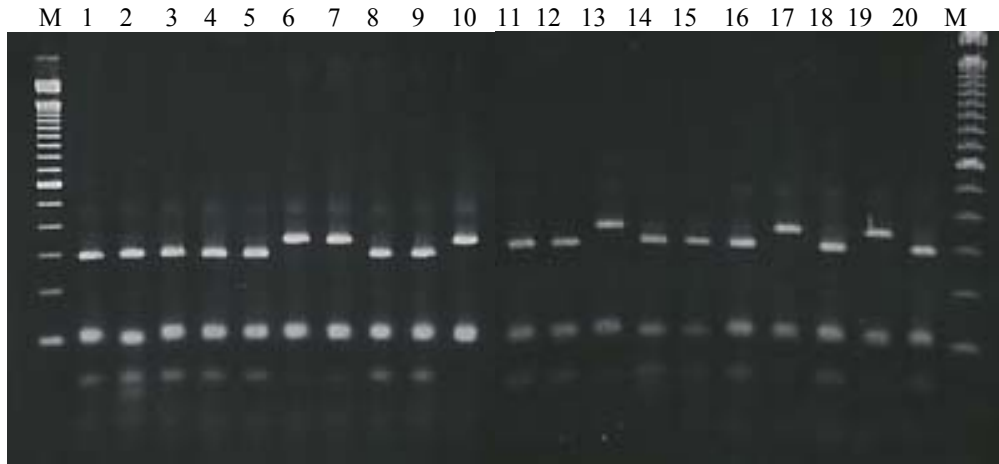
Os produtos de PCR digeridos separadamente com enzima de restrição *Hae* III, *Msp* I e *Dra* I, apresentaram sítios de restrição, demonstrando polimorfismo tanto no número de fragmentos quanto no peso molecular.

A restrição com a enzima *Msp*I, gerou um fragmento monomórfico de aproximadamente 120 pb para todas as linhagens, de 60 e 300 pb para a maioria e de 360 pb para as linhagens 4596, 4597, 3102, 2681, 3923 e 2460 (Figura 15). A enzima *Hae*III gerou três fragmentos monomórficos de aproximadamente 120, 180 e 280pb para a maioria das linhagens e de 400pb para as linhagens 2543, 2684 e 4643 (Figura 16). A digestão com a enzima *Dra*I, gerou um único fragmento de aproximadamente 580 pb para todas as linhagens, exceto para a 2684 e 4643, que apresentou um fragmento de 160 e 420 pb (Figura 17).

Os resultados obtidos da análise conjunta dos produtos de amplificação e restrição enzimática da região ITS do rDNA permitiu a construção da matriz de similaridade utilizando o coeficiente de Jaccard e de um dendrograma, pelo método de agrupamento UPGMA, que evidenciou a existência de três grupos distintos (Figura 18). O primeiro grupo compreende onze linhagens idênticas: 4644, 2334, 2335, 3147, 2336, 2018, 3882, 2980, 4627, 2060 e 2494, com cerca de 85% de similaridade entre si. O segundo grupo agrupou seis linhagens totalmente idênticas: 4596, 4597, 3102, 3923, 2681 e 2460 com



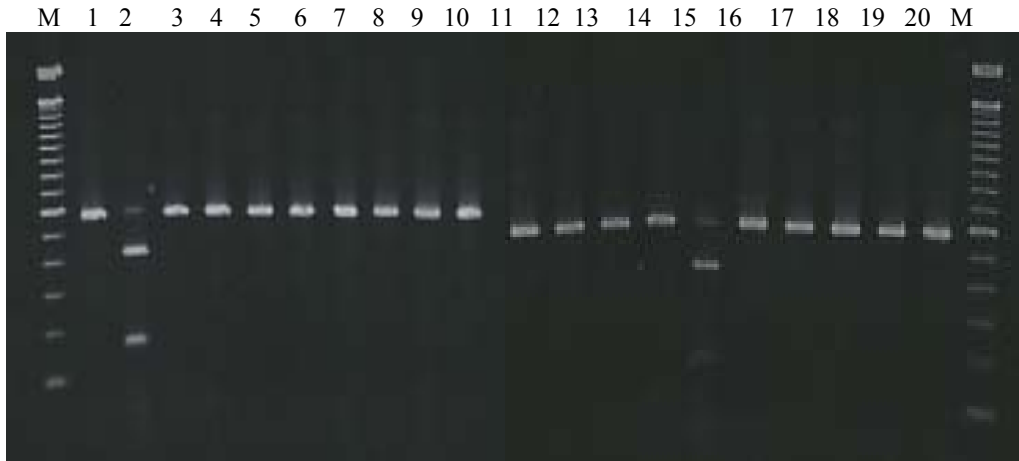
**Figura 14:** Perfis de amplificação da região ITS do rDNA dos isolados de *Colletotrichum Gloeosporioides* obtidos com os primers ITS1 e ITS4. Nos poços M, marcador de peso molecular de 100 pb; nos poços 1 e 2 o DNA de *Glomerella cingulata* 4643 e 4643 e nos poços de 3 a 20 encontram-se o DNA dos isolados 2334, 2335, 2336, 4596, 4597, 3882, 2060, 3102, 4627, 2980, 2681, 2684, 2543, 2018, 3923, 2494, 2460 e 3147, respectivamente.



**Figura 15:** Perfis de restrição dos fragmentos da DNA da região ITS do rDNA dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos com a enzima *MspI*. Nos poços M, marcador de peso molecular de 100 pb; nos poços 1 e 2 o DNA de *Glomerella cingulata* 4643 e 4643 e nos poços de 3 a 20 encontram-se o DNA dos isolados 2334, 2335, 2336, 4596, 4597, 3882, 2060, 3102, 4627, 2980, 2681, 2684, 2543, 2018, 3923, 2494, 2460 e 3147, respectivamente.



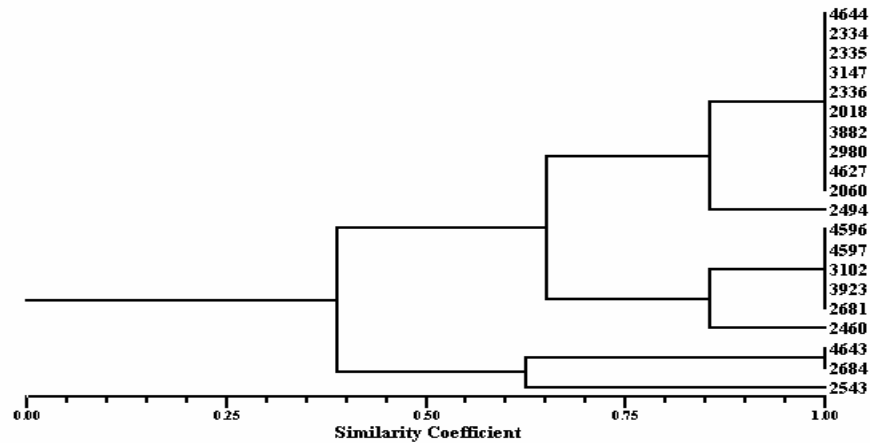
**Figura 16:** Perfis de restrição dos fragmentos de DNA da região ITS do rDNA dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos com a enzima *Hae III*. Nos poços M, marcador de peso molecular de 100 pb. Nos poços 1 e 2 o DNA de *Glomerella cingulata* 4643 e 4643 e nos poços de 3 a 20 encontra-se o DNA das linhagens 2334, 2335, 2336, 4596, 4597, 3882, 2060, 3102, 4627, 2980, 2681, 2684, 2543, 2018, 3923, 2494, 2460 e 3147, respectivamente.



