

MEIRIANA XAVIER VILA NOVA

Patogenicidade à cebola (*Allium cepa* L) e análise da diversidade genética de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* do Estado de Pernambuco, Brasil, por RAPD e região ITS do rDNA.

Recife/PE
2004

MEIRIANA XAVIER VILA NOVA

Patogenicidade à cebola (*Allium cepa* L) e análise da diversidade genética de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* do Estado de Pernambuco, Brasil, por RAPD e região ITS do rDNA.

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. Neiva Tinti de Oliveira

CO-ORIENTAÇÃO:

Dr. Antonio Félix da Costa

Recife/PE

2004

Meiriana Xavier Vila Nova

Patogenicidade à cebola (*Allium cepa* L) e análise da variabilidade genética de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* do Estado de Pernambuco, Brasil, por análise de RAPD e da região ITS do rDNA/ Meiriana Xavier Vila Nova-Reciefe: O Autor, 2004.

71 folhas :il., fig ., tab.

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

Inclui bibliografia e apêndice.

1. Micologia aplicada. 2. Fungos fitopatogênicos (*Colletotrichum gloeosporioides*) – Cebola (*Allium cepa* L.) – Doença. 3. Genética molecular – Diversidade.

I. Título.

582.288.3
579.55

CDU (2.ed)
CDU (21.ed.)

UFPE
BC2004-112

Patogenicidade à cebola (*Allium cepa* L) e análise da diversidade genética de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* do Estado de Pernambuco, Brasil, por RAPD e região ITS do rDNA.

MEIRIANA XAVIER VILA NOVA

ORIENTAÇÃO: Profa. Dra. Neiva Tinti de Oliveira

CO-ORIENTAÇÃO: Dr. Antonio Félix da Costa

Dissertação de Mestrado apresentada no dia 3 de fevereiro de 2004, pela Banca Examinadora, composta dos seguintes membros.

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

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

Profa. Dra. Neiva Tinti de Oliveira (Departamento de Micologia / UFPE)

SUPLENTES:

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

Prof. Dr. Rildo Sartori (Departamento de Fitossanidade / (UFRPE)

RECIFE/PE
2004

OFEREÇO:

A minha mãe Ivone Xavier do Nascimento, pelo carinho e apoio que nunca faltou.

DEDICO:

Ao meu pai José Mario Vila Nova.

À minha irmã Marione Xavier Vila
Nova, pela amizade e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao Deus, a quem devo a minha vida, e ao meu seguidor MEISHU-SAMA.

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) pela oportunidade de realizar o Mestrado em Biologia de Fungos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo suporte financeiro e técnico-científico no decorrer deste trabalho.

Aos chefes do Departamento de Micologia – UFPE, Profa. Elza Áurea de Luna Alves Lima, pela facilidade de oferecer todo o suporte técnico e materiais para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, nas pessoas da Profa. Dra. Neiva Tinti de Oliveira e Profa. Dra. Leonor Costa Maia, e ao secretário Luiz Carlos, pelo esforço para disponibilizar os materiais necessários à realização deste trabalho.

À minha orientadoras Profa. Dra. Neiva Tinti de Oliveira, pela amizade, respeito e paciência, tornando assim a pesquisa prazerosa.

Ao meu co-orientador Dr. Antonio Félix da Costa, pela amizade construída, paciência e boa vontade de atender a todos os momentos que precisei.

À Profa. Dra. Elza Áurea de Luna Alves Lima, pelo apoio, amizade, sinceridade, sugestões e pelo livre acesso aos seus laboratórios.

À Profa. Dra. Janete Magali de Araújo do Departamento de Antibióticos, pela amizade e por conceder livre acesso ao termociclador do seu laboratório.

Aos professores Severina Torres de Barros e Sidney Turyassú Gomes Bastos, pelo apoio amizade e o livre acesso a seus respectivos laboratórios.

À Profa. Dra. Leonor Costa Maia pelas facilidades concedidas na casa-de-vegetação, no decorrer dos experimentos realizados, no ano de 2003, e a equipe companheira: Bereneuza Tavares Ramos Valente Brasileiro, Raquel, Lílian, Vivian e Francinete Carla Nunes Cavalcanti pelo apoio e colaboração.

À Profa. Dra. Laura por ter concedido os vasos para a realização do teste de patogenicidade na casa-de-vegetação.

Ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos – UFPE, que muito contribuiu para a minha formação intelectual, em especial à Profa. Dra. Elza Áurea de Luna Alves Lima.

Aos Professores Doutores e Membros da Banca Janete Magali de Araújo, Elza Áurea de Luna Alves Lima, Lusinete Aciole de Queiroz e Rildo Sartori, por terem aceito compor a banca examinadora deste meu trabalho.

Em especial para Dra. Bereneuza Tavares Ramos Valente Brasileiro e à mestra Adna Cristina de Sousa pelo apoio e amizade em todo decorrer do trabalho.

Aos colegas de Laboratório do Curso de Pós-graduação em Biologia de Fungos – UFPE: Patricia, Petrusk, Aline, Inês, Adna, Gladistone, Erica, Janaina e André (Minha turma de Mestrado), Amélia Guimarães, Ana Cristina Silveira, Elvira Alencar, Ubirany L. Ferreira, Bereneuza Brasileiro, Marlon e Sergio que me incentivaram a prosseguir, com ótima convivência e amizade durante o curso.

Finalmente, a todos aqueles que, de uma forma ou de outra, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

SAMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O HOSPEDEIRO.....	16
2.2	AGENTE ETIOLOGICO.....	17
2.3	FERRAMENTAS MOLECULARES NO ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	OBTENÇÃO E MANUNTENÇÃO DOS ISOLADOS.....	25
3.2	ISOLAMENTO DE <i>C. gloeosporioides</i> DE PEDÚNCULOS, FOLHAS E INFLORESCÊNCIAS DAS PLANTAS DE CEBOLA.....	26
3.3	TESTE DE PATOGENICIDADE DOS ISOLADOS DE <i>C. gloeosporioides</i> EM CEBOLA.....	26
3.3.1	Preparo do Inoculo.....	26
3.3.2	Inoculação nas folhas da cebola.....	27
3.3.3	Avaliação da patogenicidade dos isolados de <i>C. gloeosporioides</i> em folhas da cebola.....	27
3.3.4	Inoculação nos bulbos da cebola.....	29
3.3.5	Avaliação da patogenicidade dos isolados de <i>C. gloeosporioides</i> em bulbos de cebola.....	29
3.3.6	Análise Estatística.....	31
3.4	ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA PELOS MARCADORES MOLECULARES RAPD E REGIÃO ITS DO DNA RIBOSSOMAL.....	31
3.4.1	Obtenção de micélio para extração do DNA.....	31
3.4.2	Extração de DNA genômico.....	31
3.4.3	Quantificação do DNA genômico.....	32
3.4.4	Técnica de RAPD (WILLIAMS <i>et al.</i> , 1990).....	32
3.4.5	Seleção dos <i>Primers</i>	32
3.4.6	Região de ITS do DNA ribossomal (WHITE <i>et al.</i> , 1990).....	33
3.4.7	Amplificação de DNA da região ITS do rDNA.....	33
3.4.8	Digestão enzimática dos produtos de amplificação das regiões ITS1-5.8S-ITS2 DO rDNA.....	34
3.4.9	Análise computacional dos dados.....	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35

4.1	Isolamento de <i>C. gloeosporioides</i> de pedúnculo, folha e inflorescência de plantas da cebola.....	35
4.2	TESTES DE PATOGENICIDADE EM FOLHAS E EM BULBOS DA PLANTA DA CEBOLA.....	36
4.2.1	Patogenicidade em folhas da planta da cebola.....	36
4.2.2	Patogenicidade em bulbo da planta da cebola.....	37
4.2.3	Comparação dos testes de patogenicidade de folhas e bulbos de cebola.....	38
4.3	ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA PELOS MARCADORES MOLECULARES RAPD E REGIÃO ITS DO DNA RIBOSSOMAL.....	43
4.3.1	Extração e quantificação de DNA.....	43
4.3.2	Seleção de <i>primers</i>	44
4.3.3	Análise dos perfis de RAPD.....	47
4.4	ANÁLISE DAS REGIÕES ITS DO rDNA.....	55
4.4.1	Análise dos produtos de amplificação.....	55
4.4.2	Análise dos fragmentos de restrição.....	55
5	CONCLUSÃO	60
6	BIBLIOGRAFIA	61
7	APÊNDICE	69

LISTA DE FIGURAS

1	Sintomas induzidos por <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , em A = folha e B=bulbo.....	18
2	A estrutura do agregado gênico com representação das regiões ITS 1, 2 e subunidade 5.8s do rDNA com primers ITS1 e ITS4.....	24
3	Escala de notas utilizada na identificação da patogenicidade de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> à cebola (Michereff, 28	

	2000).....	
4	Ilustração da e escala de notas em teste de patogenicidade de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> a bulbos de cebola.....	30
5	Morte da planta de cebola após oito dias de inoculação do isolado 4627 de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , à esquerdo o controle ao lado direito.....	36
6	Quantificação de DNA de quinze isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . Nas pistas A, B e C, encontram-se os marcadores moleculares do DNA do fago λ nas concentrações de 10, 15, 25ng/ μ L respectivamente; na pistas de 4 a 10 e de 11 a 18 encontram-se o DNA dos isolados, 2980, 4627, 4626, 4628, 2060, 2018, 4629, 2681, 2334, 2335, 2336, 3882, 2543, 2547 e 3923.....	43
7	Seleção de <i>primers</i> utilizando o DNA total do isolado 2336 de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> no primeiro poço (M), encontram-se o DNA do fago λ (<i>Hind III</i>) e nos poços de 1 a 9 estão: OPA 1, OPA 2, OPA 3, OPA 4, OPA 5, OPA 8, OPA 9, OPA 10, OPA 11 e OPA 12.....	45
8	Seleção de <i>primers</i> utilizando o DNA total do isolado 2336 de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> no primeiro poço (M), encontram-se o DNA do fago λ (<i>Hind III</i>) e nos poços de 1 a 10 estão: OPW 1, OPW 2, OPW 3, OPW 4, OPW 6, OPW 8, OPW 9, OPW 10. Em seguida no primeiro poço (M), encontram-se o DNA do Fago λ (<i>Hind III</i>) e nos poços de 9 a 16 estão OPW 13, OPW 14, OPW 15, OPW16, OPW 17, OPW18, OPW 19 e OPW 20.....	46
9	Seleção de <i>primers</i> utilizando o DNA total do isolado 2336 de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> no primeiro poço (M), encontram-se o DNA do fago λ (<i>Hind III</i>) e nos poços de 1 a 11 estão: OPX 1, OPX 2, OPX 3, OPX 4, OPX 5, OPX 6, OPX 7, OPX 8, OPX 9, OPX 10, OPX 11. Em seguida no primeiro Poço (M), encontram-se o DNA fago λ (<i>Hind III</i>) nos poços de 12 19 estão: OPX 12, OPX13, OPX 14, OPX 15, OPX 16, OPX 17, OPX 18.....	46
10	Perfis de RAPD de 15 isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , obtidos com o <i>primer</i> OPA 2. (M) marcador de peso molecular DNA's do fago λ cortado com a enzima <i>Hind III</i> nos poços de 1 a 15 estão os DNAs dos isolados 2980, 4627, 4626, 4628, 2060, 2018, 4629, 2681, 2334, 2335, 2336, 3882, 2543, 2547 e 3923.....	50
11	Perfis de RAPD de 15 isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , Obtidos com o <i>primer</i> OPA 3 (M) marcador de peso molecular DNA do fago λ cortado com a enzima <i>Hind III</i> , nos poços de 1 a 15 estão os DNA's dos isolados 2980, 4627, 4626, 4628, 2060, 2018, 4629, 2681, 2334, 2335, 2336, 3882, 2543, 2547 e 3923.....	50
12	Perfis de RAPD de 15 isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> obtidos com o <i>primer</i> OPW 8 (M) marcador	51

- gloeosporioides*, obtidos com o *primer* OPW 8 (M) : marcador de peso molecular DNA do fago λ cortado com a enzima *Hind III*, nos poços de 1 a 15 estão os DNA's dos isolados 2980, 4627, 4626, 4628, 2060, 2018, 4629, 2681, 2334, 2335, 2336, 3882, 2543, 2547 e 3923.....
- 13** Perfis de RAPD de 15 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos com o *primer* OPW 17 (M) : marcador de peso molecular DNA do fago λ cortado com a enzima *Hind III*, nos poços de 1 a 15 estão os DNA's dos isolados 2980, 4627, 4626, 4628, 2060, 2 018, 4629, 2681, 2334, 2335, 2336, 3882, 2543, 2547 e 3923..... 51
- 14** Perfis de RAPD de 15 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos com o *primer* OPW 20 (M) : marcador de peso molecular DNA do fago λ cortado com a enzima *Hind III*, nos poços de 1 a 15 estão os DNA's dos isolados 2980, 4627, 4626, 4628, 2060, 2018, 4629, 2681, 2334, 2335, 2336, 3882, 2543, 2547 e 3923..... 52
- 15** Perfis de RAPD de 15 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos com o *primer* OPX 04 (M) : marcador de peso molecular DNA do fago λ cortado com a enzima *Hind III*, nos poços de 1 a 15 estão os DNA's dos isolados 2980, 4627, 4626, 4628, 2060, 2018, 4629, 2681, 2334, 2335, 2336, 3882, 2543, 2547 e 3923. 52
- 16** Perfis de RAPD de 15 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos com o *primer* OPX 13 (M) : marcador de peso molecular DNA do fago λ cortado com a enzima *Hind III*, nos poços de 1 a 15 estão os DNA's dos isolados 2980, 4627, 4626, 4628, 2060, 2018, 4629, 2681, 2334, 2335, 2336, 3882, 2543, 2547 e 3923..... 53
- 17** Dendrograma construído pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de Jacard a partir dos perfis de Fragmentos obtidos por RAPD de 15 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*..... 54
- 18** Perfis da região ITS do rDNA dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos com *primers* ITS1 e ITS4, em gel de agarose. Nas pistas M, marcador de peso molecular 100bp, nas pistas de 1 a 15, encontram-se os DNA's dos isolados 2980, 4627, 4626, 4628, 2060, 2018, 4629, 2681, 2334, 2335, 2336, 3882, 2543, 2547 e 3923..... 57
- 19** Perfis de restrição dos fragmentos de DNA da região ITS do DNA de 15 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos com a enzima *Dra I* Obtidos em gel de agarose. Nas pistas M, marcador de peso molecular 100bp, nas pistas de 57 1 a 15, encontram-se os DNA's dos isolados 2980, 465727, 4626, 4628, 2 018, 2018, 4629, 2681, 2334, 2335, 2336, 3882, 2543, 2547 e 57

	3923.....	
20	Perfís de restrição dos fragmentos de DNA da região ITS do DNA de 15 isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> obtidos com a enzima <i>Hae III</i> Obtidos em gel de agarose. Nas pistas M marcador de peso molecular 100bp, nas pistas de 1 a 15, encontram-se os DNA's dos isolados 2980, 4627, 4626, 4628, 2018, 2018, 4629, 2681, 2334, 2335, 2336, 3882, 2543, 2547 e 3923.....	58
21	Perfís de restrição dos fragmentos de DNA da região ITS do DNA de 15 isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> obtidos com a enzima <i>Msp I</i> Obtidos em gel de agarose. Nas pistas M, marcador de peso molecular 100bp, nas pistas de 1 a 15, encontram-se os DNA's dos isolados 2980, 4627, 4626, 4628, 2018, 2018, 4629, 2681, 2334, 2335, 2336, 3882, 2543, 2547 e 3923.....	58
22	Dendrograma construído pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de Jacard a partir dos perfís de fragmento da região ITS do rDNA obtidos de 15 isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> com enzimas de restrição <i>Dra I</i> , <i>Hae III</i> e <i>Msp I</i>	59

LISTA DE TABELA

1	Origem das amostras de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> depositadas na Micoteca URM, Recife, PE, Brasil.....	25
2	Escala de notas utilizada na avaliação da patogenicidade de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em plantas de cebola.....	27
3	Escala de notas utilizada para avaliar a patogenicidade de 15 isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em bulbos de cebola.....	29
4	Isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	35

5 Índice de doença causada por isolados de <i>C. gloeosporioides</i> em Plantas de cebola Texas Early Grano 502 baseado em Mackinney (1923).....	40
6 Índice de Doença de quatro dos cinco isolados de cebola.....	41
7 Diâmetro das lesões provocadas por diferentes isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em bulbos de cebola da cultivar Texas Early Grano 502.....	42
8 <i>Primers</i> selecionados para o RAPD e respectivas seqüências de nucleotídeos.....	44

Patogenicidade à cebola (*Allium cepa* L) e análise da diversidade genética de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* do Estado de Pernambuco, Brasil, por RAPD e região ITS do rDNA.

