

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TATIANE MARIUSSI E SILVA

**RNA DUPLA FITA EM *Guignardia citricarpa* E ESTIMATIVA DO NÚMERO DE CROMOSSOMOS EM *G. citricarpa*, *G. mangiferae* E *Phyllosticta spinarum***

**CURITIBA  
2008**

**TATIANE MARIUSSI E SILVA**

**RNA DUPLA FITA EM *Guignardia citricarpa* E ESTIMATIVA DO NÚMERO DE CROMOSSOMOS EM *G. citricarpa*, *G. mangiferae* E *Phyllosticta spinarum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre, área de concentração: Microbiologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Chirlei Glienke  
Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa Kava-Cordeiro

**Curitiba  
2008**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, e, em especial:

À Profª Drª Chirlei Glienke, pela orientação, amizade e estímulo durante todo o mestrado. Muito obrigada.

À Profª Drª Vanessa Kava-Cordeiro, que sempre esteve disponível contribuindo para o meu engrandecimento com seus conhecimentos, orientando e aconselhando.

À Profª Drª Lygia Vitória Galli-Terasawa, pela convivência, sugestões e auxílio no LabGeM;

À Profª. Drª Roseli Wassem do Departamento de Genética da UFPR pelo auxílio com a hibridização e valiosas sugestões;

À Profª. Drª Ruth Janice Guse Schadeck do Departamento de Biologia celular pela ajuda, e importantes sugestões em experimento de germinação;

Ao Prof. Ricardo Lehtonen R. de Souza do Laboratório de Polimorfismos da UFPR pelo empréstimo de soluções;

Ao Doutorando Rafael Noletto do Laboratório de Citogenética Animal pela disponibilidade em ajudar com a hibridização;

Aos Professores do Mestrado em Microbiologia, que contribuíram para minha formação;

À CAPES pelo apoio financeiro.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Profª Drª Edilene Alcântara de Castro, pela disponibilidade e incentivo;

Ao Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná por permitir o uso de suas instalações;

Aos alunos de Pós-graduação do LabGeM, Danyelle, Jociney, Josiele, Josiane e Juliana pela amizade e cooperação no trabalho diário dentro do laboratório;

Aos amigos do LabGeM pela agradável convivência e ajuda nos momentos mais difíceis, Carol, Fer, Larice, Lis, Lucinir, Maysa, Rosana, Douglas, Flávia e Carol S.;

À amiga Izolde Gartner, pela ajuda e disponibilidade;

À Anilda Gomes da Silva, pelo eventual auxílio técnico na SEAD;

À Arlete Nitsche, secretária do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pelas orientações e informações;

À amiga Renata por toda ajuda dentro e fora do laboratório, pela competência e caráter admiráveis, que tornavam a luta diária mais leve e animada;

Às amigas Isabel, Marciele, Anna, Fran, Lizy e Marcela pela compreensão pelos momentos de ausência nesse período e por com certeza terem contribuído muito para essa realização;

Ao meu noivo Ronald por toda ajuda, incentivo, carinho e por tornar meus dias mais felizes;

Aos meus pais Laercio e Marlene e ao meu irmão Juliano por estarem sempre ao meu lado e por serem os responsáveis por muitos sonhos realizados.

## RESUMO

*Guignardia citricarpa* é um fungo ascomiceto de extrema importância para a citricultura brasileira, pois é o agente causal da Mancha Preta de Citros (MPC). As plantas cítricas são igualmente colonizadas pelas espécies endofíticas *G. mangiferae* e *Phyllosticta spinarum*, morfológicamente muito semelhantes ao patógeno. Há poucas informações sobre a genética destas espécies na literatura, sendo, até o momento, desconhecido o número de cromossomos de *G. citricarpa* e *P. spinarum*. Diversos estudos especulam sobre a interferência que RNAs dupla fita podem ocasionar em genomas fúngicos. Em fungos fitopatogênicos há relatos de RNAdf alterando a patogenicidade destes para a planta hospedeira. Neste contexto, este trabalho teve como objetivos determinar o número de cromossomos das três espécies citadas, desenvolver um protocolo de cura de RNAdf para o fungo *G. citricarpa* e avaliar a influência do RNAdf em características morfológicas e fisiológicas relacionadas com a patogenicidade, comparando linhagens isogênicas curadas e não-curadas do RNAdf. Para determinação do número de cromossomos foi utilizada a metodologia de hibridização com sonda de região telomérica de *Botrytis cinerea* inserida no plasmídeo pTEL marcada com fósforo<sup>32</sup>, em membranas contendo DNA genômico de *G. citricarpa*, *G. mangiferae* e *P. spinarum*, clivado com enzima de restrição. Tal metodologia foi inédita para estas espécies fúngicas e os resultados confirmaram a presença de, pelo menos, 8 cromossomos para a espécie *G. mangiferae*. Sugere-se também a presença de pelo menos 7 cromossomos para a espécie *G. citricarpa* e 6 cromossomos para a espécie *P. spinarum*. Evidenciou-se que cinco linhagens de *G. citricarpa* possuem uma banda característica de RNAdf, de aproximadamente 3100 pb que provavelmente corresponde a uma partícula viral da família Totiviridae. A cura do RNAdf foi obtida pela primeira vez na literatura para fungos do Gênero *Guignardia* utilizando-se temperatura moderadamente elevada (37°C) e repique de ponta de hifa. Dados de RAPD e seqüenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA comprovaram a isogenia das linhagens contendo RNAdf e das curadas. Características morfológicas e fisiológicas foram utilizadas a fim de avaliar a influência do RNAdf na patogenicidade de *G. citricarpa*. Foram avaliados os parâmetros crescimento radial, taxa de produção de esporos, formação de picnídios *in vitro* e em folhas de citros, germinação de esporos, formação e melanização de apressórios. Os resultados de crescimento radial e produção de esporos foram inconclusivos. Com exceção da linhagem PC7LD6, parece que a cura do RNAdf leva à diminuição na produção de picnídios em folhas de citros. Nos testes de produção de esporos e apressórios em lâminas, verificou-se que na linhagem 33/05 contendo RNAdf a quantidade de esporos produzida foi significativamente maior comparada a linhagem curada. A quantidade de apressórios produzidos em lâminas da linhagem PC33/05 foi maior que na linhagem PC33/05 1C (curada). Entretanto os apressórios de ambas preparações apresentaram-se sempre melanizados e septados. Desta forma, conclui-se que estas partículas virais parecem contribuir para características de patogenicidade do fungo, uma vez que sabe-se que o sucesso de penetração na planta hospedeira depende da formação de apressórios.