**Figura 17:** Perfis de restrição dos fragmentos da DNA da região ITS do rDNA dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos com a enzima *Dra I*. Nos poços M, marcador de 100 pb. Nos poços 1 e 2 o DNA de *Glomerella cingulata* 4643 e 4643 e nos poços de 3 a 20 encontram-se os DNAs dos isolados 2334, 2335, 2336, 4596, 4597, 3882, 2060, 3102, 4627, 2980, 2681, 2684, 2543, 2018, 3923, 2494, 2460 e 3147, respectivamente.



$r = 0.94684$



**Figura 18:** Dendrograma das linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides* obtido através dos perfis dos fragmentos de restrição da região ITS do rDNA com as enzimas de restrição *Hae* III, *Msp* I e *Dra* I.

aproximadamente 65% de similaridade com o primeiro grupo. E o terceiro e último grupo estão três linhagens: 4643, 2684 e 2543 também idênticas com 35% de similaridade com o primeiro e segundo grupo formado. Não houve coincidência entre grupos e substratos, mostrando pequena diversidade genética intraespecífica.

Através da análise da seqüência da região 25/28S do rDNA MILLS *et al.* (1992) concluíram que a mesma apresentou-se conservada entre linhagens de *C. coffeanum* e variável entre outras espécies de *Colletotrichum*, inclusive *C. gloeosporioides*. Esses

resultados corroboram com os obtidos no presente trabalho, levando em consideração a análise da região ITS1-5. 8S-ITS 2.

VINNERE *et al.* (2002) compararam as espécies de *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. fragariae*, *C. dematium* e *G. cingulata* pela análise de restrição dos fragmentos das regiões ITS1, ITS2 e 5.8S do rDNA através da enzima *HaeIII* e *MspI*, constataram a diferença entre as espécies e grupos de espécies. Detectando também a existência de um grupo distinto de *C. gloeosporioides* evidenciando a variação genética intraespecífica. Isto contrasta com os resultados do presente trabalho, que não apresentou correlação entre grupos, hospedeiros e local onde foram isolados (Pernambuco e São Paulo).

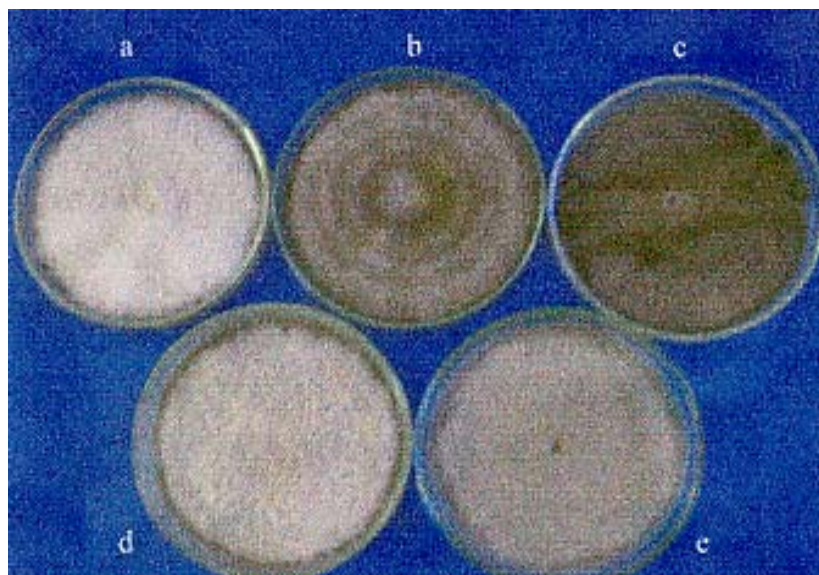
MUNAUT *et al.* (2002) observaram a variação no rDNA em *C. gloeosporioides*, *C. musae*, *C. fuscum* e *C. fragariae* em diferentes regiões e hospedeiros e constataram a presença de fragmentos polimórficos entre as linhagens nas regiões ITS1 e ITS2 e a separação das mesmas em cinco grupos. Sem apresentar correlação com o hospedeiro de origem e a região geográfica. Esses resultados concordam com os obtidos neste trabalho, os quais também não se determinou a formação de grupos de acordo com o substrato de origem e a localidade onde foram isolados.

Os grupos formados pelos cinco marcadores moleculares não permitiram fazer uma correlação entre caracteres citomorfológicos. As linhagens mais semelhantes citomorfologicamente foram mais distintas do ponto de vista molecular. Portanto, esses resultados sugerem estudos mais detalhados associados a biologia molecular e a patogenicidade em diferentes hospedeiros, afim de determinar o gene que apresenta uma maior virulência.

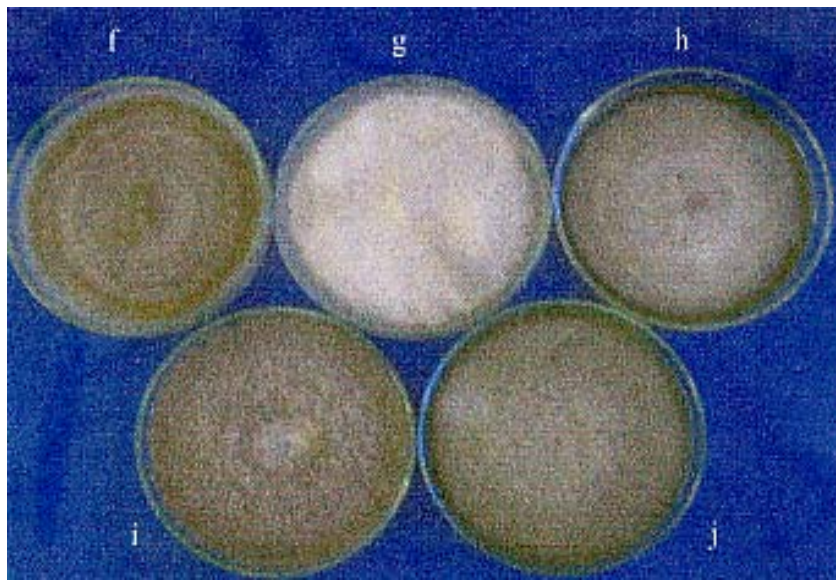
#### 4.6. Análise citomorfológica das linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides*