MEIRIANA XAVIER VILA NOVA

RESUMO

A antracnose foliar ou mal-das-sete-voltas na cebola, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, destaca-se como uma das principais doenças em locais de produção da cebola no estado de Pernambuco. O presente trabalho objetivou estudar a patogenicidade na cebola de isolados de *C. gloeosporioides* e analisar a variabilidade genética pelo uso dos marcadores moleculares RAPD e a região ITS do rDNA. No trabalho foram utilizados 11 isolados do fungo, obtidos de diferentes substratos e hospedeiros e 5 isolados obtidos de cebola de diferentes regiões de Pernambuco e um do Amazonas. O teste de patogenicidade foi realizado em mudas e bulbos da cebola Os isolados mais agressivos foram quatro provenientes de cebola nos dois testes. Nas

análises de RAPD foram utilizados sete *primers* de seqüências arbitrárias. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose a 1,4% e mostraram bandas polimórficas que permitiram avaliar a distância genética entre os 15 isolados. Estes foram classificados em quatro grupos distintos. Os produtos de amplificação dos loci ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA com *primer* ITS1 e ITS4 também apresentaram polimorfismo e foram digeridos com três enzimas de restrição, *Dra* I, *Hae* III e *Msp* I. Apenas as duas últimas foram eficientes em mostrar variações genéticas entre os isolados. Os dois marcadores utilizados foram capazes de diferenciar o isolado do Amazonas dos demais de Pernambuco. Os resultados obtidos com os marcadores moleculares não mostraram relação com o grau de patogenicidade dos mesmos à cebola..

Pathogenicity to onion (*Allium cepa* L) and analysis of genetic diversity, by RAPD of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from the state of Pernambuco, Brazil

MEIRIANA XAVIER VILA NOVA

ABSTRACT

The leaf anthracnose or evil-give-seven-turns of onion, caused by *Colletotrichum gloeosporioides* stands out as one of the main diseases in areas of production of the onion in the State of Pernambuco. This isolated from onion work aimed to study the pathogenicity of *C. gloeosporioides* and to analyze the genetic variability through RAPD and the region ITS of the rDNA. Sixteen strains were used: 11 from different substrata and hosts and 5 from lesions of *C. gloeosporioides* isolated from onions of different regions of Pernambuco and one from Amazonas. The pathogenicity

test was accomplished in seedlings and bulbilhos of the onion. Four strain esolated from onion, were from most aggressivein both test. In the analyses of RAPD seven primers of arbitray sequences were used. The amplification products were separate in agarose gel to 1,4% and showed polymorphics bands that allowed to evaluate the genetic distance among the 15 strais. Which were classified in four groups. The products of amplification of the loci ITS1-5. 8 S-ITS2 of the rDNA with the *primers* ITS1 and ITS4 also presented polymorphism and were digested with three restriction enzymes *Dra* I, *Hae* III and *Msp* I. The last two just showed genetic variations among the isolated ones. Only the last two were udeful differentiate the strain from Amazonas from those al Pernambuco. The results obtained with the molecular markers they didn't show relationship with the pathogenicity degree of the strains onion.

Key words: RAPD; rDNA; *Colletotichum gloeosporioides*; *Allium cepa* L

Palavra-chave: RAPD; rDNA; *Colletotichum gloeosporioides*; *Allium cepa* L

1. INTRODUÇÃO

A cebola cultivada (*Allium cepa* L), pertencente à família Alliaceae (CARDOSO & COSTA,1999), é uma monocotiledônia, herbácea com caule subterrâneo bulboso (JOLY, 1998). No Brasil, a produção em 1999 foi de 988.658 toneladas, destacando-se as regiões Nordeste, Sul e Sudeste como maiores produtores no país. No estado de Pernambuco, os municípios de Petrolina, Petrolândia e Jatobá (IBGE, 1999) apresentam expressiva produção.

Doenças causadas por vírus, bactérias e fungos têm sido relatadas em todos os países produtores de cebola, podendo reduzir a produtividade e a qualidade das sementes e do bulbo (NUNES & KIMATI, 1997).

A antracnose foliar ou mal-das-sete-voltas, é uma enfermidade que causa sérios problemas na cultura da cebola em Pernambuco e em outras regiões do país (MARANHÃO *et al.*, 1997). No Brasil, o agente causador da antracnose na cebola é o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* que exhibe consideráveis variações morfológicas e

patogênicas, pouco sendo conhecido sobre bases genéticas e suas variações intraespecíficas (ASSUNÇÃO, 1997).

Várias técnicas moleculares são utilizadas nos estudos de fungos fitopatogênicos. A reação de polimerase em cadeia (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) é uma importante técnica molecular de estudo genético em diversos organismos. Esta técnica de simples execução, requer quantidades mínimas de DNA (FUNGARO, 2000). A técnica de DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA*) surgiu posteriormente como importante ferramenta baseada em PCR para estudar a diversidade genética de bactérias, plantas, animais e fungos (FERREIRA & GATTAPAGLIA, 1996). A técnica de PCR pode também ser aplicada para analisar regiões do espaço transcrito interno do DNA ribossomal (ITS–*Internal Transcribed Spacer*) possibilitando comparações de diferentes gêneros e espécies (FUNGARO, 2000).

O presente trabalho apresenta como objetivos a avaliação da variabilidade genética de isolados de *C. gloeosporioides*, coletados em diferentes locais do Estado de Pernambuco, pela utilização de marcadores moleculares e a investigação do relacionamento entre os perfis moleculares obtidos e o grau de patogenicidade destes isolados à cebola.

2 REVISÃO LITERÁRIA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O HOSPEDEIRO

A cebola é originária das regiões montanhosas do Iran e Paquistão, havendo citações de que chineses, indianos e egípcios a consumiam há 4000 anos. Provavelmente o centro de origem da espécie tenha sido o Egito (FONTES, 1998).

A produção mundial de cebola de 1990 a 1995, segundo a FAO, foi de 27 a 32,5 milhões de toneladas/ano, variando conforme a área de cultivo. Os maiores produtores mundiais são China, Índia, Estados Unidos, Turquia, Japão, Iraque, Paquistão, Rússia, Espanha e Brasil, que respondem por mais de 67% da oferta mundial. A cultura no Brasil é plantada comercialmente desde a região Sul até Nordeste. Nesta distribuição geográfica destacam-se como grandes produtores: Santa Catarina, Rio Grande do Sul, São Paulo, Paraná e Pernambuco (DEBARBA *et al.*, 1998). No Nordeste brasileiro é produzida no Vale de São Francisco, onde o cultivo é realizado durante todo o ano, gerando empregos diretos e indiretos (ASSUNÇÃO *et al.*, 1999). Esta hortaliça atua

eficazmente como bactericida e antiinflamatório, possuindo na sua composição a vitamina K (naftoquinona), além de cálcio, ferro, iodo e flúor (COSTA, 1996).

Segundo Assunção *et al.* (1997), inúmeras doenças fúngicas atacam as plantas da família Aliaceae, principalmente a cebola. Algumas dessas doenças são fatores limitantes da produção, ocasionando perdas significativas em todas as regiões produtoras do Brasil. Dentre estas a antracnose foliar ou mal-das-sete-voltas, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, é uma das principais, causando perdas de 100% nos campos de produção. Zambolim & Jaccoud Filho (2000) relatam que a infecção ocorre desde a fase de sementeira até o armazenamento, quando provoca podridão dos bulbos, manifestando-se de várias formas, freqüentemente em proporções epidêmicas alarmantes. De acordo com Fontes (1998), as cultivares Vale Ouro IPA-11 e Belém IPA-9 são bastante resistentes, enquanto a cultivar Texas Grano 502 é a mais susceptível ao *C. gloeosporioides*.

2.2 AGENTE ETIOLOGICO

Colletotrichum gloeosporioides (Penz) penz & Sacc. é um anamorfo, da classe Coelomycetes, ordem Melaconiales, família Melanconiaceae; gênero *Colletotrichum*; espécie *C. gloeosporioides*, com base em Kendrick (1992).

C. gloeosporioides é conhecido como agente causal de doenças comumente chamadas de antracnoses, com ampla gama de plantas hospedeiras ocorrendo em frutos, caules e folhas (MUNIZ *et al.*, 1998). É cosmopolita e tem numerosos hospedeiros, proliferando em condições de alta temperatura e umidade, especialmente quando ocorrem chuvas freqüentes, sendo bem conhecidas pelos danos causados em fruteiras como o cacaueteiro (*Theobroma cacao* L), abacateiro (*Persea americana* Mill.), mamoeiro (*Carica papaya* L.) e mangueira (*Mangifera indica* L.) (ANDRADE & DUCROQUET,1998).

Na cebola, a doença é chamada de antracnose foliar ou mal-das-sete-voltas, ocorre desde a fase de canteiro até a colheita e armazenamento dos bulbos. Em outros países, como a Nigéria, recebe o nome de *Twister*, e causando perdas de produção da ordem da 50-100%. O nome mal-das-sete-voltas costumava ser empregado para outras

enfermidades como a podridão basal, causada pelo fungo *Fusarium oxysporium* f. sp. *cepae*, atualmente, a denominação tem sido quase que exclusivamente utilizada como referência à antracnose foliar, que foi favorecida com descrição do agente causal desta doença como sendo *C. goeosporioides* f.sp. *cepae* (NUNES & KIMATI, 1997).

Zambolim & Jaccoud Filho (2000) relatam que a doença ocorre em quase todas as regiões produtoras de cebola no Brasil, desde o Nordeste, Sudeste e o Sul. Trata-se de uma das doenças mais importantes nos municípios de Belém de São Francisco e Santa Maria da Boa Vista, em Pernambuco, e Juazeiro, Sobradinho e Casa Nova, na Bahia, causando perdas de 100% nos campos de produção.

Nunes & Kimati (1997) relatam que o agente causador desta doença foi identificado inicialmente como sendo *C. chordanianum* Nolla que, segundo Arx é sinonímia de *C. gloeosporioides*. Em 1979, após ter sido demonstrado na ESALQ, que Piracicaba, o fungo que infectava a cebola tinha especificidade de hospedeiro, não sendo o que ocorre em outras espécies de plantas, foi sugerido o nome *C. gloeosporioides* (Sensu Arx,1957) f.sp. *cepae* para se referir aos isolados patogênicos à cebola. Esta tem sido a denominação aceita em nosso país até os dias atuais. Em outros países onde ocorre, causando a doença denominada *twister*, o fungo é denominado *C. gloeosporioides*, sem referência à forma especial, mas sim ao teliomorfo *Glomerella cingulata*.

C. gloeosporioides é um fungo mitospórico que produz conídios hialinos e unicelulares. Na cebola, as lesões causadas por esse fungo são alongadas, deprimidas e de coloração parda, notando-se pontuações pretas no centro, dispostas em anéis concêntricos. Quando provoca lesão nos bulbos, manifesta-se de várias formas, freqüentemente em proporções alarmantes (ZAMBOLIM & JACCOUD FILHO, 2000) (Figura 1A e AB). Cardoso & Costa (1999) comentam que bulbos de cebola podem vir a ser veículos de disseminação de doenças, principalmente o “mal-das-sete-voltas” (*C. gloeosporioides* f.sp.*cepae*) e “raiz rosada” (*Pyrenochaeta terrestris*), da área onde são produzidos para o local do seu plantio, por isso a sua produção em condições isentas de patógeno é fundamental.



Figura 1. Sintomas induzidos por *Colletotrichum gloeosporioides* em

A = folhas e B = Bulbos.

Assunção *et al.* (1999) estudaram a reação de cultivares de cebola a isolados de *C. gloeosporioides* provenientes de diferentes regiões produtoras de cebola no Submédio São Francisco e verificaram que não foi possível diferenciar os isolados de *C. gloeosporioides* em espécie, uma vez que não se observou interação diferencial significativa entre isolados e cultivares.

Além da cebola, *C. gloeosporioides* é patogênico ao cajueiro (*Anacardium occidentale*), sendo a doença mais importante da cultura, podendo ocorrer em qualquer fase de desenvolvimento da planta. No Nordeste, a doença encontra-se disseminada em todas as áreas de cultivo de cajueiro, sendo bastante severa em épocas mais úmidas e temperatura amenas, ao redor de 25°C (MENEZES, 1997).

Muniz *et al.* (1998) verificaram a patogenicidade de um isolado de *C. gloeosporioides* obtido do cajueiro a algumas plantas frutíferas, e ainda a patogenicidade de *C. gloeosporioides* isolados de diferentes plantas frutíferas, ao cajueiro. Os isolados do cajueiro foram patogênicos apenas aos frutos de acerola (*Citrus* spp) e manga (*Mangifera indica* L), enquanto os isolados do abacate (*Persea americana*), mangaba (*Hancornia speciosa*) e maracujá (*Passiflora* spp) foram patogênicos ao cajueiro (*Anacardium occidentale*).

No abacateiro, o fungo afeta principalmente os frutos, sendo possível encontrá-lo em folhas, frutos e flores (PICCININ & PASCHOLAT, 1997). Provoca também a lesão

floral dos citrus, afetando principalmente flores e frutos recém-formados (FEICHTBERGE *et al.*, 1997). O comportamento de nove isolados de *C. acutatum* e de três de *C. gloeosporioides* foram estudados por Góes & Kimati (1997), que inocularam em flores de laranja pêra (*Citrus* spp), sob condições de casa de vegetação, e verificaram patogenicidade de todos os isolados de *C. acutatum* e de dois dos três isolados de *C. gloeosporioides*

No mamoeiro, é considerada a principal doença pós-colheita, provocando lesões circulares, deprimidas, com margem marrom-clara, produzindo na porção central massas de esporos de cor laranja (REZENDE & FACELLI, 1997). No maracujazeiro, a antracnose é encontrada em todas as regiões produtoras no Brasil. As doenças causadas por *C. gloeosporioides* têm grande importância pelo ataque à parte aérea das plantas em qualquer idade, sendo difícil o controle devido às condições climáticas favoráveis (PIO-RIBEIRO & MARIANO, 1997).

Alguns estudos sobre a variação na patogenicidade do *C. gloeosporioides* têm sido realizados. Mitidieri (1973) relatou que este fungo isolado da alfavaca (*Medicago sativa*) causou sintomas de podridão em frutos do melão (*Cucumis melo*) e do tomate (*Lycopersicon esculentum.*), maçã (*Malu* sp), pimentão (*Capsicum annuum*), laranja (*Citrus* spp), além do seu hospedeiro de origem. Café & Filho (1986) constatou que *C. gloeosporioides* oriundo de umbelas de cenoura (*Daucus carota*) foi capaz de infectar plantas e frutos maduros do tomateiro e pimentão, além da umbela e plântulas de cenoura. Todavia a ocorrência da doença está relacionada às condições climáticas locais, tipo de solo, cultivares plantadas e, principalmente, condições sanitárias sob as quais a cultura é conduzida. As principais medidas de controle da antracnose foliar na cebola são: rotação de cultura; eliminação dos restos de cultivo para reduzir a quantidade inicial de inoculo; uso de sementes sadias ou tratadas; bulbilhos tratados; adubação balanceada sem excesso de nitrogênio (ASSUNÇÃO, 1997); secagem rápida dos bulbos após a colheita; armazenamento em locais arejados e ventilados; aplicação de fungicidas sistêmicos (ZAMBOLIM & JACCOUD FILHO, 2000), entre outras.

2.3 FERRAMENTAS MOLECULARES NO ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Colletotrichum gloeosporioides*.

A identificação e caracterização dos fungos são os primeiros passos para seu estudo. Tradicionalmente a identificação é baseada em características morfológicas, entretanto esta leva a controvérsias quanto à identificação de diversas espécies, além de não ser

suficientemente acurada para separar indivíduos ao nível subespecífico. Técnicas moleculares são ferramentas poderosas e têm sido de grande utilidade como auxílio na taxonomia e na caracterização de fungos (LEA-BETIOL, 1998). Dessa forma, a técnica da reação de polimerase em cadeia (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) foi concebida por Kary Mullis em meados da década de 80. A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da PCR a torna particularmente poderosa para estudos genéticos moleculares envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo vivo (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). A PCR revolucionou várias áreas da biologia, incluindo a sistemática e a caracterização de linhagens, possibilitando a obtenção de respostas previamente não possíveis. Pode ser utilizada para a amplificação de genes específicos, assim como para a amplificação de segmentos anônimos do genoma. Métodos baseados na PCR já foram utilizados na micologia, e novos métodos recém descritos têm potencial para auxiliar ainda mais os estudos de taxonomia e genética de população de fungos (LEA-BERTIOL, 1998).