O crescimento micelial das linhagens de *C. gloeosporioides* a partir de cultura monopóica ocupou toda superfície do meio BDA contido em placa de Petri, em 10 dias. As Figuras de 19 a 22 ilustram os aspectos macroscópicos de *C. gloeosporioides*, exibindo variação quanto a coloração, textura e segregação de setores, da colônia. As linhagens a.2334, d.4596, e.4597, g.2060, h.3102, i.3147, j.2494, l.2681, m.2684, n.4627, o.2980, e q.3923 exibiram uma coloração esbranqueçada e acinzentada. Enquanto que as linhagens c.2335, o.2980 e p.2543 apresentaram pontuações escuras levemente salientes, formadas por setas contidas nos acérvulos. Já as linhagens b.2336, g.2060, f.3882, s.4643 e r.2460 formaram segregação de setores. Essa variação morfológica é freqüente entre as linhagens de *C. gloeosporioides* (MENEZES & HANLIN, 1996; MUNIZ, 1998), talvez seja explicada pela ocorrência do ciclo parassexual já detectado em outros Amanorfos, a exemplo de *Fusarium oxysporum* (BUXTON, 1956); *Metarhizium anisopliae* (MESSIAS & AZEVEDO, 1980), *Beauveria bassiana* (PACCOLA-MEIRELLES & AZEVEDO, 1991). Até o presente cerca de 40 espécies de fungos já têm o ciclo parassexual descrito (AZEVEDO, 1998; 2001).

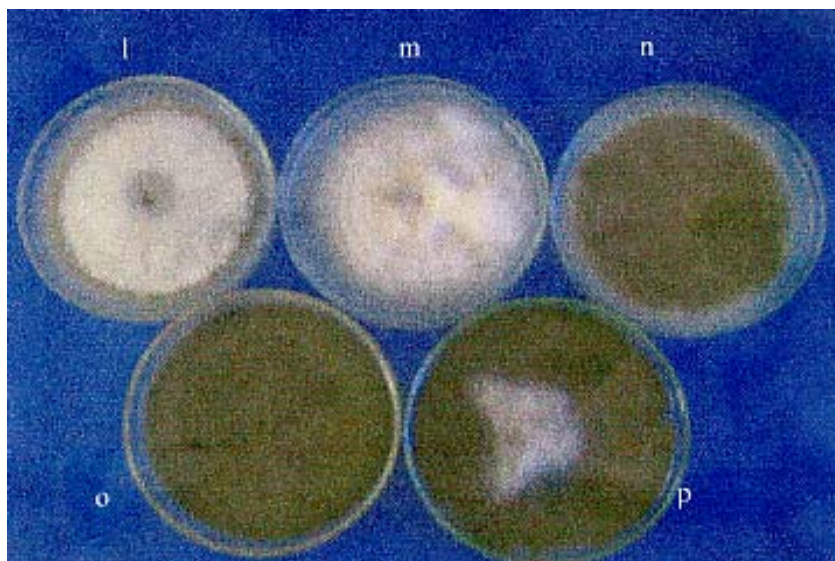
As observações microscópicas e a condição nuclear das linhagens de *C. gloeosporioides* e de seu teleomorfo *Glomerella cingulata*, foram feitas a partir das 24 horas após a germinação dos conídios. A partir das 48 horas de cultivo foi verificada diferenciação micelial, formada por hifas hialinas, uninucleadas e anastomoses (Figura 23). Com 72 horas foi constatada a formação de conidióforos simples (Figura 24) e conídios cilíndricos, hialinos 100% uninucleados, medindo  $4-7 \times 10-16 \mu\text{m}$  (Figura 25). Às 96 horas foi evidenciada, a formação de apressórios clavados, ovados ou ligeiramente obovados de coloração escura (Figura 26) e acérvulos jovens (figura 27). Os apressórios são importantes por auxiliarem na penetração do fungo no tecido vegetal. Observações feitas às 120 horas evidenciaram acérvulos em estágio avançado de desenvolvimento mostrando setas de coloração escura (Figura 28), peculiares da espécie. *G. cingulata* apresentou numerosos peritécios, subesféricos e agrupados em um estroma (Figura 29). Os ascos são subclavados e os ascosporos hialinos, curvados e uninucleados (MENEZES, 2002).



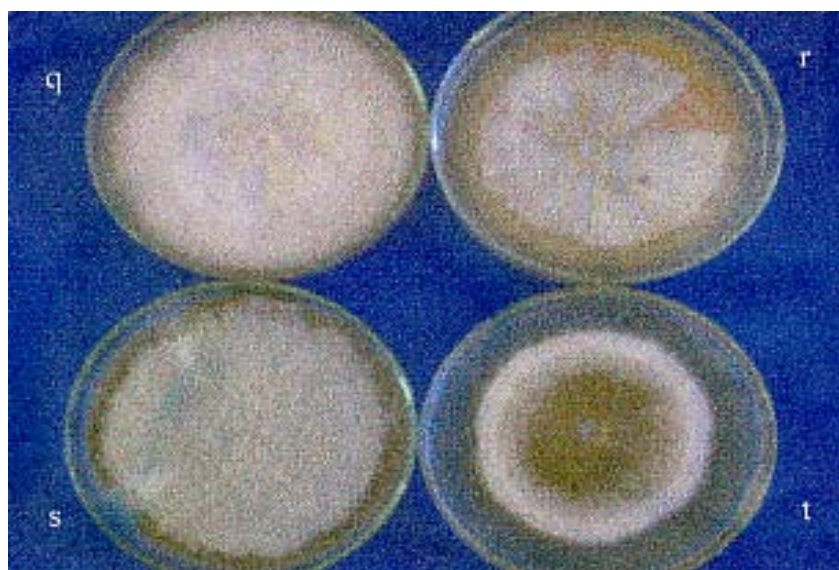
**Figura 19:** Colônia de *Colletotrichum gloeosporioides* com 10 dias de crescimento em meio BDA (Linhagens: a. 2334; b. 2336; c. 2335; d. 4696; e. 4597).



**Figura 20:** Colônia de *Colletotrichum gloeosporioides* com 10 dias de crescimento em meio BDA (Linhagens: f. 3882; g. 2060; h. 3102; i. 3147; j. 2494).



**Figura 21:** Colônia de *Colletotrichum gloeosporioides* com 10 dias de crescimento em meio BDA (Linhagens: l. 2681; m. 2684; n. 4627; o. 2980; p. 2543).