Uma fita de DNA é usada como molde para a síntese de novas cadeias complementares, sob a ação da enzima polimerase dependente de DNA, capaz de adicionar os nucleotídeos presentes na reação. A DNA polimerase requer, entretanto, um ponto de início ligado à fita molde que servirá de apoio para que os nucleotídeos subsequentes sejam adicionados. Esse ponto de início da síntese é fornecido por um oligonucleotídeo que se hibridiza à fita molde e é denominado de *primer*. Dessa forma, a região do DNA genômico a ser sintetizada é definida pelos *primers*, que se anelam especificamente às suas seqüências complementares na fita molde, delimitando o fragmento do DNA que se deseja amplificar (FARAH, 2000). A PCR é um método importante para diagnóstico de fungos. Existem vários exemplos de testes baseados em PCR desenvolvidos para detectar fungos em plantas e alimentos em patologia humana. Pode ser utilizada para detectar grupos de linhagens, espécies ou taxa superiores (FUNGARO, 2000).

Ferreira & Grattapaglia (1998) relatam que um método bastante útil, derivado da PCR, é a técnica de RAPD que envolve amplificação simultânea de vários locis anônimos no genoma, utilizando *primers* de seqüência arbitrária. A técnica de RAPD permite avaliar a diversidade genética entre isolados de uma espécie, bem como, determinar a especificidade ao hospedeiro dentro da mesma espécie (ASSUNÇÃO, 1997). Essa técnica foi utilizada por Barbosa (2001) que comparou perfis de RAPD de isolados de *C. graminicola* do sorgo e do milho de diferentes regiões do Brasil, e constatou que não havia relação entre agrupamento genético e distribuição geográfica.

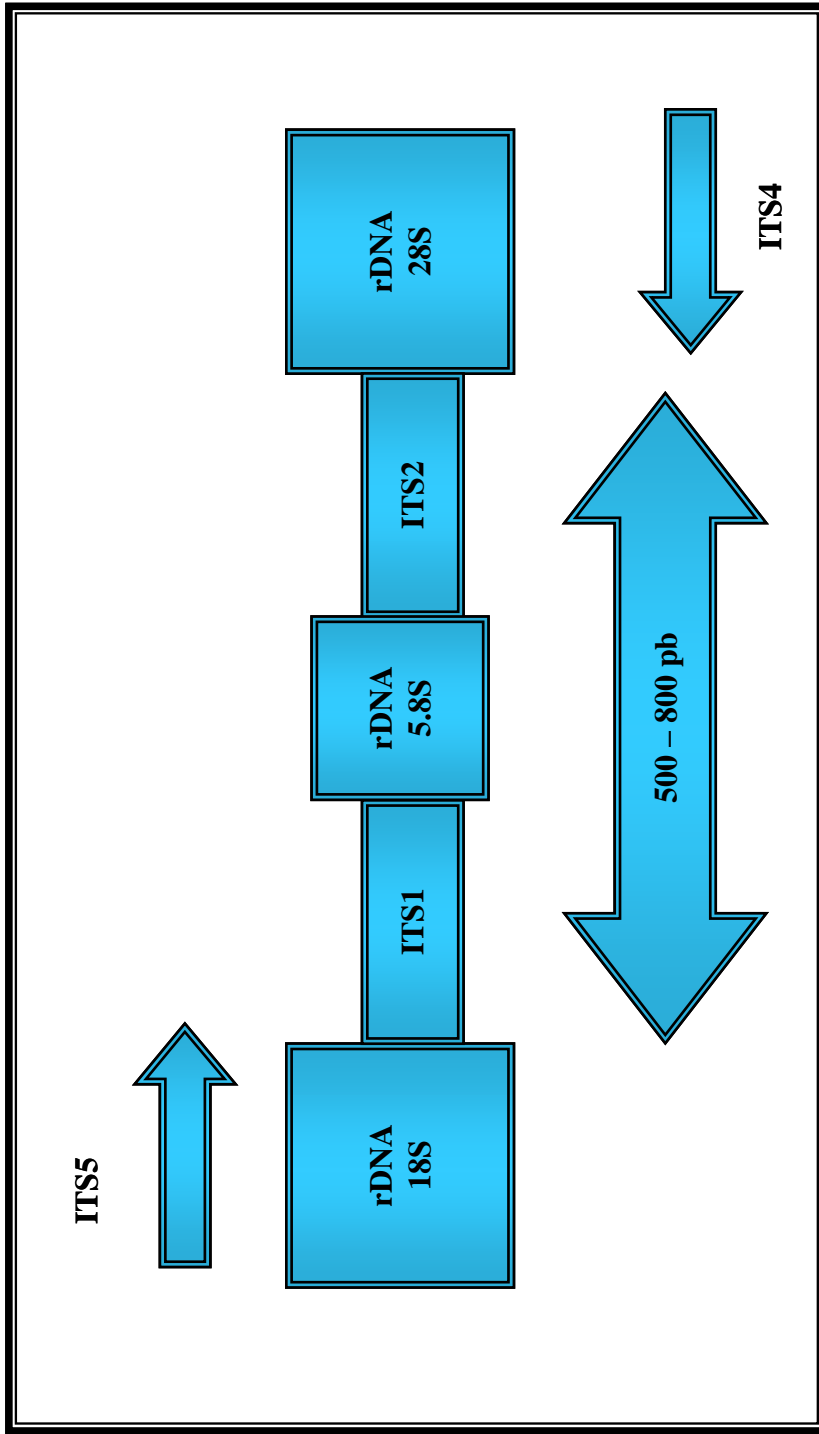
Por outro lado, Swart (1999) analisou isolados de *C. gloeosporioides* de abacate, manga e citrus por RAPD, e distinguiu os isolados de acordo com os hospedeiros. Constatou que houve relação entre o grau de agressividade dos isolados com o resultado do RAPD. O autor verificou que os *primers* OPA02, OPC08 e OPB14 possibilitaram a distinção entre os isolados da manga e citrus, mas o OPB12 foi o que permitiu a distinção dos isolados de citrus dos demais. Também relatou que os perfis dos isolados de manga e abacate foram semelhantes. Com a mesma finalidade Assunção (1997) estudou a diversidade genética de seis isolados do *C. gloeosporioides* da cebola, procedentes de Juazeiro-BA, pela técnica RAPD, e verificou a formação de três grupos distintos, sendo que o isolado menos agressivo formou um grupo isolado dos demais.

Silva-Mann *et al.* (2002) utilizaram o RAPD para verificar a variabilidade genética de isolados de *C. gossypii* e *C. gossypii var. cephaelosporioides* e o valor de similaridade foi 51,7%, confirmando a potencialidade da técnica para diferenciar as espécies.

Assis (2001) visou obter informações sobre a variabilidade genética de seis linhagens de *C. gloeosporioides* isolados da manga rosa e manga espada, adquiridas em diferentes locais da cidade de Recife-PE por meio de RAPD, e verificou que houve um alto grau de homologia entre as seis linhagens pela presença de bandas de DNA em comum, constatando que duas linhagens obtidas de variedades diferentes eram geneticamente mais próximas que as demais.

A PCR também pode ser utilizada para a análise da região ITS. Os genes são separados por regiões denominadas ITS1 e ITS2, as quais são transcritas e processadas para dar origem ao RNA ribossômico maduro. O cluster gênico que codifica para rRNA aparece repetido centenas de vezes no genoma fúngico (FUNGARO, 2000). Dessa maneira, essa técnica pode ser usada para identificar a maioria dos fungos ao nível de espécie ou grupo de espécies. É baseada na região do espaço interno transcrito da unidade nuclear ribossomal. Essa região está entre os genes 18s e 28s do RNA ribossomal e contém dois espaços não codificados variáveis e o gene 5.8s do RNA ribossomal (Figura 2). A amplificação da região, digestão com enzimas de restrição e separação eletroforética dos fragmentos é rápida, simples, relativamente barata e facilmente adaptável para novos grupos de fungos (GARDES & BRUNS, 1996). Assim sendo, muitos trabalhos tem surgidos. E com essa finalidade a diversidade genética inter e intraespecíficas de *Colletotrichum* tem sido bastante estudada. Alahakoon *et al.* (1994) utilizaram as técnicas de RFLP do DNA ribossômico (rDNA), mitocondrial

(mtDNA) e RAPD para o agrupamento genético de vinte e um isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de sete fruteiras tropicais. Verificaram a variação ao nível de preferência pelo hospedeiro, em função do isolado e susceptibilidade do mesmo. As análises moleculares mostraram que alguns isolados apresentaram o mesmo padrão de restrição de rDNA e um baixo grau de polimorfismo quanto ao mtDNA quando digeridos com as enzimas de restrição *EcoR* I e *Cla* I. Marcadores RAPD foram capazes de confirmar o agrupamento por hospedeiro de 21 das linhagens. Enquanto Sherriff *et al.* (1994) distinguiram, pela seqüência de rDNA, as espécies causadoras de antracnose em milho e sorgo, este último sendo caracterizado como *C. sublineolum*. Já Freeman *et al.* (1998) utilizaram *primers* aleatórios derivados de minissatélites, conseguindo discriminar espécies de *Colletotrichum* e diferenciar isolados de *C. gloeosporioides* de amendoeira pelo padrão de bandas. Estudos de seqüências de partes do rDNA também podem ser feitos para determinar as correlações filogenéticas (LEA-BERTIOL 1998). Exemplos disso são a alta homologia de *Athelia bamocina*, *Aureobasidium pullulans* e *C. gloeosporioides* revelados pelo sequenciamento da região 5.8 do rDNA.



3. MATERIAL E MÉTODOS

Fonte de elaboração própria

Figura 2. A estrutura do agregado gênico com representação das regiões ITS 1, 2 e a subunidade 5.8s do rDNA com primers ITS1 e ITS4.

3.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS

Dos quinze isolados de *C. gloeosporioides* utilizados, onze foram obtidos da Coleção de Cultura da Micoteca-URM (Universidade de Recife Micologia) (CAVALCANTI *et al.*, 1996) do Departamento de Micologia, do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco e quatro foram isolados de plantas da cebola.

Tabela 1. Origem das amostras de *Colletotrichum gloeosporioides* depositadas na Micoteca URM, Recife, PE, Brasil.

Nº de acesso	Origem	Substrato ou hospedeiro	Ano/isolamento
4626	Brejão/PE	Pedúnculo da planta de cebola (<i>Allium cepa</i>)	2002
4627	Vale São Francisco/PE	Folha da planta de cebola	2002
4628	Brejão/PE	Inflorescência da planta de cebola	2002
4629	Petrolina/PE	Folha da planta de cebola	2002
2018	IPA/PE	<i>Allium</i> sp	1954
2543	Amazonas	Chuchu (<i>Sechium edule</i>)	1980
2547	IPA/PE	Goiaba (<i>Psidium guajava</i>)	1980
2334	IPA/PE	Romã (<i>Punica granatum</i>)	1972
2335	IPA/PE	Goiaba (<i>Psidium guajava</i>)	1970
2336	IPA/PE	Pitanga (<i>Eugenia uniflora</i>)	1972
3923	IPA/PE	Água do Rio Capibaribe	1977
3882	IPA/PE	Maracujá (<i>Passiflora</i> sp)	1977
2986	IPA/PE	Solo marinho	1977
2681	IPA/PE	<i>Passiflora</i> sp	1977
2060	IPA/PE	Coco (<i>Cocus nucifera</i>)	1977

Os isolados *C. gloeosporioides* foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA /OXOID), permanecendo a 25°C por 15 dias e em seguida, sob refrigeração a 4°C.

3.2 ISOLAMENTO DE *C. gloeosporioides* DE PEDÚNCULOS, FOLHAS E INFLORESCÊNCIAS DAS PLANTAS DE CEBOLA.

Plantas de cebola foram coletadas na Estação Experimental do IPA (Empresa de Pernambucana de Pesquisa Agropecuária), localizada em Brejão, Agreste Meridional, onde há produção de sementes básicas de cebola com incidência de *C. gloeosporioides* no pedúnculo, folhas e na inflorescência. O material foi desinfestado superficialmente com hipoclorito de sódio a 15% por cinco minutos e em seguida lavado em água destilada autoclavada. Com auxílio de um estilete flambado foram retirados pequenos fragmentos das margens das lesões e transferidos para placas de Petri contendo papel absorvente previamente autoclavadas por 15min a 120°C, distribuídos de forma equidistante na superfície da placa. Em seguida as placas foram incubadas, em condições de temperatura e luminosidade adequadas. Após o crescimento do fungo, as estruturas do organismo foram transferidas para placa de Petri ou tubo de ensaio contendo meio BDA.

3.3 TESTE DE PATOGENICIDADE DOS ISOLADOS DE *C. gloeosporioides* EM CEBOLA.

3.3.1 Preparo do Inóculo

Para o preparo do inóculo, em câmara de fluxo laminar, foram utilizados esporos formados a partir de culturas de *C. gloeosporioides*, incubadas por 7 dias a 28^o C em placas de Petri contendo BDA. A essas placas foram adicionados 20 ml de água destilada autoclavada e com auxílio de uma escova de cerdas macias, foi removida a parte superficial da colônia para a liberação dos conídios. A suspensão foi filtrada em gaze dupla autoclavada para a obtenção de uma suspensão de conídios, quantificada com auxílio de câmara de Neubauer, e realizadas diluições a fim de se obter uma concentração de 10⁶ conídios/ml.

3.3.2 Inoculação nas folhas de cebola

Plantas de cebola da cultivar Texas Early Grano 502 foram utilizadas como padrão de suscetibilidade e cultivadas em solo previamente esterilizado com Brometo de Metila (CH3 BR) em vasos plásticos, em condições de casa-de-vegetação.

Vinte dias após o plantio foi realizado o desbaste das plantas deixando-se apenas seis plantas por vaso, que após 60 dias da germinação das sementes, quando apresentavam a terceira folha verdadeira, foram inoculadas por pulverização das folhas com uma suspensão de 10^6 conídios/ml de cada isolado de *C. gloeosporioides*. As plantas foram pulverizadas com cerca de 2,5 ml da suspensão e todos os vasos foram mantidos em câmara úmida por 24 horas, formada pela utilização de sacos plásticos transparentes. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, cada uma com seis plantas. As testemunhas consistiram de plantas tratadas de forma idêntica, utilizando-se apenas água destilada autoclavada sem o inóculo

3.3.3 Avaliação da patogenicidade dos isolados de *C. gloeosporioides* em folhas de cebola.

A patogenicidade foi avaliada verificando-se o aparecimento dos sintomas típicos da antracnose nas folhas das plantas a partir do terceiro, sexto, nono e décimo segundo dia após a inoculação, procedendo-se o reisolamento do patógeno.

A severidade da doença foi estimada mediante escala de notas, variando de 0 a 4 (Tabela 2) (Figura 3) conforme descrito por Michereff (2000) e Assunção (1997)

Tabela 2. Escala de notas utilizada na avaliação da patogenicidade de

Colletotrichum gloeosporioides em plantas de cebola.

NOTAS	SINTOMAS
0	Ausência de sintomas
1	Uma folha com sintomas e sinais
2	Duas folhas com sintomas e sinais
3	Três folhas com sintomas e sinais
4	Tombamento e morte da planta

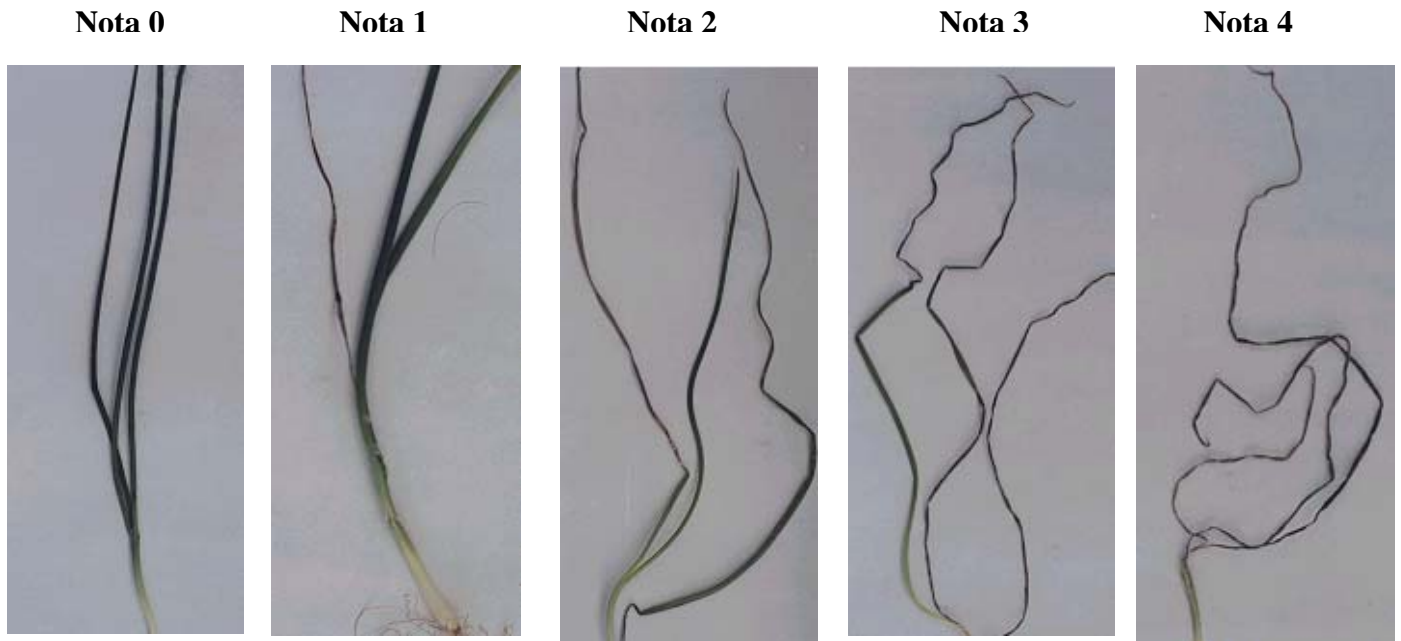


Figura 03. Escala de notas utilizada na identificação da patogenicidade de *Colletotrichum gloeosporioides* à cebola (Michereff, 2000).

3.3.4 Inoculação nos bulbos de cebola

Os bulbos foram inicialmente lavados com água e sabão, desinfestados em uma solução de hipoclorito de sódio a 15% durante 5 minutos, lavados 2 vezes com água destilada autoclavada e colocados em papel toalha para secagem.

Discos de micélio-ágar com 5mm de diâmetro foram retirados das colônias de *C. gloeosporioides* com quatro dias de crescimento e transferidos para a superfície do bulbo de cebola e aderidos com uma fita adesiva. As testemunhas consistiram de bulbos tratados de forma idêntica, utilizando-se apenas discos de ágar sem o inóculo. Em seguida, os bulbos foram mantidos em câmara-úmida utilizando-se para isso sacos plásticos previamente umedecidos com água destilada autoclavada, por 24 horas, à luz e temperatura ambientes. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com dez repetições para cada isolado.

3.3.5 Avaliação da patogenicidade dos isolados de *C. gloeosporioides* em bulbos de cebola.

A patogenicidade foi avaliada pelo aparecimento de sintomas típicos da antracnose nos bulbos de cebola, 24 horas após a inoculação do fitopatógeno, com o reisolamento do mesmo. A severidade da doença foi estimada mediante escala de notas que variou de 0 a 4 como descrito em Lima (1996), adaptada ao presente experimento (Tabela 3 e Figura 4).

Tabela 3. Escala de notas utilizada para avaliar a patogenicidade de 15 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em bulbos de cebola.

Nota	Comportamento	Classificação dos isolados
0	Ausência de sintomas	Não patogênico
1	Lesões de 1 a 5mm	Fracamente patogênico
2	Lesões de 6 a 15mm	Medianamente patogênico
3	Lesões de 16 a 25mm	Patogênico
4	Lesões acima de 25mm	Altamente patogênico

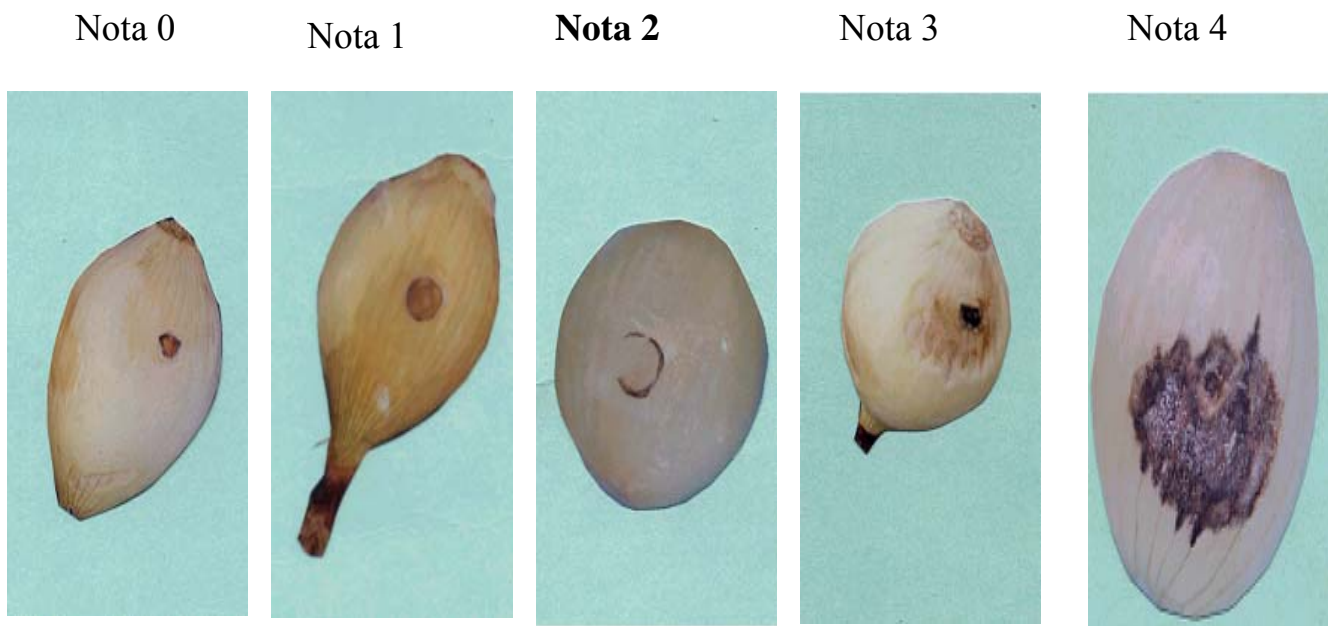


Figura 4. Ilustração da escala de notas em teste de patogenicidade de *Colletotrichum gloeosporioides* a bulbos de cebola (Lima, 1996)

3.3.6 Análise Estatística

Os dados obtidos nos tratamentos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa SANEST (MACKINNEY, 1923).

3.4 ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA PELOS MARCADORES MOLECULARES RAPD E REGIÃO ITS DO DNA RIBOSSOMAL.

3.4.1 Obtenção de micélio para extração do DNA.

Conídios de *C. gloeosporioides* foram suspensos em 3 ml de solução Tween 80 0,1% (v/v) em tubos de ensaio e transferidos para frascos Erlenmeyer, contendo 100 ml de meio Czapeck líquido. Após a inoculação, estes frascos foram mantidos sob agitação a 120 rpm/28°C/96 horas para crescimento do fungo. Em seguida, o micélio foi coletado por filtração, lavado em água destilada autoclavada, determinada a massa úmida e estocado a -20°C até o momento de uso para extração de DNA.

3.4.2 Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico a partir do micélio de *C. gloeosporioides* foi realizada conforme a técnica descrita por Raeder e Broda (1985).

O micélio foi coletado por filtração a vácuo. Após a remoção do excesso de água, um grama de micélio foi triturado com nitrogênio líquido até formar um pó, o qual foi transferido imediatamente para um tubo de microcentrifuga onde se adicionou 800 µl de tampão de extração (Tris-HCl 200mM pH 8.0; NaCl 250mM; EDTA 25mM; Dodecil Sulfato de Sódio 1%). Após homogeneização, os tubos de microcentrifuga foram incubados por 15 minutos a 65 °C. Posteriormente, adicionou-se um volume da solução de fenol saturado (Invitrogen Life Technologies), misturando-se suavemente as fases e centrifugando-se a 400 rpm, por 15 minutos. A fase aquosa foi recuperada, transferida para novo tubo de microcentrifuga e adicionado um volume de solução de clorofane (fenol e clorofil na proporção de 1:1). Mais uma vez procedeu-se à homogeneização e centrifugação na mesma condição anterior. O sobrenadante foi recuperado, colocado em outro tubo de Eppendorf ao qual adicionou-se um volume de clorofil (clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1) procedendo-se

novamente à homogeneização e centrifugação. O sobrenadante foi recuperado e colocado em outro Eppendorf, acrescentando-se NaCl 0,3M e dois volumes de etanol absoluto resfriado a -20°C. Nessa fase foi possível visualizar o DNA precipitado. As amostras foram novamente submetidas à centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos para que o DNA se fixasse no fundo do tubo de microcentrifuga. Após a centrifugação descartou-se o sobrenadante, e lavou-se o precipitado obtido com etanol 70% e centrifugou-se. Em seguida o sobrenadante foi desprezado e os tubos foram invertidos até secagem completa do DNA. Este, então, foi ressuspensionado cuidadosamente com 200 µl de tampão TE pH 8,0 (Tris-HCl 1M e EDTA 0,5M).

3.4.3 Quantificação do DNA genômico

A concentração de DNA foi estimada por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8% a 3V/cm⁻¹ de distância entre os eletrodos com o tampão de corrida TBE (Trizma-base 108g; ácido bórico 55g; EDTA 0,5M pH 8,0, 20 ml), por comparação com o marcador de peso molecular DNA de fago λ. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (TBE 1X / EtBr 0,5 µg/ml) (SAMBROOK *et al.*, 1989) durante 30 minutos, observado em transiluminador de luz ultravioleta e fotografado usando filme preto e branco Polaróide 667.

3.4.4 Técnica de RAPD (WILLIAMS *et al.*, 1990)

3.4.5 Seleção dos *Primers*

Trinta e nove *primers* arbitrários da Operon Technologies, provenientes dos kits OPW, OPA e OPX foram testados com o DNA total do isolado 2336 de *C. gloeosporioides* para avaliar a capacidade de amplificação de cada um deles.

As regiões do DNA foram amplificadas aleatoriamente pela técnica de RAPD, utilizando-se um termociclador (MJ Research). As reações de amplificação foram procedidas num volume final de 25µl, composto da seguinte maneira: tampão Tris-HCl, 20mM pH 8.4; KCl, 50mM; MgCl₂ 3, 4mM; dNTP, 0.25mM; 0,4mM do *primer*; *Taq* DNA polimerase 2U (Operon Technologies, CA) e 25 ng de DNA de cada isolado, separadamente. Os ciclos de amplificação consistiram de uma etapa de desnaturação inicial a 5 minutos a 92°C seguidos por 40 ciclos de 1 minuto a 92°C, 1 minuto e 30

segundos a 39°C e 2 minutos a 72°C, seguidos por uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

Em seguida, os produtos de amplificação foram submetidos à migração eletroforética em gel de agarose 1,4%, a 3 V/cm⁻¹ de distância entre os eletrodos em tampão de corrida 1X TBE pH 8,0, utilizando-se o marcador de peso molecular DNA de fago λ clivado com *Hind*III (Invitrogen Life Technologies). O gel foi corado em solução de brometo de etídio por 30 minutos, visualizado em transiluminador de luz ultravioleta e fotografado, usando filme preto e branco Polaróide 667

3.4.6 Região de ITS do DNA ribossomal (WHITE *et al.*, 1990)

3.4.7 Amplificação de DNA da região ITS do rDNA

Para a amplificação do DNA das regiões ITS1, ITS2 e subunidade 5.8S do rDNA foram utilizados os *primers* ITS 1 (5' - TCC GTA GGT GAA CCT CCG - 3') e ITS 4 (5' - TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3'). Para um volume final de reação de 25 µl foi utilizado tampão (Tris-HCl 20mM pH 8.4; KCl) 50mM; MgCl₂, 1,5mM; dNTP, 0,2mM; 12.5 pmols do *primer*; *Taq* DNA polimerase, 1,25 U (Operon Technologies CA) e 50 ng de DNA. As regiões de ITS- rDNA foram amplificadas utilizando-se um termociclador (MJ Research), programado para realizar uma desnaturação inicial de 4 minutos a 95°C, 40 ciclos de 1 minuto a 92°C, 1 minuto a 55°C e 2 minutos a 72 °C e finalmente, 5 minutos a 72° C para extensão final.

Os produtos de amplificação dos locis ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 1 %, a 3 V/cm⁻¹ em tampão de corrida 1X TBE (pH 8,0), utilizando-se o marcador de peso molecular de 100-bp (Invitrogen Life Technologies), corado em solução de brometo de etídio por 30 minutos, visualizado em transiluminador de luz ultravioleta e fotografado com câmera Polaróide.

3.4.8 Digestão enzimática dos produtos de amplificação das regiões ITS1-5.8S-ITS2 DO rDNA

A digestão enzimática foi realizada pela mistura de 4µl dos produtos de amplificação das regiões ITS do rDNA com 16 µl do mix de restrição contendo 0,1U da enzima de restrição em tampão de restrição específico. Após a incubação de 2 horas à 37° C com cada uma das três enzimas de restrição *Dra*I, *Hae*III e *Msp*I (Invitrogen Life Technologies), separadamente, os fragmentos resultantes foram separados por

eletroforese em gel de agarose 1,4 %, utilizando-se o marcador de peso molecular de 100-bp (Invitrogen Life Technologies), a 3 V/cm⁻¹ de distância entre os eletrodos, imerso em tampão de corrida 1X TBE (pH 8,0). Os fragmentos de restrição foram corados em solução de brometo de etídio por 30 minutos, visualizados em transiluminador de luz UV e fotografados com câmera Polaróide.

3.4.9 Análise computacional dos dados

Os dados obtidos foram analisados pelo programa Numerical Taxonomy System de Multivariate Programs - NTSYS-PC (ROHLF, 1988; BUSSAB *et al.*, 1990), tendo sido introduzidos na forma de variáveis binárias, ou seja, o número 1 (um) para presença de banda e número 0 (zero), ausência. Dessa forma, o programa construiu uma matriz de similaridade, utilizando-se neste trabalho o coeficiente de JACCARD. A partir dos resultados foi gerado um dendrograma pelo método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetical Average).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ISOLAMENTO DE *C gloeosporioides* DE PEDÚNCULO, FOLHA E INFLORESCÊNCIA DA PLANTA DA CEBOLA.

Foram obtidos dois isolados da Estação Experimental do IPA (Empresa de Pernambucana de Pesquisa Agropecuária), localizada em Brejão, Agreste Meridional e um isolado do Vale de São Francisco, o isolado 4629 foi cedido pela EMBRAPA; em seguida todos os isolados foram depositados na Micoteca URM-Recife, PE Brasil.

Tabela 4. Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*

Nº de acesso	Substrato	Origem	Ano
4627	Folha	Vale de São Francisco	Dez/2002
4628	Inflorescência	Brejão	Out/2002
4626	Pedúnculo	Brejão	Dez/2002
4629	Folha	EMBRAPA.	Dez/2002

4.2 TESTES DE PATOGENICIDADE EM FOLHAS E EM BULBOS DA PLANTA DE CEBOLA.

4.2.1 Patogenicidade em folhas da planta de cebola

Durante o experimento a temperatura mínima variou de 22 – 28°C, a máxima variou de 30 – 38°C, a umidade relativa mínima variou de 34 – 67% e a máxima de 82 – 87%. No dia da inoculação a temperatura variou de 22 – 37°C e a umidade relativa de 45 – 86%.

Os primeiros sintomas da antracnose na cultivar susceptível Texas Grano 502, surgiram no segundo dia após a inoculação, inicialmente ocorrendo sob forma de lesões levemente deprimidas, depois mudanças na cor das folhas e lesões dispostas em anéis concêntricos sobre as quais desenvolveram-se os acérvulos cobertos por massas de conídios do patógeno. Na última avaliação foi possível observar a seca das folhas e morte das plantas (Figura. 5).



Figura 5. Morte da planta de cebola após oito dias de inoculação do isolado 4627 de *Colletotrichum gloeosporioides*, à esquerda e o controle ao lado direita

Durante a avaliação das plântulas inoculadas em casa de vegetação verificou-se o alongamento das folhas. Segundo Assunção (1997) estes sintomas são comumente

observados em campo de produção e não em casa-de-vegetação. A Figura 3 ilustra a escala de notas utilizadas neste trabalho.