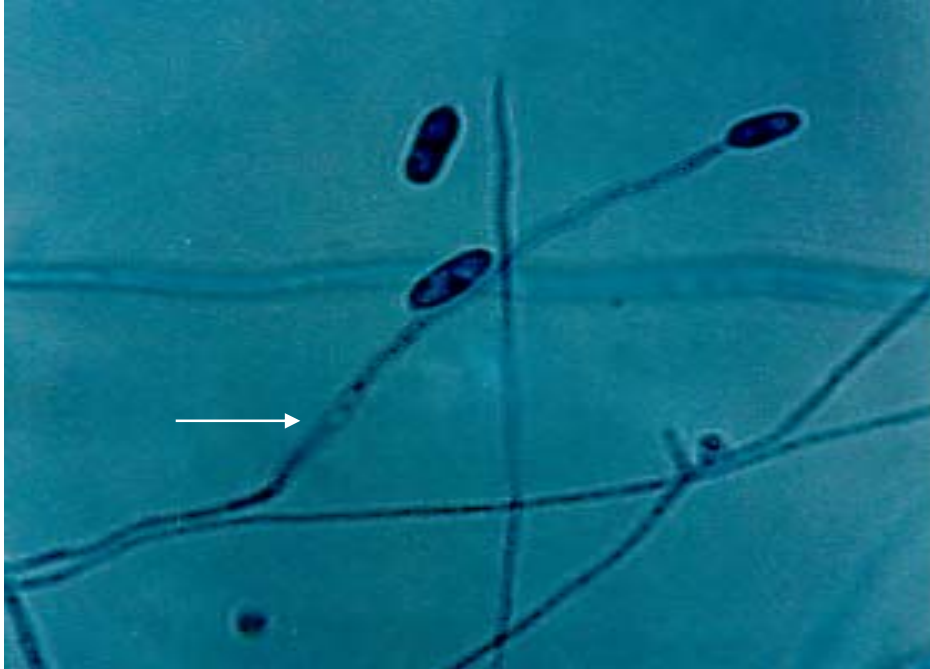


**Figura 22:** Colônia de *Colletotrichum gloeosporioides* com 10 dias de crescimento em meio BDA (Linhagens: q. 3923; r. 2460), *Glomerella cingulata* (Linhagens: s. 4643; t. 4644).

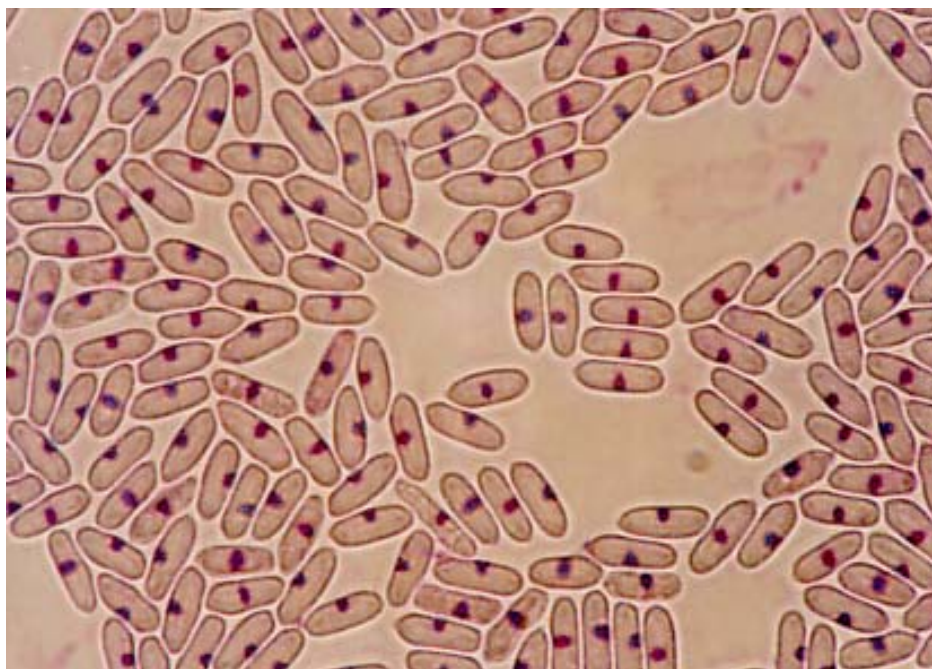




**Figura 23:** *Colletotrichum gloeosporioides*. Anastomose ( ). 48 horas.  
640x.



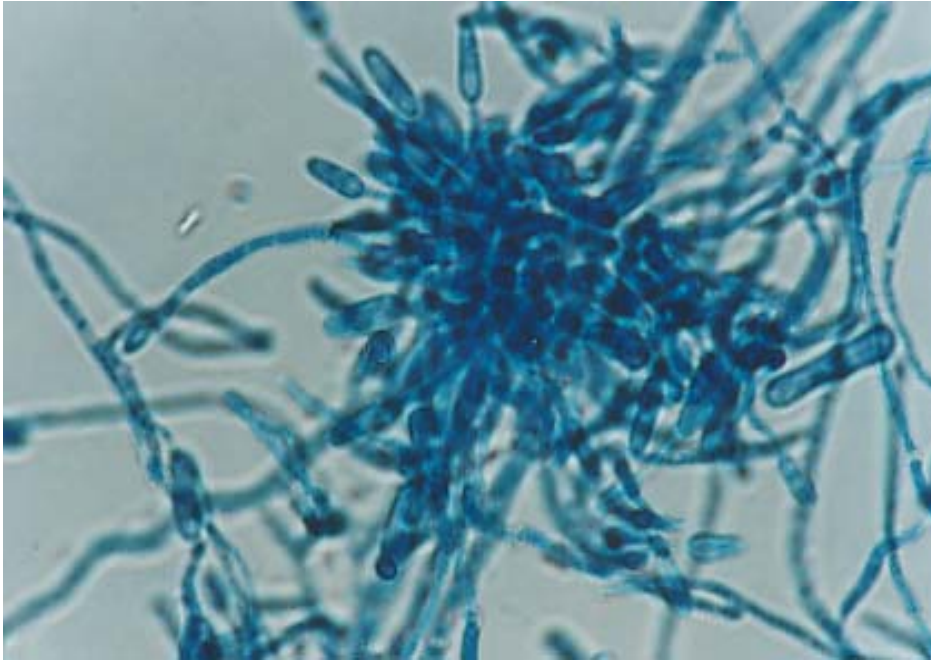
**Figura 24:** *Colletotrichum gloeosporioides*. Conidióforo simples( ) e conídios. 72 horas. 640x.