Os resultados obtidos segundo a escala de notas encontram-se na Tabela 4 baseado em Mackinney (1923). De um modo geral todos os isolados de *C. gloeosporioides* mostraram-se patogênicos, variando no entanto quanto ao grau de patogenicidade. Analisando-se a severidade das interações, foram definidos quatro grupos com diferenças significantes ao nível de patogenicidade. O primeiro grupo formado por um único isolado o 4627 (Folha da cebola/Vale do Rio São Francisco-PE) com 100% de índice de doença. O segundo grupo é formado por quatro isolados que se relacionam entre si e com terceiro grupo, que são 4626 (pedúnculo / Brejão), 4629 (folha da cebola/ Petrolina-PE), 4628 (inflorescência da cebola/Brejão-PE) e 2543 (*Sechium edule*/AM) com índices de doença de 42,25%, 34,33%, 28,81% e 14,7% respectivamente. O terceiro grupo é formado por quatro isolados que se relacionam com o segundo grupo e não se relacionam com o quarto grupo, são: 2980 (solo marinho-PE), 2018 (*Allium sp*-PE), 2335 (*Psidium guajava*/PE) e 2334 (*Punica granatum*/PE), com índice de doença de 14,24%, 12,25%, 11,13% e 9,10% respectivamente. O quarto grupo é formado por seis isolados que apresentaram os menores índices de doença, 2336 (*Eugenia uniflora*/PE), 2547 (*Psidium guajava*/PE), 3923 (água do rio Capibaribe-PE), 3882 (*Passiflora sp*/PE) 2681 (*Passiflora sp* /PE) e 2060 (*Cocos nucifera*/PE) com índices de doença de 7,39%, 6,41% 5,85%, 5,22%, 3,78% e 2,68%, respectivamente.

4.2.2 Patogenicidade ao bulbo da planta de cebola

O experimento foi realizado em temperatura ambiente, em laboratório. Entre os quinze isolados de *C. gloeosporioides* somente os isolados de cebola (4627,4629,4628 e 4626) foram patogênicos ao bulbo, e dos cinco isolados de cebola quatro foram altamente patogênicos.

Os resultados foram baseados na escala de notas ilustrada na Figura 4 em material e métodos. Os dados das Tabelas 5 e 6 mostram o índice de doença e do diâmetro das lesões causadas pelos quatro isolados de *C. gloeosporioides*, respectivamente.

Analisando-se a severidade das interações, foram definidos dois grupos com diferenças significativas ao nível de patogenicidade. O primeiro grupo é formado por três isolados, 4627 (Folha da cebola/Vale do Rio São Francisco-PE), 4629 (folha da

cebola/Petrolina-PE) e 4628 (inflorescência da cebola/Brejão-PE) com índices de doença de 95,83%, 91,67% e 91,67% respectivamente. O segundo grupo é formado por um único isolado o 4626 (pedúnculo/Brejão-PE) com 72,92% de índice da doença.

4.2.3 Comparação dos testes de patogenicidade de folhas e bulbos de cebola

No teste em folha de cebola todos os quinze isolados, independentemente do hospedeiro e de onde foram obtidos, foram patogênicos, com diferenças no índice de doença, sendo que dos cinco isolados obtidos de cebola, quatro foram mais patogênicos (4627-folha, 4626-pedúnculo, 4629-folha e 4628- inflorescência). No teste em bulbos de cebola, dos quinze isolados, apenas os isolados mais agressivos no teste em folhas, citado acima, foram patogênicos, havendo especificidade dos isolados de cebola ao hospedeiro. Fernandes *et al.* (1995) também trabalharam com isolados de *C. gloeosporioides* de diferentes hospedeiros (pimentão, berinjela e jiló) e verificaram que os isolados de jiló e berinjela foram patogênicos a ambos os hospedeiros, porém com baixo índice para o pimentão enquanto que os do pimentão não provocaram sintomas visíveis nas plântulas de jiló. No entanto, 42% das plântulas de berinjela sucumbiram à inoculação com os isolados originários do pimentão. Fernandes *et al.* (2002) estudaram trinta e quatro isolados de *C. gloeosporioides* de diferentes municípios do Rio de Janeiro, obtidos de frutos naturalmente infectados de jiloeiro, pimentão e berinjela, verificando a patogenicidade para as três solanáceas. Inocularam em frutos e em plântulas, os resultados demonstraram especificidade patogênica às solanáceas hospedeiras. Em geral os isolados da berinjela constituíram um grupo similar, caracterizado pela fraca patogenicidade para o pimentão. Os isolados do pimentão foram específicos para seus hospedeiros de origem.

Neste trabalho as plântulas da cebola não receberam ferimento, porém todos os isolados apresentaram patogenicidade. Andrade & Ducroquet (1998) verificaram a patogenicidade de isolados de *C. gloeosporioides* à goiabeira, quando utilizaram três isolados de videira de diferentes locais de Santa Catarina e pulverizaram as hastes e frutos da goiabeira com e sem ferimento. Houve diferenças nos resultados obtidos entre os métodos de inoculação, sendo que a inoculação com ferimento no ápice e a inoculação na planta inteira, com e sem ferimento foram os tratamentos que apresentaram níveis de doenças superiores, enquanto que nos frutos não houve resultados satisfatórios.

Os isolados de diferentes locais de Pernambuco, diferentes hospedeiros e de diferentes órgãos da planta de cebola, foram patogênicos às plântulas de cebola. Furtado *et al.* (1999) estudaram a patogenicidade de *C. gloeosporioides* obtidos da folha de seringueira de SP/MG/MA e das haste florais da seringueira de SP/MG e inoculando em plântulas da seringueira. Todos os isolados de folha e haste florais de São Paulo e Minas Gerais foram patogênicos, mas os isolados de folha de Manaus não foram patogênicos às plântulas da seringueira, diferindo dos resultados encontrados nesse trabalho.

Os resultados sugerem que os dois tipos de teste de patogenicidade de *C. gloeosporioides* à cebola se complementaram, sendo que o teste em folha foi mais adequado para a avaliação quanto efeito na produção da cebola e o teste em bulbo, quanto à qualidade do produto para comercialização.

Tabela 05. Índice de doença causada por isolados de *C. gloeosporioides* em

em plantas de cultivar Texas Early Grano 502 baseado
Mackinney (1923).

Isolado	Índice de Doença (%)
4627	100,00 a
4626	42,27 b
4629	34,33 bc
4628	28,81 bcd
2543	14,70 bcd
2980	14,24 cde
2018	12,25 de
2335	11,13 de
2334	9,10 de
2336	7,39 e
2547	6,41 e
3923	5,85 e
3882	5,22 e
2681	3,78 e
2060	2,68 e

CV = 26,89%

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

Tabela 6. Índice de doença de quatro dos cinco isolados de cebola.

Isolado	Índice de Doença
4627	95.83 a
4629	91.67 a
4628	91.67 a
4626	72.92 b

CV = 5,42%

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 7. Diâmetro das lesões provocadas por diferentes isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em bulbos de cebola, da cultivar Texas Early Grano 502.

Isolados	Repetições/lesão (cm)										Média
4629	3,1	3,5	3,4	3,5	2,72	3,35	2,5	2,3	2,9	2,7	3,00

4627	5,5	3,0	3,0	2,5	3,1	2,8	2,2	3,0	2,8	3,2	3,11
4626	2,1	2,2	3,4	1,5	2,4	1,0	2,9	2,3	1,8	1,8	2,14
4628	2,0	2,6	2,6	2,3	3,1	2,3	3,0	2,7	3,0	3,1	2,67

4.3 ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA PELOS MARCADORES RAPD E REGIÃO ITS DO DNA RIBOSSOMAL.

4.3.1 Extração e quantificação de DNA

A quantificação do DNA extraído dos quinze isolados de *C. gloeosporioides* encontra-se na Figura 6. Todos os isolados deram origem a bandas de alto peso molecular, o que é indicativo de integridade. Foi possível a obtenção de quantidades de DNA variando de 350 a 400ng/μL de DNA

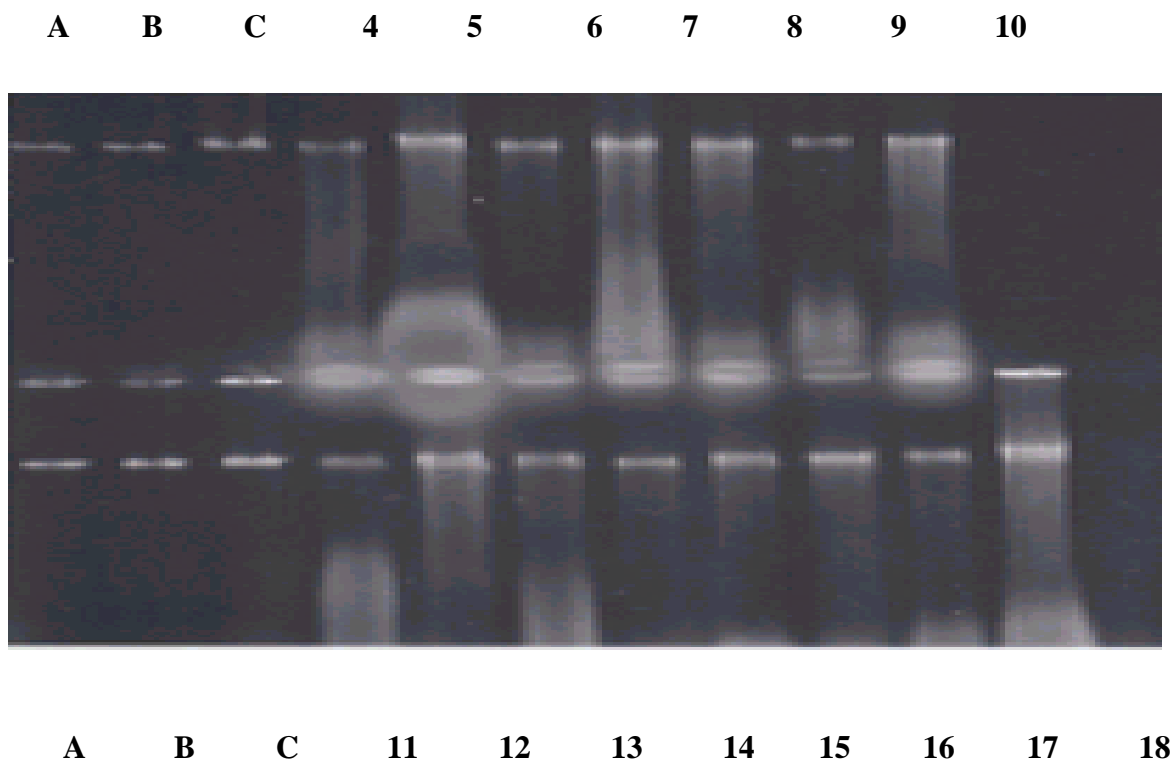


Figura 6 Quantificação de DNA de quinze isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*. Nas pistas A, B e C encontram-se os marcadores moleculares do DNA do fago λ nas concentrações de 10, 15, 25ng/μL respectivamente; nas pistas de 4 a 10 e de 11 a 18 encontram-se o DNA dos isolados, 2980, 4627, 4626, 4628, 2060, 2018, 4629, 2681, 2334, 2335, 2336, 3882, 2543, 2547 e 3923.

4.3.2 Seleção de *primers*

Foram testados 39 *primers* arbitrários da Operon Technologies, provenientes dos kits OPW, OPA e OPX com o DNA total do isolado 2336 como molde. Apenas 22 dos *primers* testados produziram amplificação, porém só sete *primers* exibiram um bom número de fragmentos de DNA com boa nitidez e reprodutibilidade. A Tabela 7 exhibe

o *primers* selecionados e suas seqüências, e as figuras 7, 8 e 9 ilustram os perfis de amplificação do isolado 2336 de *C. gloeosporioides*, com os *primers* OPA 2, OPA 3, OPW 8, OPW 17, OPW 20, OPX 4 e OPX 13, respectivamente.

Tabela 8. *Primers* selecionados para o RAPD e respectivas seqüências de nucleotídeos

<i>Primers</i>	Seqüência
OPA 2	TGCCGAGCTG
OPA 3	AGTCAGCCAC
OPW 8	GACTGCCTCT
OPW 17	GTCCTGGGTT
OPW 20	TGTGGCAGCA
OPX 4	CCGCTACCGA
OPX 13	ACGGGAGCAA

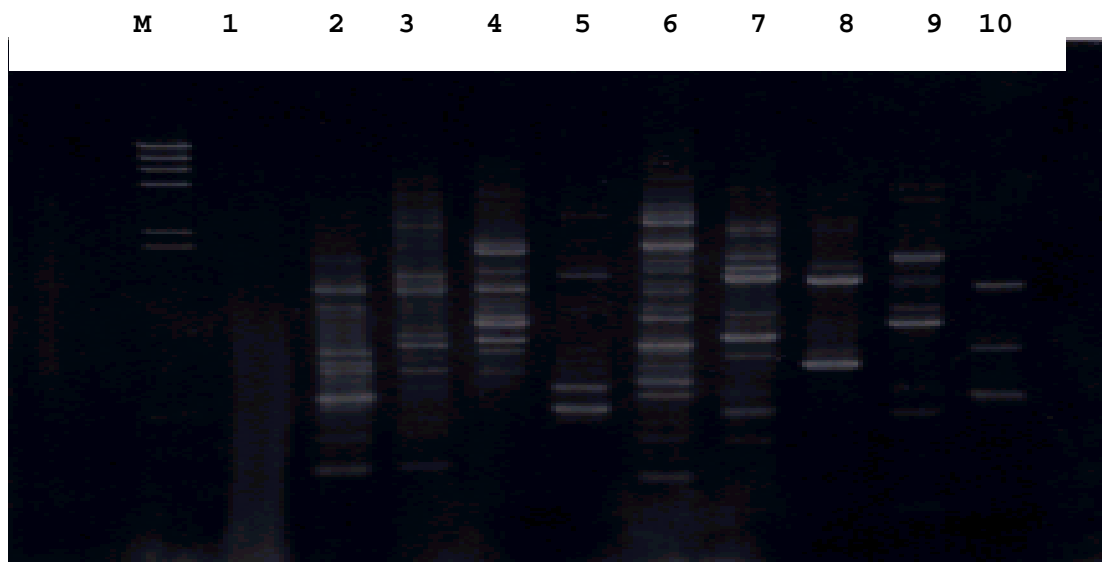


Figura 7. Seleção de *primers* utilizando o DNA total do isolado 2336 de *Colletotrichum gloeosporioides*. No primeiro poço (M), encontra-se o DNA do fago λ (*Hind III*) e nos poços de 1 a 9 estão: OPA 1, OPA 2, OPA 3, OPA 4, OPA 5, OPA 8, OPA 9, OPA 10, OPA 11 e OPA 12.

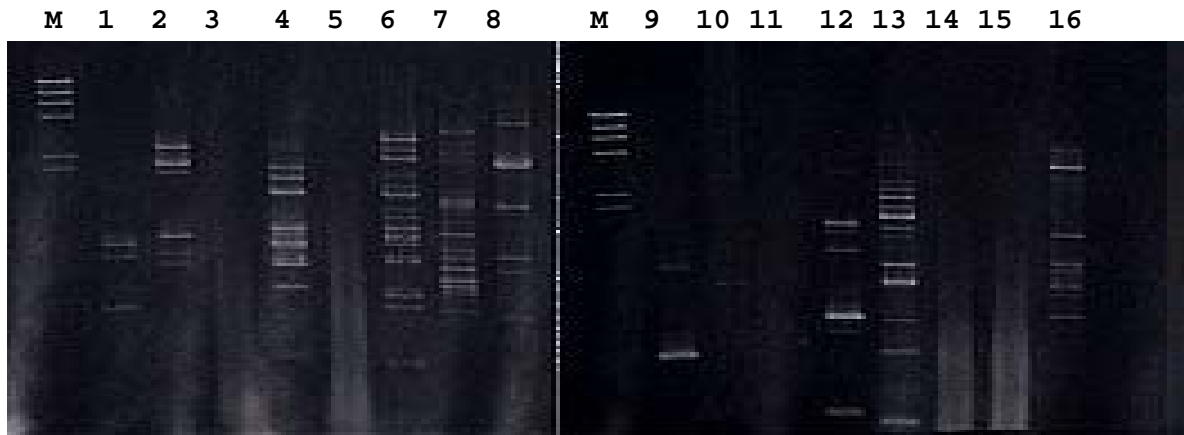


Figura 8. Seleção de *primers* utilizando o DNA total do isolado 2336 de *Colletotrichum gloeosporioides*. No primeiro poço (M) encontra-se o DNA do fago λ (*Hind III*) e nos poços de 1 a 8 estão: OPW 1, OPW 2, OPW 3, OPW 4, OPW 6, OPW 8, OPW 9, OPW 10. Em seguida, no primeiro poço (M), encontra-se o DNA do fago λ (*Hind III*) e nos poços de 9 a 16 estão OPW 13, OPW 14, OPW 15, OPW16, OPW 17, OPW18, OPW 19 e OPW 20.

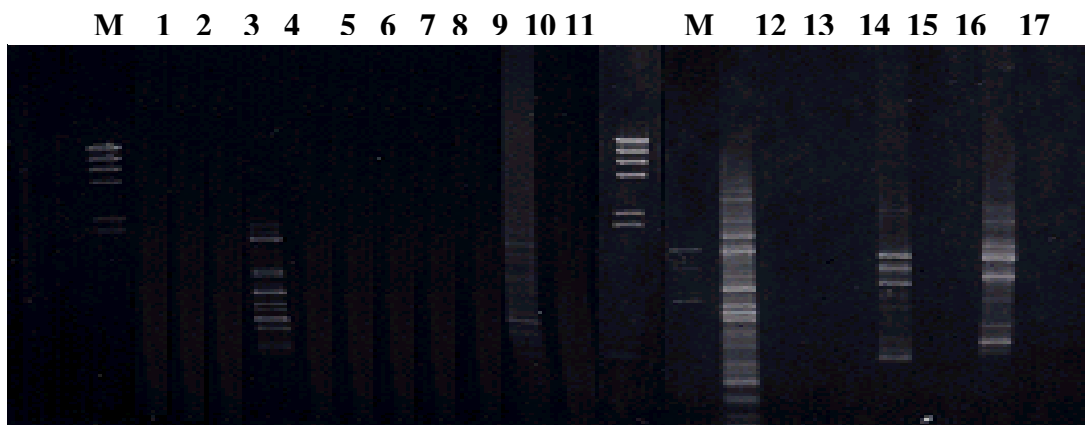


Figura 9. Seleção de *primers* utilizando o DNA total do isolado 2336 de *Colletotrichum gloeosporioides*. No primeiro poço (M) encontra-se o DNA do fago λ (*Hind III*) e nos poços de 1 a 11 estão: OPX 1, OPX 2, OPX 3, OPX 4, OPX 5, OPX 6, OPX 7, OPX 8, OPX 9, OPX 10, OPX 11. Em seguida, no primeiro poço (M), encontra-se o DNA do fago λ (*Hind III*) e nos poços de 12 a 19 estão: OPX 12, OPX13, OPX 14, OPX 15, OPX 16, OPX 17, OPX 18.

4.3.3 Análise dos perfis de RAPD

Os sete *primers* selecionados produziram um total de 730 bandas, sendo 96 geradas pelo *primer* OPW 17, 180 pelo OPW 20, 103 pelo OPW 8, 121 pelo OPA 2, 85 pelo OPA 3, 99 pelo OPX 4 e 146 pelo OPX 13. Os perfis de RAPD obtidos para os quinze isolados, com os *primers* citados são mostrados nas Figuras 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16.

O dendrograma obtido pela análise de agrupamentos com os sete *primers* selecionados (Figura 17) evidenciou uma grande variabilidade molecular, refletida em grande número de agrupamentos, suficientes para discriminar todos os isolados. Segundo Assunção (1997), essa técnica é de grande utilidade na avaliação da variabilidade em espécies do gênero *Colletotrichum*. A alta variabilidade genética de

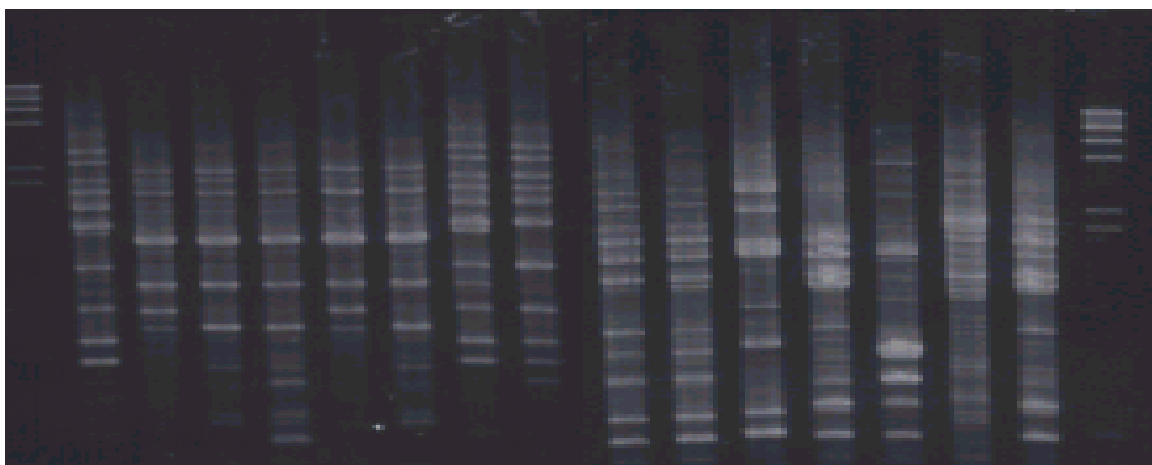
espécies de *Colletotrichum* evidenciada por RAPD foi verificada também por Martinez-Culebras *et al.* (2002) que conseguiram a distinção de 15 isolados de *C. fragariae* e oito de *C. gloeosporioides* do morango.

Quatro grupos distintos foram delineados com cerca de 28% de fragmentos comuns entre eles, havendo coincidência entre a origem geográfica dos isolados. O primeiro grupo é composto por três isolados o 2980 (solo marinho-PE), 4629 (folha da cebola/Petrolina-PE) e 2681 (*Passiflora sp*/PE) com 45% de fragmentos em comum com segundo grupo. O segundo grupo é representado por seis isolados, 2334 (*Punica granatum*/PE), 2335 (*Psidium guajava*/PE), 2336 (*Eugenia uniflora*/PE), 3882 (*Passiflora sp*/PE), 2547 (*Psidium guajava*/PE) e 3923 (Água do Rio Capibaribe/PE) com 38% de fragmentos em comum com o terceiro grupo. O terceiro grupo é formado unicamente pelo isolados 2543 (*Sechium edule*/AM) com 33% de similaridade com o segundo grupo e 28% com o terceiro e o quarto. O quarto grupo é formado por cinco isolados, quatro deles obtidos de plantas de cebola sendo três da mesma localidade (Brejão Alto Sertão Meridional de Pernambuco). O Isolado 4627 (folha da cebola /Vale do Rio São Francisco-PE) apresentou 82% de similaridade com o isolado 4626 (pedúnculo da cebola/Brejão-PE) enquanto os isolados 4628 (inflorescência da cebola/Brejão-PE) e 4626 apresentaram cerca de 96% de fragmentos similares e o isolado 2018 (*Allium sp*/PE) com 87% de fragmento similares com os isolados do grupo e o isolado 2060 (*Cocos nucifera*/PE) 68% de fragmentos em comum com os dos demais isolados do quarto grupo.

Foi possível observar que as áreas geográficas de origem dos isolados analisados determinaram a formação de grupos, pois todos os isolados de Pernambuco apresentaram maior aproximação entre si, enquanto o isolado do Amazonas formou um único grupo. Os resultados exibem bem concordância com os de Assunção (1997) que analisou o polimorfismo de DNA de seis isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de cebola de diferentes locais de produção de Juazeiro-Bh, verificando uma correlação com as origens geográficas. Assis (2001) avaliou seis isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de cultivares de manga de diferentes regiões do Nordeste por RAPD e demonstrou que formou agrupamentos por área geográfica. Em oposição, Barbosa (2001) utilizou o RAPD para estudar vinte e seis isolados de *C. graminicola* isolados de milho, obtidos de municípios dos Estados de São Paulo e Paraná, e observou que os isolados de Guarapuava-PR apresentaram maior semelhança (81,9%) com Paranapanema-SP do que os isolado de Foz do Iguaçu-PR (65%), não havendo portanto agrupamento por região geográfica. Mills *et al.* (1992) empregaram RAPD e

observaram que os diferentes grupos de isolados de *Colletotrichum* formados no dendrograma não apresentaram relação com hospedeiros e região geográfica. Munaut *et al* (1998) estudaram isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de cinco espécies de *Stilosantes* (plantas forrageiras) da África e Austrália e também não conseguiram observar agrupamentos por origem geográfica..

A amplificação de seqüências aleatórias do genoma tem sido utilizada para correlacionar a patogenicidade de espécies do *Colletotrichum*. O dendrograma (Figura 17) gerado pelo RAPD agrupou isolados altamente agressivos a folha e bulbos de cebola com isolados não agressivos, não sendo a patogenicidade, portanto, determinante na formação de grupos de similaridade. Munaut *et al* (2002) estudaram a diversidade genética de *C. gloeosporioides* e sua patogenicidade a *Stilosantes spp.* Os isolados foram denominados tipo A (isolados de *Stilosantes spp* do México e Austrália) e tipo B (isolados de *Stilosantes guianiensis* do México e África). Ficou demonstrado que 60% houve de similaridade no grupo tipo A e 30% no grupo tipo B, e que houve relação ainda com a patogenicidade, pois os isolados Tipo A foram os mais agressivos. Saha *et al.* (2002) compararam o teste de patogenicidade em folhas de seringueira (*Havea brasiliensis*) com os resultados gerados pelo RAPD, observando que houve 41% de similaridade entre os isolados e que os mais agressivos apresentaram 70% de similaridade entre si. Silva-Mann *et al.* (2002) realizaram testes de patogenicidade à semente de algodoeiro, utilizaram marcadores bioquímicos e RAPD, visando a identificação do complexo *C. gossypii* e *C. gloeosporioides var. cephalosporioides*. Na análise de RAPD os isolados mais agressivos mostraram cerca de 85% de similaridade. Os marcadores bioquímicos não se mostraram eficientes para distinguir os isolados agressivos.



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 M

Figura 10. Perfis de RAPD de 15 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos com o primer OPA 2. (M) marcador de peso molecular DNA do fago λ cortado com a enzima *Hind* III; nos poços de 1 a 15 estão os DNA's dos isolados 2980, 4627, 4626, 4628, 2060, 2018, 4629, 2681, 2334, 2335, 2336, 3882, 2543, 2547 e 3923.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



Figura 11. Perfis de RAPD de 15 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos com o primer OPA 3. (M) marcador de peso molécula DNA do fago λ cortado com a enzima *Hind* III; nos poços de 1 a 15 estão os DNA's dos isolados 2980, 4627, 4626, 4628, 2060, 2018, 4629, 2681, 2334, 2335, 2336, 3882, 2543, 2547 e 3923.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 M

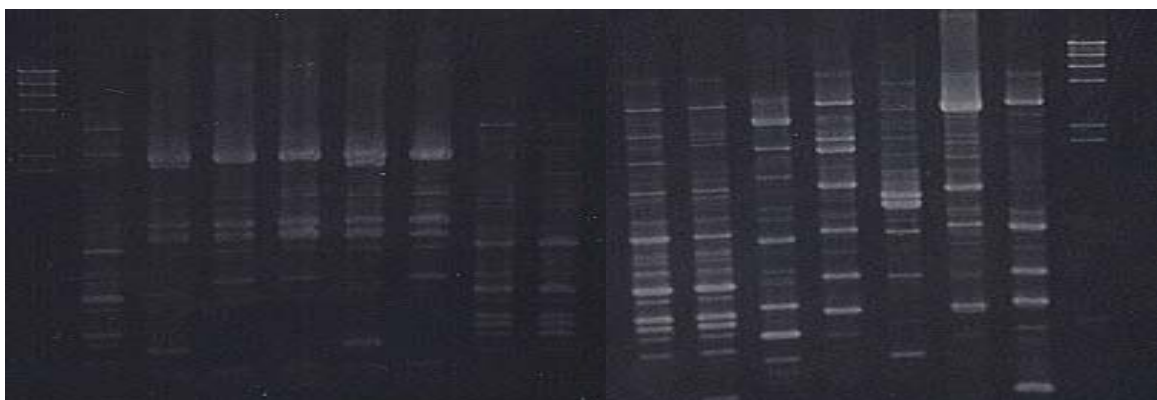


Figura 12. Perfis de RAPD e 15 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos com o primer OPW 8 (M) : marcador de peso molecular DNA do fago λ cortado com a enzima *Hind* III; nos poços de 1 a 15 estão os DNA's dos isolados 2980, 4627, 4626, 4628, 2060, 2018, 4629, 2681, 2334, 2335, 2336, 3882, 2543, 2547 e 3923.

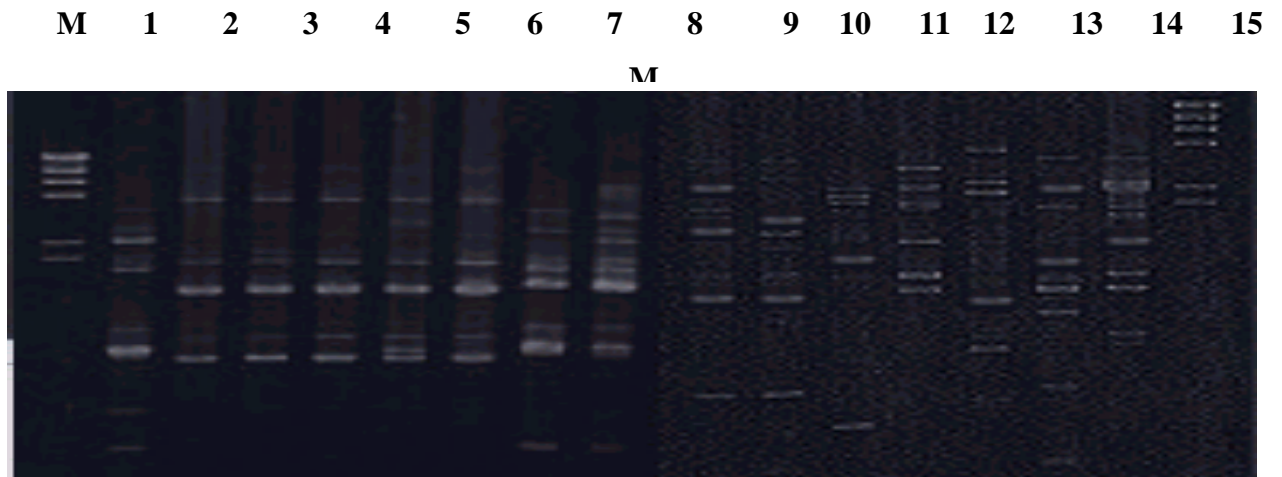


Figura 13. Perfis de RAPD de 15 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos com o primer OPW 17 (M) : marcador de peso molecular DNA do fago λ cortado com a enzima *Hind* III; nos poços de 1 a 15 estão os DNA's dos isolados 2980, 4627, 4626, 4628, 2060, 2018, 4629, 2681, 2334, 2335, 2336, 3882, 2543, 2547 e 3923.

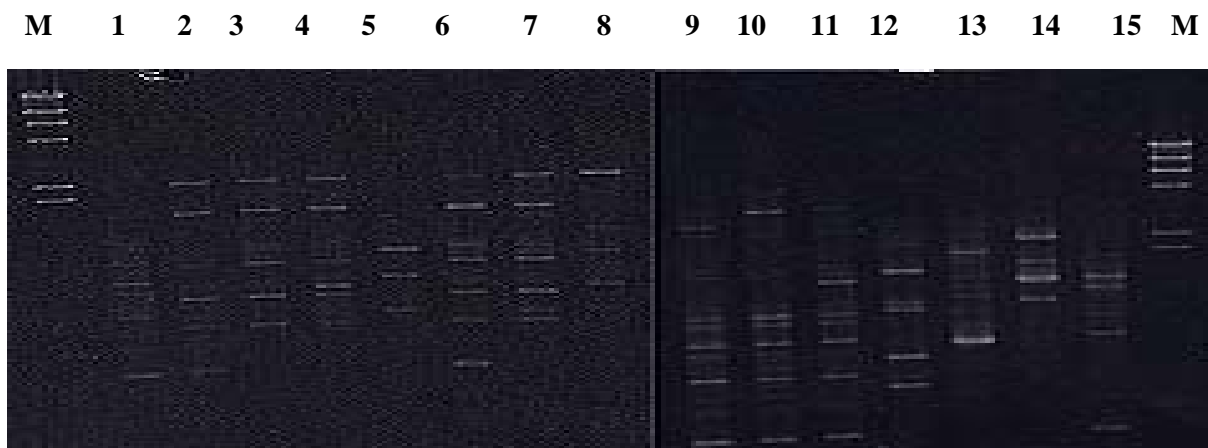


Figura 14. Perfis de RAPD de 15 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos com o primer OPW 20 (M) : marcador de peso molecular DNA do fago λ cortado com a enzima *Hind* III; nos poços de 1 a 15 estão os DNA's dos isolados 2980, 4627, 4626, 4628, 2060, 2018, 4629, 2681, 2334, 2335, 2336, 3882, 2543, 2547 e 3923.