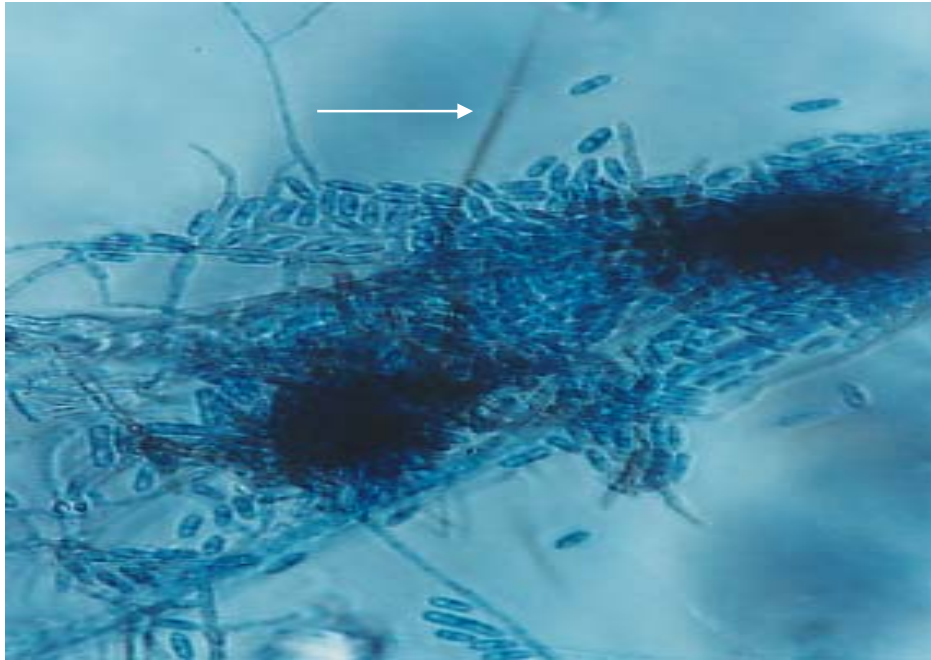
**Figura 25:** *Colletotrichum gloeosporioides*. Conídios cilíndricos, hialinos e uninucleados. Coloração HCl-Giemsa. 72 horas. 640x.



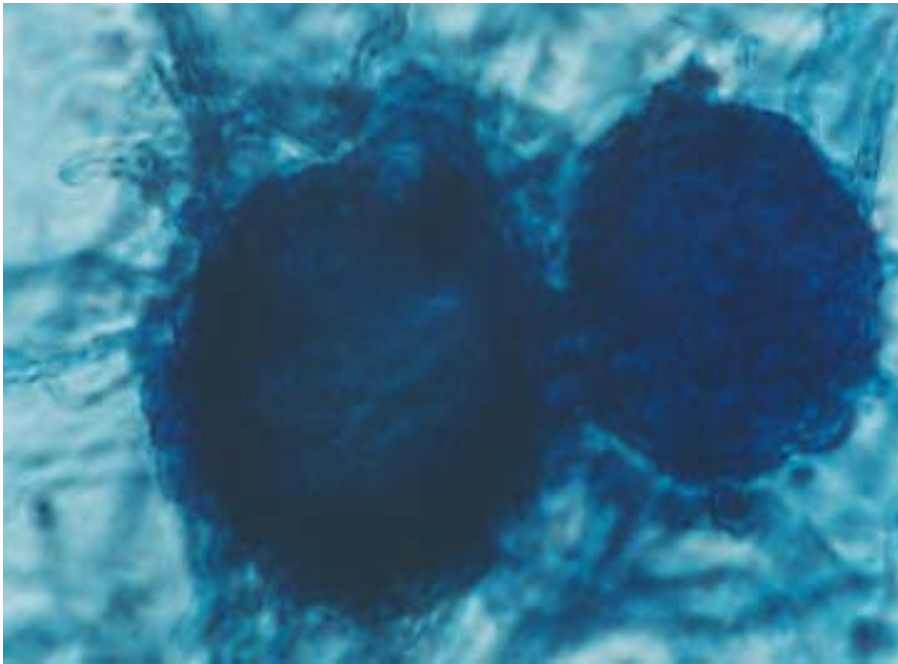
**Figura 26:** *Colletotrichum gloeosporioides*. Apressórios. 96 horas. 640x.



**Figura 27:** *Colletotrichum gloeosporioides*. Acérvulo jovem. 96 horas. 640x.



**Figura 28:** *Colletotrichum gloeosporioides*. Acérvulo em estágio avançado mostrando setas ( ). 120 horas. 640x.



**Figura 29:** *Glomerella cingulata*. Peritécios. 120 horas.640x.

## CONCLUSÕES

- ▶ Os cinco marcadores moleculares utilizados foram eficientes em demonstrar o polimorfismo genético das linhagens de *C. gloeosporioides*.
- ▶ Os marcadores moleculares, RAPD, Microsatélites, *Intron Splice Site Primer* e ITS confirmaram o alto grau de diversidade genética reconhecida em *C. gloeosporioides*.
- ▶ Os hospedeiros e a região onde foram isoladas as linhagens de *C. gloeosporioides* não determinaram formação de grupos.
- ▶ A região intron amplificada com o *primer* EI-1 foi capaz de revelar uma maior diversidade genética, quando comparada com os outros marcadores moleculares.
- ▶ A região de microsatélite complementar ao trinucleotídeo (GTG)<sub>5</sub> apresentou maior diversidade genética em relação a região complementar ao tetranucleotídeo (GACA)<sub>4</sub>.
- ▶ As linhagens de *C. gloeosporioides* exibiram variação macroscópicas quanto a coloração, textura e segregação de setores, na colônia.
- ▶ Foi observado conídios 100% uninucleados em todas as linhagens de *C. gloeosporioides*.



## REFERÊNCIAS

- AGOSTINI, J. P.; TIMMER, L. E.; MITCHEL, D. J. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. **Phytopathology**. v. 82, p. 1377-1382, 1992.
- ANDERSON, J. B. & STASOVSKI, E. Molecular phylogeny of northern hemisphere species of *Armillaria*. **Micologia**. v. 84, p. 505 – 516, 1992.
- ANDRADE, E. R. & DUCROQUET, J. P. H. J. Antracnose em goiabeira serrana: caracterização, danos e perspectivas de controle. **Hortisul**. v. 13, p. 21-25, 1994.
- ANDRADE, E. R. & DUCROQUET, J. P. H. J. Comparação de diferentes métodos de inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides* em goiabeira serrana. **Fitopatologia Brasileira**. v. 23, p. 486-488, 1998.
- AZEVEDO, J. L. **Genética de Microrganismos**. Goiana. Editora URG. 1998, 478p.
- AZEVEDO, J. L. O uso dos fungos na biotecnologia. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. Coord. **Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria**. Guaíba. Livraria e Editora Agropecuária Ltda. p. 93-152, 2001.
- BALALI, G. R.; WHISSON, D. L.; SCOTT, E. S.; NEATE, S. M. DNA fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. **Biotecnologies**. v. 9, p. 553-557, 1991.
- BARNES, J.; GAUR, A.; ROUX, J.; WINGFIELD, B. D. Microsatellite markers reflect intra-specific relationships between isolates of the vascular with pathogen *Ceratocystis fimbriata*. **Molecular Plant Pathology**. v.6, p. 319–325, 2001.
- BERRETA, M. F.; LECUONA, R. E.; ZANDOMENI, R. O.; GRAU, O. Genotyping isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* by RAPD with fluorescent labels. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 71,p. 145-150, 1998.

BIDOCHKA, M. J.; McDONALD, M. A.; LEGER, S. T.; ROBERTS, D. W. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Current Genetics**. v.25, p. 107– 113, 1994.