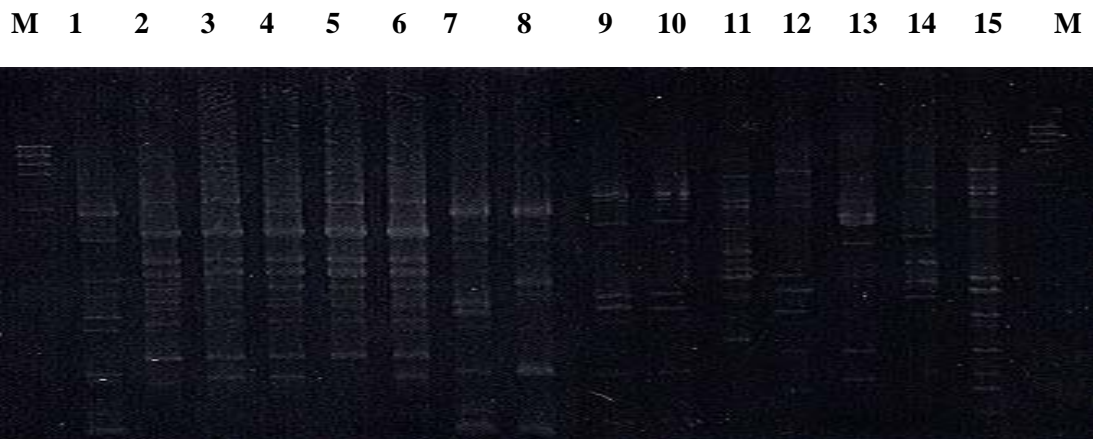
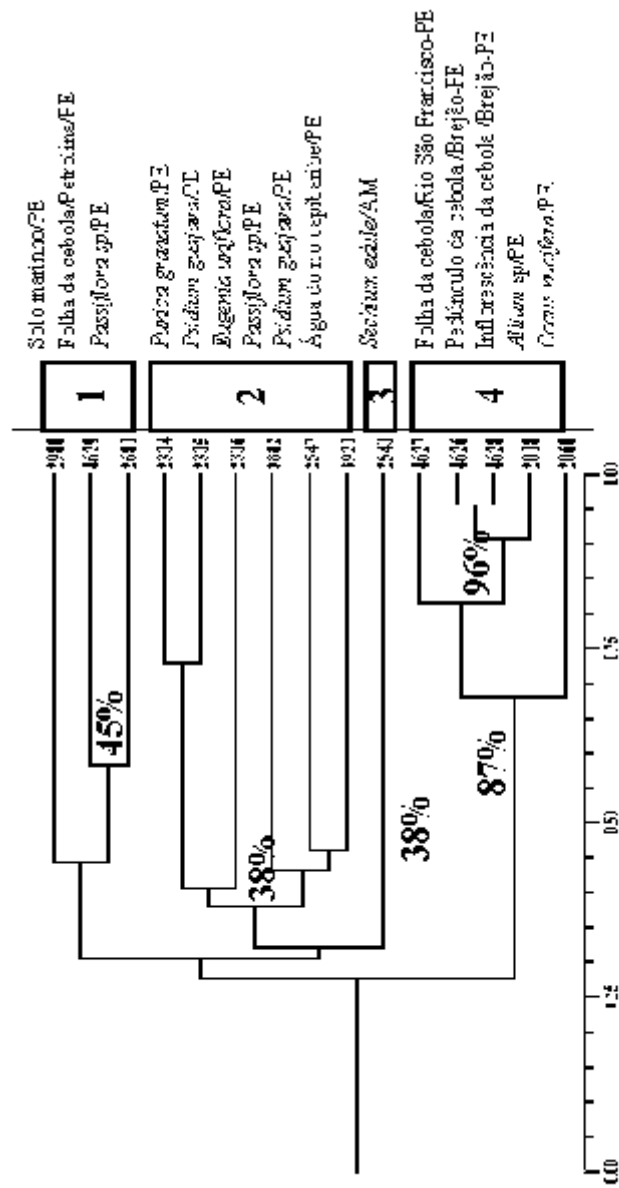


Figura 15. Perfis de RAPD de 15 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos com o primer OPX 04 (M) : marcador de peso molecular DNA do fago λ cortado com a enzima *Hind* III; nos poços de 1 a 15 estão os DNA's dos isolados 2980, 4627, 4626, 4628, 2060, 2018, 4629, 2681, 2334, 2335, 2336, 3882, 2543, 2547 e 3923.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



Figura 16. Perfis de RAPD de 15 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos com o *primer* OPX 13 (M) : marcador de peso molecular DNA do fago λ cortado com a enzima *Hind* III; nos poços de 1 a 15 estão os DNA's dos isolados 2980, 4627, 4626, 4628, 2060, 2018, 4629, 2681, 2334, 2335, 2336, 3882, 2543, 2547 e 3923.



Coefficiente de similaridade

Figura 17. Dendrograma construído pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard a partir dos perfis de fragmentos obtidos por RAPD de 15 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*.

4.4 ANÁLISE DAS REGIÕES ITS DO rDNA

4.4.1 Análise dos produtos de amplificação

A amplificação do locus ITS1-5.8s-ITS2 do DNA gerou apenas um fragmento de aproximadamente 600-pb para todos os isolados de *C. gloeosporioides* em gel de agarose (Figura 18) o que confirma a identificação da espécie.

Moriwak *et al.* (2003), com a finalidade de comparar características morfológicas (baseados em van Arx 1957) com o marcador molecular ITS1, analisaram espécies do gênero *Colletotrichum*, incluindo *C. gloeosporioides*, e propôs uma nova espécie *C. boninense*. Vinnere *et al.* (2002), por análise da região ITS1-5.8s-ITS2, também conseguiram distinguir as espécies de *C. acuntatum*, *C. gloeosporioides* e *C. dematium*, entre isolados identificados da forma clássica como sendo *C. gloeosporioides*

4.4.2 Analise dos fragmentos de restrição

Não houve sítios de restrição para enzima *Dra* I (Figura 19). A digestão com a enzima *Hae* III gerou fragmentos monomorficos de 300pb (2x) para 14 isolados e de 400 + 200pb para o isolado 2543 (*Sechium edule*-AM) (Figura 20). Na digestão com a enzima *Msp* I doze isolados (2980, 4627, 4628, 4629, 2018, 2334, 2335, 2336, 3882, 2543, 4626, 2060) apresentaram fragmentos de 300pb (2x) e os isolados 2681, 2547 e 3923 (Figura 21), fragmentos de 350 + 100 (2x) + 50 (2x).

A análise de agrupamento dos fragmentos de restrição dos produtos de amplificação (Figura 22) da região ITS do rDNA com as enzimas *Hae* III e *Msp* I em conjunto, mostrou a existência de três grupos distintos. O primeiro grupo, compreende onze isolados idênticos: 2980 (solo marinho-PE), 4627 (folha da cebola/Vale do Rio São Francisco), 4626 (pedúnculo da cebola/Brejão/PE), 4628 (inflorescência da cebola/Brejão/PE), 3882 (*Passiflora sp*/PE), 2336 (*Eugenia uniflora*/PE), 2335 (*Psidium guajava*/PE), 2334 (*Punica granatum*/ PE), 2060 (*Cocus nucifera*/PE) 4629 (folha da cebola/PetrolinaPE) e 2018 (*Allium sp*/PE),. Todos os isolados de cebola se encontram neste grupo. O segundo grupo é formado por três isolados: 2681 (*Passiflora sp*/PE), 2547 (*Psidium guajava*/PE) e 3923 (água do rio Capibaribe-PE) com cerca de 24% de similaridade com o primeiro grupo, e 26% com o terceiro grupo. O terceiro grupo é formado por um único isolado, o do Amazonas, 2543 (*Sechium edule*/AM) e apresentou cerca de 26% de similaridade com o primeiro e o segundo grupos.

Saha *et al.* (2002) avaliaram as espécies de *Colletotrichum* que causavam lesão em *Hevea brasiliensis*, pela análise da região ITS e os fragmentos de restrição mostraram a aproximação entre as espécies que causaram as maiores lesões. Neste

trabalho, os isolados de cebola (Brejão e Petrolina-PE) que causaram maiores lesões, apresentaram o mesmo padrão de bandas.

Mills *et al.* (1992) utilizaram os *primers* *cgTnt* e *ITS4* na região 25/28s do gen rRNA com o DNA genômico de 39 isolados de espécies de *C. gloeosporioides*, e oito espécies de *Colletotrichum* obtidos da Austrália, Malásia e Indonésia e analisaram a patogenicidade em frutos do tomate, verificando pelos produtos de amplificação que os isolados mais agressivos se agruparam, além de ser observado agrupamento em relação à região geográfica. Notadamente os isolados mais agressivos à folha e ao bulbo da cebola se agruparam com os menos agressivos, porém os isolados mostraram agrupamento em relação a região geográfica.

As enzimas *Hae* III e *Msp* I apresentaram o mesmo padrão de bandas para os isolados mais agressivos e menos agressivos, porém foi possível distinguir o isolado 2543 (Amazonas) dos demais isolados de Pernambuco. Esses resultados indicam discordância dos de Freeman *et al.* (2000) que trabalharam com as mesmas enzimas, não evidenciou diferenças nos isolados de *C. gloeosporioides*. Martinez-Culebras *et al.* (2000) utilizaram as enzimas *Mun* I, *Pvu* II e *Fcr* FI e foi possível diferenciar espécies de *C. gloeosporioides* de outras espécies do mesmo gênero.

O isolado 2543 (Amazonas) foi o único que não se agrupou aos demais isolados de Pernambuco no dendrograma. Mumaut *et al.* (1998) analisaram pela região ITS a aproximação geográfica de isolados de *Colletotrichum*, não tendo obtido agrupamento por região geográfica. Martinez-Culebra *et al.* (2000) estudaram 80 espécies do gênero *Colletotrichum* por ITS1 e ITS2 do 5.8s do rRNA, e além de diferenciar todas as espécies, constataram pelo dendrograma que os isolados de *C. acutatum* da mesma região geográfica pertenciam ao mesmo grupo.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



Figura 18. Perfis da região ITS do rDNA dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos com primers ITS1 e ITS4, em gel de agarose. Nas pistas M, marcador de peso molecular 100bp, e nas pistas de 1 a 15 encontram-se os DNAs dos isolados 2980, 4627, 4626, 4628, 2060, 2018, 4629, 2681, 2334, 2335, 2336, 3882, 2543, 2547 e 3923.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
12 13 14 15 M



Figura 19. Perfis de restrição dos fragmentos de DNA da região ITS do DNA em gel de agarose de 15 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos com a enzima *Dra* I. Nas pistas M, marcador de peso molecular 100bp, e nas pistas de 1 a 15 encontram-se os DNA's dos isolados 2980, 4627, 4626, 4628, 2018, 2018, 4629, 2681, 2334, 2335, 2336, 3882, 2543, 2547 e 3923.

Figura 20. Perfis de restrição dos fragmentos de DNA da região ITS do

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 M



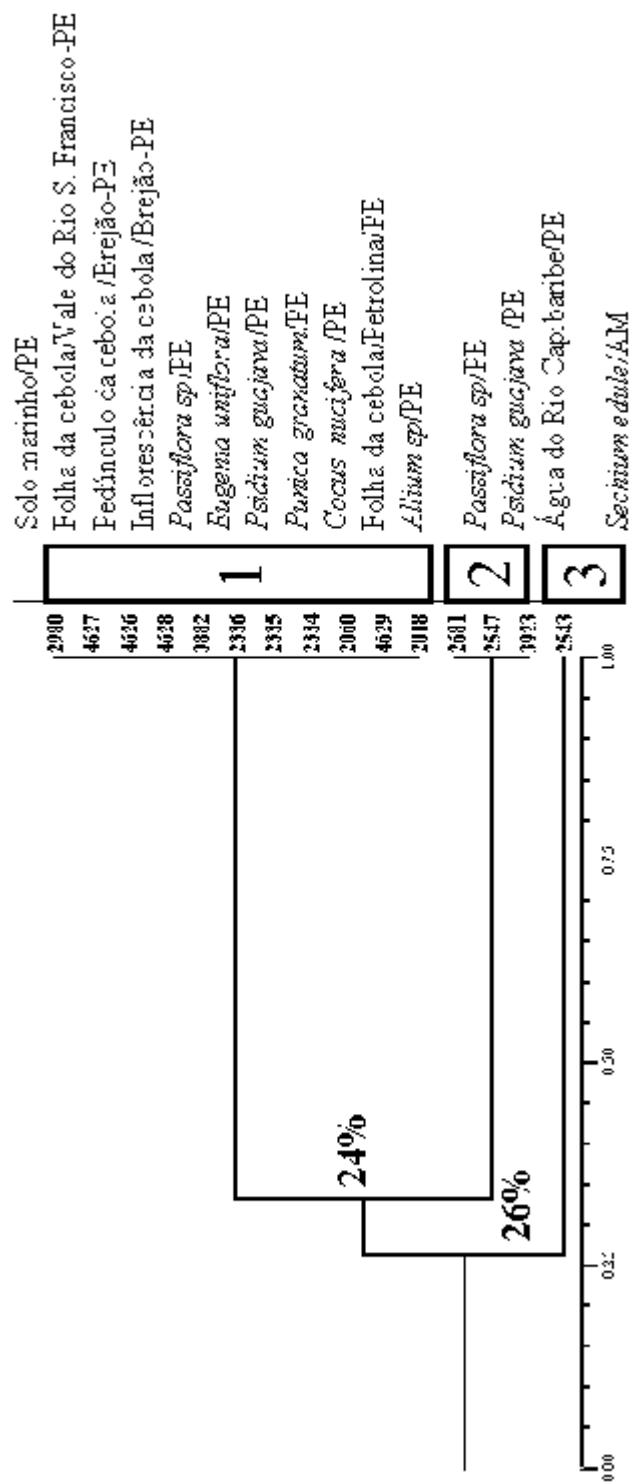
DNA

em gel de agarose de 15 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos com a enzima *Hae* III. Nas pistas M, marcador de peso molecular 100bp, e nas pistas de 1 a 15 encontram-se os DNA's dos isolados 2980, 4627, 4626, 4628, 2018, 2018, 4629, 2681, 2334, 2335, 2336, 3882, 2543, 2547 e 3923.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 M



Figura 21. Perfis de restrição dos fragmentos de DNA da região ITS do DNA em gel de agarose de 15 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos com a enzima *Msp* I. Nas pistas M, marcador de peso molecular 100bp, e nas pistas de 1 a 15 encontram-se os DNA's dos isolados 2980, 4627, 4626, 4628, 2018, 2018, 4629, 2681, 2334, 2335, 2336, 3882, 2543, 2547 e 3923.



Coeficiente de similaridade

Figura 22. Dendrograma constituído pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard a partir dos perfis dos fragmentos da região ITS do rDNA obtidos de 15 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* com enzimas de restrição *Dra* I, *Hae* III e *Msp* I

▸ Houve diferença nos resultados dos testes de patogenicidade em folhas e bulbos de cebola da cultivar Texas Early Grano 502 com relação a *C. goeosporioides* .

▸ Todos os isolados de *C. goeosporioides* apresentaram patogenicidade em folha de cebola, independentemente de sua origem, sendo que os obtidos de cebola foram os mais patogênicos.

▸ Somente os isolados obtidos de cebola foram capazes de causar lesões no teste de patogenicidade em bulbos.

▸ O marcador RAPD evidenciou uma grande diversidade genética entre os isolados de *C. goeosporioides* do Estado de Pernambuco.

▸ Houve agrupamento no dendrograma de RAPD dos isolados obtidos de cebola (4627, 4628, 4626, 2018) com exceção do isolado 4629.

▸ Não houve polimorfismo entre os isolados de *C. goeosporioides* pela análise dos produtos de amplificação da região ITS1 – 5.8S – ITS2 do rDNA confirmado, pela alta ocorrência de homologia, que pertencem a uma mesma espécie.

▸ A análise de restrição de região ITS do rDNA com as enzimas *Hae* III e *Msp* I evidenciou diferenças nos isolados 2543 (chuchu/*Sechiumedule*/AM) e 2681 (maracujazeiro/*Passiflora sp*/ PE) respectivamente.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRAFIA

ALAHAKOON, P. W.; BROWN, A E.; SENIVASPRASAD, S. Cross-infection potential of genetic groups de *Colletotrichum goeosporioides*, on tropical fruits. Physiological an Molecular plantain Pathology. v. 44, p.93-103, 1994.