BOWMAN, B. H.; TAYLOR, J. W.; BROWNLEE, A. G.; LEE, J.; LU, S.; WHITE, T. J. Molecular evolution of the fungi: relationships of basidiomycetes, ascomycetes and chytridiomycetes. **Mycology**. v. 9. p. 285 – 286, 1992.

BOTELHO, R. V.; SOUSA, L. N.; PERES, N. A. R. Efeito do tratamento pós-colheita com cloreto de cálcio, pelo método da temperatura diferenciada, no controle de *Colletotrichum gloeosporioides* em goiabaws “brancas de kumagai”. **Summa Phytopatologica**. v. 26, p. 268–271, 2000.

BRIOSO, P. S. T. Emprego de PCR na identificação de fitopatógeno. **Fitopatologia Brasileira**. v.25, p. 251-254, 2000.

BROWN, T. A. **Genética um Enfoque Molecular**. 3<sup>a</sup>. edição. Guanabara koogan, 1999, 335p.

BUSCOT, F.; WIPH, D.; MENCH, J. C.; BOTTON, B.; MARTIN, F.; DE BATISTA, C. DNA polymorphism in morels: PCR/RFLP analysis of the ribosomal DNA spacers and microsatellite – pimed PCR. **Mycological Reasrch**. v.100, p. 63–71, 1996.

BUSSAB, W. O.; MIAZAKI, E. S.; ANDRADE, D. F. **Introdução à análise de agrupamentos**. Associação Brasileira de estatística. 105p. 1990.

BUXTON, E. W. Heterkaryses and parasexual recombinação in pathogenia strains of *Fusarium oxysporium*. **Journal General of Microbiology**. v. 15, p. 133-139, 1956.

CABERA, A. M. G. & ALVAREZ, R. E. Primera identificación de *Colletotrichum dematium* sobre *Aglaonema* y de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre singonio en el nordeste de la Argentina. **Investigación Agraria Producción y Protección Vegetales**. v. 16, p. 131-134, 2002.

CAETANO-ANOLLÉS, G.; BASSAN, B. J.; GRESSOFF, P. M. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. **Biotechnologies**. v. 9, p. 553-553, 1991.

CARVALHO, M. L. M.; VIEIRA, M. G. C.; PINHO, E. R. V. Técnicas moleculares em sementes. **Biotecnologia**. v. 17, p. 44-47, 2000.

CEDEÑO, L.; MOHALI, S.; ERNESTO, P. P. Antracnosis causada por dos cepas de *Glomerella cingulata* em frutos de parchita. **Fitopatología Venezolana**. v.6, p. 30 – 33, 2003.

CLEMENTS, F. E. & SHEAR, C. L. **The Genera of Fungi**. New York. Editora John Wiley 1931, 379 p.

COUTO, M. M. B.; HARTOG, B. J.; HUS, I. N. T.; VELD, J. H. J.; HOLSTRON, H. & VAN DER VOSSSEN, J. M. B. M. Identification of spoilage yeasts in a food – production chain reaction fingerprinting. **Food Microbiology**. v.13, p. 59 – 67, 1996.

DAVIS, R. D.; BOLAND, R. M.; HOWITT, C. J. Colony descriptions, conidium morphology and the effect of temperature on colony growth of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Stylosanthes* spp. Growing in several countries. **Mycological Research**. v.96, p. 128 – 134, 1992.

DE BARROS LOPES, M.; SODEN, A.; HINSCHKE, P. A.; LANGRIDGE, P. PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 62, p 4514 – 4520, 1996.

DESCENZO, R. A. & HARRINGTON, T. C. Use of (GAC)<sub>5</sub> as a DNA fingerprinting probe for fungi. **Phytopathology**. v. 84, p. 534-540, 1994.

DICKMAN, M. B.; PATIL, S. S.; KOLATTUKUDY, P. E. Effects of organophosphorus pesticides on cutinase activity and infection of papayas by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Phytopathology**. v.73, p. 1209 – 1214, 1983.

DODD, J. C.; ESTRADA, A.; JEGER, M. J, Epidemiology of *Colletotrichum gloeosporioides* in the tropics. In: BAILEY, J. A., JAGER, M. J. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. England: CAB International Walling Ford. p308 – 325, 1992.

DODD, J. C.L; ESTRADA, A. B. & WHIWILL, A. Chemical control of *Colletotrichum* infection in mangoes. In: BAILEY, J. A. & JEGER, M. J. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. England: CAB International Walling Ford. p.326 – 336, 1992.

DRIVER, F.; MILNER, R. J.; TRUEMAN, J. W. H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a polygenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycological Research**. v.104, p. 134 – 150, 2000.

ENKERLY, J.; WIDMER, F.; GESSLER, C.; KELLER, S. Strain – specific microsatellite markers in the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii*. **Mycological Research**. v. 105, p.1079 – 1087, 2001.

EVANS, K. J.; WHISSON, D. L.; STUMMER, B. E.; SCOTT, E. S. DNA markers identify variation in Australian populations of *Uncinula necator*. **Mycological Research**. v. 101, p. 923 – 932, 1997.

FEITOSA, M. I. Estudo comparativo de diversas culturas de *Colletotrichum* isolado de cajueiro (*Anacardium* sp) no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**. v.54, p.17 – 25, 1998.

FERREIRA, M. E. & GRATAPLAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores RAPD e RFLP e análise genética**. Brasília: EMBRAPA/CERNAGEN, 1998, p.220.

FREEMAN, S.; PHAM, M.; RODRIGUEZ, R. J. Molecular genotyping of *Colletotrichum* species based on arbitrarily primed PCR, A + T-Rich DNA, and nuclear DNA analysis. **Experimental Mycology**. v.17, p. 309 – 322. 1993.

FREIRE, L. L. C.; COSTA, A. B. L.; GÓES, L.; OLIVEIRA, N. T. DNA polymorphism and total protein in mutants of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch) Sorokin strain. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.32, p. 93 – 97. 2001.

FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v.14, p. 1 – 14. 2000.

FURTADO, J. S. Basidial cytology of *Exidia nucleata*. **Mycologia**. v. 60, p. 9-15, 1968.

GRUPTA, M.; CHYI, Y. S.; ROMERO – SEVERSON, J.; OWEN, J. L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 89, p. 998 – 1006, 1994.

GUTHRIE, P. A. I.; MAGILL, C. W.; FREDERIKSEN, R. A.; ODVODY, G. N. Random amplified polymorphic DNA markers – a system for identifying isolates of *Colletotrichum graminicola*. **Phytophology**, v. 82, p. 832 – 835, 1992.

HANTULA, J.; DUSABENYAGASANI, M.; HAMELIN, R. C. Random amplified microsatellites (RAMS) – a novel method for characterizing genetic variation within fungi. **Current Genetics**. v.26, p.159 – 166, 1996.

HAN, Q.; INGLIS, G. D.; HAUSNER, G. Phylogenetic relationships among strains of the entomopathogenic fungus, *Nomureae rileyi*, as revealed by partial B – tubulin sequences

and inter- simple sequence repeat (ISSR) analysis. **Letters in Applied Microbiology**. v.34, p. 376 – 383, 2002.

JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution horale. **Bulletin de la Societé Vand des Sciences Naturalles**. v. 44, p. 223-270, 1908.

JEFFRIES, P.; DODD, J. C.; JEGER & PLUMBLEY, R. A. The biology and control of *colletotrichum* sp on tropical fruit crops. **Plant Pathology**. v.39, p. 343 - 366, 1999.

JIMÈNEZ, L. & COLLADA, C. Técnicas para la evaluicòn de la diversidad genetica y su uso en los programas de conservaciòn. **Methods in Enzimology**. v.2, p. 237 – 248, 2000.

KAUFMANN, P. J. & WEIDEMANN, G. J. Isozyme analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* from five host genera. **Plant Disease**. v.80, p. 1289 – 1293, 1996.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; RESENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia: doenças cultivadas**. São Paulo. Editora Ceres. 1997, 774p.

LEAL, S. C. M.; BERTIOLI, D.; BUTT, T. M.; PEBERDY, J. F. Detection and characterization of *Metarhizium anisopliae* using molecular markers. **Microbiology**. v.23, p. 104 – 112, 1996.

LANZA, L. L.; SOUZA, C.CL.; OTTOBONI, L. M. M.; VIEIRA, M. L. C.; SOUZA, A. P. Genetic distance of inbred lines and prediction of maize single-cross perfomance using RAPD markers. **Theorical and Applied Genetics**. v. 94, p. 1023 – 1030, 2000.

LENNÉ, J. M. & BURDON, J. J. Preliminary study of virulence and isozymis variation in natural populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes guianensis*. **Phytopathology**. v.80, p. 728 – 731, 1990.

LEWIN, B. **Genes VII**. Porto Alegre. Editora Armed.2001, 955p.

LIBERATO, J. R. & TATAGIBA, J. S. Avaliação do biocontrole *in vitro* e em pós-colheita para o controle da antracnose e da podridão peduncular em frutos de mamão. **Summa Phytopathologica**. v.27, p. 409 – 414, 2002.

LODOLO, E. J.; VAN ZYL, W. H.; RABIE, C. J. A rapid molecular method to distinguish Fusarium species. *Mycological Research*. V. 97, p. 345-346, 1995.

LONSDALE, J. H.; LONSDALE, J. M.; GREEF, H.; BROOKS, W. The efficacy of prochloraz, chloramizol – sulphate and quazatine on postharvest disease of mango. **Microbiology**. v. 11, p. 35 – 38, 1993.

LONSDALE, J. H. & KOTZE, J. M. Chemical control of mango blossom diseases and the effect on fruit – set and field. **Plant Diseases**. v.77, p. 558 – 562, 1993.

LOPEZ, A. M. Q. The interaction between anthracnose, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., and cashew, *Anacardium occidentale* (L.). **Phytopathology**. v.23, p. 122 – 130, 1999.

LUNA, E. A. & AZEVEDO, J. L. Técnicas para coloração nuclear em estruturas vegetativas de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. **Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico**. v. 4, p. 20-21, 1983 a.

MADEIRA, M. C.CB.; REIFSCHNEIDER, J. B. Avaliação de métodos de inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutas de goiabeira serrana (*Feijoa solowians*). **Fitopatologia Brasileira**. v.12, p. 406 – 408, 1997.

MANNERS, J. M.; MASEL, A.; BRAITHWAITE, K. S.; IRWIN, J. A. G. Molecular analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* pathogenic on the tropical pasture legume *Stylosanthes*. In: BAILEY, J. A.; JAGER, M. J. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. England: CAB International Walling Ford. p. 250-288, 1992.

MASABA, D. & WALLER, J. M. Coffee berry disease: the current status. In: BAILEY, J. A. & JEGGER, M. J. **Colletotrichum: Biology, pathology and control**. England, CAB International Wallingford. p.237 – 249, 1992.

MARTIN, M. P. & FIGUERES, G. *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* cause anthracnose on olives. *European Journal of Plant Pathology*. v. 105, p. 733-741, 1999.

MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. São Paulo. Editora Holos. 2001, 200p.

MAVIDOU, A.; CANNONE, I; TYPAS, M. A.; Identification group I introns at three different positions within the 28S rDNA gene of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Fungal Genetics and Biology**. v.31, p. 79 – 90, 2000.

McPHERSON, M. J.; QUIRKE, P.; TAYLOR, G. R. **A practical approach – PCR-1**. The Practical Approach Series. Series Editors: D. Rickwood and B. D. Hames. 1991, p.235.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxônomicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Fitopatologia Brasileira**. v.27, p. 23 – 27, 2002.

MENEZES, M. & HANLIN, R. T. Morphological variability of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado trees from Nothranstern Brazil. **Phytopatology**. v.27, p. 228 – 236, 1996b.

MESSIAS, C. L. & AZEVEDO, J. L. Parasexuality in the deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. **Transactions Brits Mycological Society**. v. 44, p. 417-436, 1980.

MICHELMORE, R. W. & HULBERT, S. H. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**. v.25, p. 383 – 404, 1998.



MILACAB, S. K. Marcador de DNA. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v.5, p. 14 – 17, 1998.

MILLER, J. D.; GREENHALGH, R.; WANG, Y. Z.; LU, M. Trichothecene chemotypes of three *Fusarium* species. **Mycologia**. v. 83, p. 121-130, 1991.

MILLS, P. R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A. E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. **FEMS Microbiology Letters**. v. 98, p. 137 – 144, 1992.

MORIN, L.; DERBY, J. L.; KOKKO, E. E. Infection process of *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp *malvae* on *Malvaceae* weeds. **Micological Research**. v.100, p. 165 – 172, 1996.

MOOTOO, A. Effect of postharvest calcium chloride dips on ripening changes in ‘julie’ mangoes. **Tropical Science**. v.31, p. 243 – 248, 1991.

MULLIS, K.; FALOOMA, F.; SCHARF, S.; SAIKE, R. K. Specific amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology**. v.5, p.260 - 272, 1998.

MUNAUT, F.; HAMAIDE, N.; MARIOTTE, H. Genomic and pathogenic diversity in *Colletotrichum gloeosporioides* from wild native Mexican *Stylosanthes* spp., and taxonomic implications. **Micological research**. v.106, p. 479 – 593, 2002.

MUNIZ, M. F. S.; SANTOS, R. C. R.; BARBOSA, G. V. S. Patogenicidade de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre algumas plantas frutíferas. **Summa Phytopatologica**. v.24, p. 177 – 179, 1998.

MUNIZ, M. F.; MARIA, M. P. M.; QUEIROZ, F. M.; MENEZES, M.; CASTRO, N. R. *Colletotrichum gloeosporioides* como patógeno da mangabeira (*Hancornia speciosa*) no Brasil. **Summa Phytopatologica**. v. 23, p. 42 – 44, 1997.