ANDRADE, E. R.; DUCROQUET, J. Comparação de diferentes métodos de inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides* em goiabeira serrana. **Fitopatologia Brasileira**. v. 26 dezembro de 1998.

ASSIS, T C. **Variabilidade de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente da antracnose da mangueira, quando a utilização de carboidrato, patogenicidade, produção de enzimas e análise de RAPD.** f 67. Dissertação (Fitossanidade). UFRPE. Recife, 2001.

ASSIS, T. C.; MACHADO, A. M.; ANDRADE, D. E. C. T.; COELHO, V. N. **Diferenças de Moleculares de Isolados de *Colletotricchum gloeosporioides*, obtidos de frutos de mangueira, Através de Marcadores RAPD.** *Fitopatologia Brasileira*. v. 27, p. 79 - 80 2002.

ASSUNÇÃO, I. P.; ALFENAS, A. C.; COELHO, R. S. B.; LIMA, G. S. A. **Análise Isoenzimática de Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose foliar da cebola.** *Summa Phytopathologica*. v. 25, p. 293 - 298, 1999.

ASSUNÇÃO, I. P. **Identificação de fontes de resistência em culturas de cebola (*Allium Cepa*.L) e análise da variabilidade *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz. et Sacc (Sensu Arx, 1957) assistida por marcadores moleculares.** 85 f. **Dissertação (Fitossanidade).** UFRPE, Recife PE. 1997.

BAKER, R. D. Human Infection With Fungi, Actinomicetes and Algae. **New York, Epringer Verlag, 1971, 419p**

BARBOSAM, M.P. M. Variabilidade patogênica de *Colletotrichum graminicolas* isolado de milho (*Zea mays* L.). 200f. Dissertação (Agronomia), UFSP. 2001.

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

CAFÉ FILILHO, A C.; REIFSCHNEIDER, F. J. B.; YATEISHI N. T. Pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides* to carrot. Tropical Pest Management, v. 32, p. 274-276, 1986.

CARDOSO, I. T.; COSTA, P. Produção de bulbuzinho de cebola em bandejas de isopor. Scienti Agrícola. v. 56, p.1-9, 1999.

COSTA, C. L. Viva Melhor ! Com a Medicina Natural. Ed. Luxo, 1ª ed, p. 410, 1996.

CAVALCANTI, M.A.Q.; MOTA, C.M.S.; NOGUEIRA, E.B.S. Catálogo de Coleção de Culturas da Micoteca URM. UFPE-CCB-Departamento de Micologia. Recife-PE. 3ª ed.p.51.1996.

DEBARBA, J. F.; THOMAZELLI, L. F.; GANDIN, C. L.; SILVA, E. Cadeias Produtivas do Estado de Santa Catarina: Cebola. Viçosa Universidade Federal de Viçosa. Boletim Técnico. Ed. Epagri, 1998, 115p.

FARAH, S. B. DNA Segredos e Mistérios. São Paulo. Editora Sarvier. 2000, 276p.

FEICHTENBERGER, E. MÜLLER, G. W.; GUINADO, N. Doenças dos citros. In: KIMATI, H. AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A; CAMARGO, L. D. A . **Manual de Fitopatologia.** v. 2, São Paulo, Agronomia Ceres. p. 261-296, 1997.

FERNANDES, M. C.A., RIBEIRO, R.DE L. D., DCHER, M.M. Caracterização patogênica e eletroforetica de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de *Capsicum*

annuum, *Solanum melongena* e *Solanum gilo*. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília v.20, suplementao, p. 370,1995.

FERNAMDES, M. C..A.,SANTOS A S. Ribeiro, R.L.D. Adaptação patogênica de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos de frutos de jiloeiro, pimentão e berinjela. **Summa Phytopathogenica** v.28, 2002.

FERREIRA, M. E.; GLATTAPAGLIA, D. Introdução ao Uso de Marcadores Molecular em Análise Genético. 3ª ed, Brasília, EMBRAPA, 1998, 220p.

FONTES, P. C. R. Caderno Didático. Cultura da Cebola. Ed. UFV, p. 40, 1998.

FREEMAN, S.; JURKEVICTCH. D. M. E.; MAYNON. M.; SHABI. E. Molecular Analyse de *Colletotrichum* Spacies From Almond and Other Fruit. *Phytopathology*. v. 90, p. 608 - 614, 2000.

FREMAN, S.; PHAMM.; RODRIGUESZ, R. Molecular genoty ping of *Colletotrichum* Species based on arbitrarily primed PCR a + T-Rich DNA, and nuclear DNA analyses. *Experimental Micology*. v 17,. 309-322.1998.

FUNGARO, M. H. P. PCR na Micologia. Bio Tecnologia Ciência & Desenvolvimento. P. 12 - 18, 2000.

FURTADO, E. L., BACH, E. E., KIMATI, H., MENTEN, J. O. M., SILVEIRA, A P. Caracterização morfológiaca, patogênica e isoenzimatica de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de seringueira. **Summa Phytopathologica**. v. 25, 1999.

GARDES, M.; BRUNS, T. D. ITS-RFLP Matching of identification of fungi. In: CIA P.P, J. P. (ED) **Species diagnostics protocols: PCR and other nucleic acid methods**. Totowa: Human Press, p.177-186, 1996.

GOES, A. ; KIMATI, H. Caracterização patogênica de isolados de *Colletotrichum acutatum* e de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos de olantas cítricas. **Summa Phytopathogenica** v. 26, p.10-13.1997.

IBGE. PRODUÇÃO AGRÍCOLA MUNICIPAL, CULTURAS TEMPORÁRIAS PERMANENTE. v. 26, Brasil, 1999.

JOLY, A. B. Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal. 4^a ed , Biblioteca Universitária série 3. Ed. nacional, v. 4, 1998, 777 p.

KENDRICK, B. The Tjith Kuigdom Camada, Micologie Publications. 1992, 406p

LEAL-BENTIOL, S. C. M. O enfoque molecular na sistemática de Fungo. In: FERNANDES, J. M. C. ; PRESTES, A M.; PUCININI, E. C. (EDS) Revisão Anual de Patologia de Planta . v. 6, Passo Fundo, Ed. Embrata p. 197-223, 1998.

LIMA, J. A S. Caracterização patogênica, fisiológica, cultural e isoesterásica de isolados de *Botryodiplodia theobromae* Pat., agente causal da morte descendente da mangueira (*Mangifera indica* L.). 128 f. Dissertação (Fitossanidade)-UFRPE, Recife PE. 1996.

MACKINNEY, R. H. Influence on soil temperature and moisture on infection of wheat seedling by *Helminthosporium stivus*. Journal of Agricultural Research, v. 26, p. 195-218, 1923.

MARANHÃO, E. H. A.; CANDEIA, J. A.; MARANHÃO, E. A. A.; MENEZES, D.; RODRIGUES V. J. L. B.; LYRA. FILHO. H. P. L. Avaliação e intervalos de aplicação de fungicida no controle do "Mal-das-sete-voltas" em Cebola. Pesquisa Agropecuária Pernambucana. v.10, p. 39-43, 1997.

MARIWAK, J., SATO,T., TSUKIBOSHI, T. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum boninense* sp. nov. from Japan. **Mycoscience**. v. 44 p. 44 - 47. 2003.

MARTÍNEZ-CULEBRAS, P. V., BARRO, E., GARCÍA, M. D., QUEIROL, A. Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose of strawberry based on the internal transcribed spacers of the ribosomal region. **Microbiology Letters**. v. 189 p. 97-101. 2000.

MARTINEZ-CULEBRAS, P. V., BARROS, E. SUAREZ-FERNANDEZ, M. B., QUEIROZ C. RAPD analysis of *Colletotrichum* Species isolated from Strawberry and the Design of specific Primers for the Identification of *C. fragariae*. **Phytopathology**, v.150. p 680-686. 2002.

MARTINEZ-CULEBRAS, P.V., QUEROL, A., SUREZ-FERNANDEZ, M. B., GARCIA-LOPEZ, M. D., BARRIO, E. Phylogenetic Relationships Among *Colletotrichum* Pathogens of Strawberry and Desing of PCR Primrs for their Identification. **Phytopatology**. v. 151, p. 135-143. 2003

MENEZES, M.; SILVA, D. M. W. Guia Prático para Isolamento de Fungos Fitopatogenicos. **Recife Ed. UFRPE, 1997, 120p.**

MICHEREFF, S. J. Quantificação de Doenças de Plantas. In: **TORRES, J. B.; MICHEREFF, S. J.** Desafio do Manejo Integrado de Pragas e Doenças. Livro de Palestras e Mini-cursos "Semana de Fitossanidade". **Recife, UFRPE, p.63-77, 2000.**

MICHEREFF, S. J. Fundamentos da Fitopatologia. **Recife, Ed Universitária, UFRPE 2000,144p.**

MILLS, P.R., SREENIVASAPRASAD, S. BROWN, A E. Detection and differentiation od *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. **Microbiology Latters**, v 98 p.197-144. 1992.

MITIDIERI, I. Z. M. De. La antracnosis de la albahaca (*Ocimum basilicum* L.) causada por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz y forma sexual glomerela cingulata (Stonem.) Spaulding y v. Schrenk. **Revista de Investigaciones Agropecuarias**, v. 10, p. 99-108, 1973.

MORIWAKI, J.; SARO, T.; TSUKIBOSHI, T. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum boniniense* sp. Nov. from Japan. **Mycoscience**. v. 53, p. 44 - 47, 2003.

MUNAUT, F., HAMAIDE, N., MARAITE, H. Genomic and pathogenic diversity in *Colletotrichum gloeosporioides* from wild native Mexican *Stylosanthes spp.*, and taxonomic implication. **Micologic Research**. v.106, p. 579-593, 2002.

MUNAUT, F., HAMAIDE, N., STAPPEN, V., MARAITE, H. Genetic relationships among isolates de *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes spp.* In Africa and Australia using RAPD and ribosomal DNA markers. **Plant Pathology**. v.47, p. 641-648, 1998.

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

NUNES, M. E. T.; KIMATI, T. H. Doenças do alho e da cebola. In: KIMATI, T. H.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E, A.; REZENDE, J. A. M. (USP). Manual de Fitopatologia. Doenças das Plantas Cultivadas. São Paulo, Ed. Ceres, 3ª ed, p. 49 - 64, 1997.

PIO-RIBEIRO, G.; MARIANO, L R de. Doença do Maracujazeiro. In: KIMATI, H. AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A; CAMARGO, L. D. A . **Manual de Fitopatologia**. Doenças das Plantas Cultivadas. São Paulo, Ed. Ceres, 3ª ed, p. 524-525. 1997.

PICCININI, E. ; PASCHOLATI, P. Doenças do abacateiro In: KIMATI, H. AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A; CAMARGO, L. D. A . **Manual de Fitopatologia**. Doenças das Plantas Cultivadas. São Paulo, Ed. Ceres, 3ª ed, p. 1-8.1997.

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

REZENDE, J. A. M. ; FANCELLI, M. I. Doença do mamoeiro. In: KIMATI, H. AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A; CAMARGO, L. D. A . **Manual de Fitopatologia**. Doenças das Plantas Cultivadas. São Paulo, Ed. Ceres, 3ª ed, p. 486-496,1997.

RHOLF, F. J. NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Applied Biostatistics, New York ,Inc. Exeter Publishing, 1988.

SAHA, T., KUMAR, A RAVINDRAN, M. JACOB, C. K., ROY, B. Identification os *Colletotrichum acutatum* from rubber using randon amplified polymorphic DNAs na ribosomal DNA polymorphims. **Micologic.Res.** v. 106, p. 215-221, 2002.

SAMBROOK, J.; FRISTSCH, E. F. MANIATS, T. **Molecular cloning a laboratory manual** 2^a ed, New York, Cold Spring Harbor Laboratory. 1989.

SILVA-MANN, R., SALGADO, K. C.C., VIERA, G.GC., MACHADO, J.C. Variabilidade genética de isolados do complexo de *Colletotrichum* associado a semente de algodoeiro, por meio de técnicas moleculares e inoculação de pantas. **Fitopatologia Brsileira.** v.27, 2002.

SHERRIFF, C.; WHELAN, M. J.; ARNOLO, G. M. Ribossomal DNA sequence analysis reveals new Species grouping. **Experimental Micology.** v. 18, p.121-138, 1994.

SWART, G. M. Comparative study of *Colletotrichum gloeosporioides* from avocado and mango. 1999. 200f tese (Plant Pathology) University of Pretoria. Pretoria , 1999.

WEIZMAN & SILVA-HUTNER. Introdction of Fungi. Cambrige University Press. p. 419,1997.

WILLIAMS, J.G.K; KUBELIK, A. R.; LIVARK, K. J.; RAFALKI, J.A; TINGEY, S. V. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primes are Usuful as Genetic Markers Nucleic Acids Research. v.18, p.6531- 6535, 1990.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S & TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes for phylogenetics, in: GELFAND, D.H.; SNINSKYI, J. J. & WHITE,T. J. (ED) PCR Prodtocols, a Guide to Methods and Applications. New York. Academic Aprecs. 1990, p. 315-322.

VAN ARX. Die Arten der gattung *Colletotrichum* cda (in german).
Phytopathol v 29, 1957,220-203p.

VINNERE, O; FATEHI, J.; WHRIGHT, S.A L.; GERHARDSON, B. The causal agent of anthracnose of Rhododendron in Sweden and Latvia. **Myxological Research**. 106, p.60-69, 2002

ZOMBOLIM, L.; JACCOUD FILHO, D.S. Doenças causadas por fungos em alho e cebola. IN: ZOMBOLIM, L. ; VALE, F. X. R.; COSTA H. (EDS) **Controle de doenças de Plantas Hortaliças**. v. 1. Viçosa p. 1-26, 2000.

7. APÊNDICE

```
*****
*           SANEST - SISTEMA DE ANALISE ESTATISTICA           *
*   Autores: Elio Paulo Zonta - Amauri Almeida Machado   *
*           Instituto Agronomico de Campinas - I A C       *
*           ANALISE DA VARIABEL INDICE - ARQUIVO: ID       *
*****
```

CODIGO DO PROJETO: INDICE DE

RESPONSAVEL: DOENCA

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL: DIC

OBSERVACOES NAO TRANSFORMADAS

NOME DOS FATORES

```
-----
FATOR      NOME
-----
A          ISOLADO
-----
```

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

```
-----
CAUSAS DA VARIACAO      G.L.          S.Q.          Q.M.          VALOR F      PROB.>F
-----
ISOLADO                  3            947.2656250   315.7552083   13.8571      0.00203
RESIDUO                  8            182.2916667   22.7864583
-----
TOTAL                    11           1129.5572917
-----
```

MEDIA GERAL = 88.020836

COEFICIENTE DE VARIACAO = 5.423 %

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE ISOLADO

```
-----
NUM.ORDEM  NUM.TRAT.  NOME      NUM.REPET.  MEDIAS      MEDIAS ORIGINAIS  5%  1%
-----
1          2          ISO 02    3           95.833333    95.833333        a  A
2          1          ISO 193   3           91.666667    91.666667        a  A
3          4          ISO 04    3           91.666667    91.666667        a  A
4          3          ISO 03    3           72.916667    72.916667        b  B
-----
```

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 12.48464 - D.M.S. 1% = 17.08714

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE INDICE

NUM. ORDEM	NUM. TRAT.	NOME	NUM. REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	14	92	5	90.000000	100.000000	a	A
2	15	03	5	40.554379	42.272042	b	B
3	4	193	5	35.870718	34.334721	bc	BC
4	1	04	5	32.461969	28.808955	bcd	BCD
5	11	2543	5	22.544254	14.699322	cde	CDE
6	12	2986	5	22.173190	14.243647	cde	CDE
7	6	2018	5	20.490002	12.253079	de	CDE
8	13	2335	5	19.485413	11.126688	de	CDE
9	7	2334	5	17.561121	9.103680	de	DE
10	10	2636	5	15.776761	7.392417	e	DE
11	9	2547	5	14.672084	6.415414	e	E
12	8	3923	5	13.993565	5.847351	e	E
13	5	3882	5	13.207643	5.220346	e	E
14	2	2681	5	11.210768	3.779864	e	E
15	3	2060	5	9.426408	2.682411	e	E

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 15.21198 - D.M.S. 1% = 17.58505

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
INDICE	14	28221.0451885	2015.7889420	43.5555	0.00001
RESIDUO	60	2776.8536391	46.2808940		
TOTAL	74	30997.8988276			