NASCIMENTO, S. R. C.; NETO – ARAÚJO, S. E.; HAFLE, O. M. Uso de prochloraz, azoxystrobin e bicarbonato de sódio, para o controle pós-colheita de *Colletotrichum gloeosporioides*, em manga ‘Tommy atkins’. **Summa Phytopathologica**. v.26,p. 379 – 382, 2000.

NETO, E. F.; NAKAMURA, K.; OLIVEIRA, J. C. Influência de alguns fatores na germinação de conídios, no crescimento micelial e na esporulação de alguns isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos de *Passiflora* sp. **Fitopatologia Brasileira**. v.20, p. 96 – 101, 1994.

NEUVÈGLISE, C.; BRYGOO, Y.; VERCAMBRE, B. & RIBA, V. Comparative analysis of molecular and biological characteristics of strains of *Beauveria brongniartii* isolated from insects. **Mycological Research**. v.98, p. 322- 328, 1994.

O’DONNELL, K. Ribosomal DNA internatranscribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). **Currier Genetic**. v.22, p. 213 – 220, 1992.

OUELLET, T. & SEIFERT, K. A. Genetic characterization of *Fusarium graminearum* strains using RAPD and PCR amplification. **Phytopathology**. v.83, p. 1003 – 1007, 1993.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D. & AZEVEDO, J. L. Parasexuality in *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrat Pathology**. v. 57, p. 172 – 176, 1991.

PATARO, C.; GUERRA, J. B.; PETRILLO-PEIXOTO, M. L. MENDONÇA-HAGLER, L. C.; LINATDI, V. R. & ROSA, C. A. Yeast communities and genetic polymorphism of

*Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**. v.89, p. 24 – 31, 2000.

PRUSKY, D.; KARMI, L.; KOBILER, I.; PLUMBLEY, R. A.; Induction of the antifungal diene in unripe avocado fruits: effect of inoculation with *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Pathology**. v. 27, p. 269-279, 1995.

RAEDER, U. BRODA, P. Rapid preparation of DNA filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**. v. 1, p. 17-20. 1985.

ROCHA, J. R. S. & OLIVEIRA, N. T. Antagonistic potencial in vitro of isolates of *Trichoderma* against *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose agent in the passion fruit (*Passiflora*). **Boletim Micológico**. v.13,p. 273 – 276, 1998.

ROHLF, F. J. NTSYS – PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Applied Biostatistics, Ins. New York, Exeter Publishing, 1998.

SAHA, T.; KUMAR, <sup>a</sup>; RAVINDRON, M.; JACOB, C. K.; ROY,; NACER, M. A. Identification of *Colletotrichum acutatum* from rubber using random amplified polymorphic DNAs and ribosomal DNA polymorphisms. **Micological Research**. v. 106, p. 215-221, 2002.

SAMBROOK, J.; FRISTSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**. 2<sup>a</sup>. edição. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor: New York, 1989.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M. & AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria**. Livraria e Editora Agropecuária Ltda. 2001, 463p.

SHERRIFF, C.; WHELAN, M. J.; ARNOLD, G. M.; LAFAY, J. F.; FRYGOO, Y.; BAILEY, J. A. Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. **Experimental Mycology**. v. 18, p. 121-138, 1994.

SILVA-MANN, R.; SALGADO, K. C. C.; VIEIRA, M. G. G. C. & MACAHADO, J. C. Variabilidade genética de isolado do complexo *Colletotrichum* associados a sementes de algodoeiro, por meio de técnicas moleculares e inoculação em plantas. **Fitopatologia Brasileira**. v.1, p. 27 – 31, 2002.

SKIPP, R. A.; BEEVER, R. E.; SHARROCK, K. R.; RIKKERINK, E. H. A. & TEMPLETON, M. D. *Colletotrichum gloeosporioides*: association with plants. **Phytopathology**. v.99, p.159 – 167, 1995.

SMITH, B. J. & BLACK. J. Morphological, cultural and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. **Plant Disease**. v.74, p. 69 – 76, 1990.

SREENIVASAPRASAD, S.; MILLS, P. R.; MEEHAN, B. M.; BROWN, A. E. Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. **Genome**. v.39, p. 499 – 512, 1996.

STRADIOTO, M. F. Variabilidade de *Colletotrichum* (Penzig) Penzig & Sacc. E resistência de seringueira (*Harvea* spp) ao patógeno. **Dissertação**. Minas Gerais. Universidade Federal de Viçosa. 1993, 64p.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and anamorph. In: BAILEY, J. A. & JEGER, M. J. ***Colletotrichum: biology, pathology and control***. England, CAB International Wallingford. p. 1- 26, 1992.

TAVARES, S. C. S. H.; NASCIMENTO, A. R. P.; NASCIMENTO, C. E. S. & KARASAWA, M. Evidência de *Colletotrichum gloeosporioides* como patógeno de umbuzeiro (*Spondias tuberosa*) no Brasil. **Summa Fytophologica**. v.24, p. 51 – 53, 1998.

TEIXEIRA, M. A.; BETTIOL, W.; CESNIK, R. Patogenicidade do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* patógeno de *Orthezi praelonga*, para folhas, fruta e flores cítricas. **Summa Phytopathologica**. v.27, p. 352 – 357, 2001.

VARZEA, V. M. P.; ROGRIGUES JUNIOR, C. J.; LEWIS, B. G. Distinguishing characteristics and vegetative compatibility of *Colletotrichum kahawe* in comparison with other related species from coffee. **Plant Pathology Oxford**. V. 51, p. 202-207. 2002.

VERAS, S. M.; GASPARATTO, L.; MENEZES, M. Variabilidade fisio-morfológica de *Colletotrichum* em diferentes substratos. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**. v.40, p. 297 – 305, 1997.

VILARINHOS, A. D.; PAULO Jr., T. J.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Characterization of races of *Colletotrichum lindemuthianum* by the random amplified polymorphic DNA technique. **Fitopatologia Brasileira**. v.20, p.194 – 198, 1995.

VINNERE, O.; FATEHI, J.; WRIGHT, S.; GERHARDSON, B. The causal agent of anthracnose of *Rhododendron* in Sweden and Latvia. **Micological Research**. v.106, p. 60 – 69, 2002.

WALLER, J. M. *Colletotrichum* diseases of perennial and other cash crops. In: BAILEY, J. A & JEGER, M. J. **Colletotrichum: biology, pathology e control**. England, CAB International Wallingfort, p. 167 – 185, 1992.

WARD, E. & GRAY, R M. Generation of a ribosomal DNA probe by PCR and its use in identification of fungi within the *Gaeumannomyces – Phialophora* complex. **Plant pathology**. v.41, p. 730 – 736, 1992.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A. & TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Reseaech**. v.18, p. 6531 – 6535, 1990.

ZULFIQAR, M.; BRLANSKY, R. H.; TIMMER, L. W. Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Micology**. v.88, p. 121 – 128, 1996.