**Palavras chave:** *Guignardia citricarpa*, *G. mangiferae*, *P. spinarum*, RAPD, ITS, Hibridização, Sonda Heteróloga de Região Telomérica, RNAdf.

## ABSTRACT

The phytopathogenic fungus *Guignardia citricarpa* (ascomycete) is the casual agent of Citrus Black Spot (CBS), therefore extremely important to the Brazilian citriculture. The citrus plants are also colonized by the endophyte species *G. mangiferae* and *Phyllosticta spinarum* which are morphologically very similar to the pathogen. Little information about the genetics of these species is available in the literature. So far, the number of chromosomes in *G. citricarpa* and *P. spinarum* is still unknown. Several studies speculate about the effects of double-stranded RNA (dsRNA) in the fungi's genomes. According to reports, in phytopathogenic fungi, the dsRNA changes the pathogenicity of these fungi to the host plant. In this context, the aim of this work was to determine the number of chromosomes in *G. citricarpa*, *G. mangiferae* and *P. spinarum*; to develop a dsRNA cure protocol to the fungus *G. citricarpa*; and to estimate the influence of dsRNA on morphological and physiological characteristics, which are related to the pathogenicity, by comparison of isogenic strains cured or not from dsRNA. The methodology used to determine the number of chromosomes was the hybridization with a telomeric region probe from *Botrytis cinerea* marked with phosphor<sup>32</sup>. The probe was placed into the pTEL plasmid and on membranes containing genomic DNA from *G. citricarpa*, *G. mangiferae* and *P. spinarum*, which were cleaved with restriction enzyme. It was the first time that this methodology was used to estimate the number of chromosomes in these three species of fungus, and the results confirmed the existence of at least 8 chromosomes in *G. mangiferae*. It is also suggested the presence of at least 7 chromosomes in *G. citricarpa* and 6 chromosomes in *P. spinarum*. It became evident that 5 strains of *G. citricarpa* possess a distinctive band of dsRNA of about 3100bp, which probably corresponds to a virus-like particle of the family Totiviridae. According to what is found in the literature, the cure of dsRNA was first obtained for fungi of the genus *Guignardia* by using moderately high temperatures (37°C) and by sampling the tip of the hypha. RAPD and ITS1-5.8-ITS2 sequencing from rDNA confirmed the isogeneity of the cured strains and the strains containing dsRNA. Morphological and physiological characteristics were used to evaluate the influence of dsRNA in the pathogenicity of *G. citricarpa*. Parameters such as radial growth rate, production of spores, formation of pycnidia *in vitro* and on citrus leaves, spore germination and development and melanization of appressoria were analyzed. The results on radial growth rate and production of spores were inconclusive. With the exception of the PC7LD6 strain, it seems that the cure of the dsRNA decreases the production of pycnidia on citrus leaves. Testing the production of spores and appressoria on slides, it was found that in the 33/05 strain, which contained dsRNA, the quantity of spores produced was significantly higher than the quantity produced by the cured strain. The quantity of appressoria produced on slides by the PC33/05 strain was higher than the quantity produced by the PC33/05 1C (cured). However, the appressoria of both preparations always appeared melanized and septated. Thus, it follows that these virus-like particles seem to contribute to the characteristics of pathogenicity of the fungus since it is known that the success in penetrating the host plant depends on the formation of appressoria.

**Keywords:** *Guignardia citricarpa*, *G. mangiferae*, *P. spinarum*, RAPD, ITS, Hybridization, Telomeric Region Probe, RNAdf.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	1-	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS TOTAIS DE QUATRO LINHAGENS DE <i>G. citricarpa</i> .....	73
FIGURA	2-	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS TOTAIS DE 13 LINHAGENS DE <i>G. citricarpa</i> ...	73
FIGURA	3-	PERFIL ELETROFORÉTICO DO DNA GENÔMICO DAS LINHAGENS COM RNAdf APÓS TRATAMENTO COM DNase, NUCLEASE S1 e RNase.....	74
FIGURA	4-	PERFIL ELETROFORÉTICO DO DNA GENÔMICO DOS SETORES DA LINHAGEM PC33/05.....	76
FIGURA	5-	PERFIL ELETROFORÉTICO DO DNA GENÔMICO DAS LINHAGENS DE <i>G. citricarpa</i> APÓS TRATAMENTO PARA CURA DO RNAdf.....	77
FIGURA	6-	PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DE RAPD UTILIZANDO OS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES OPX 07, OPX11, OPX14, OPX19 DAS LINHAGENS CURADAS E COM RNAdf DE <i>Guignardia citricarpa</i> .....	78
FIGURA	7-	ÁRVORE FILOGENÉTICA DAS LINHAGENS ISOGÊNICAS COM E SEM RNAdf E LINHAGENS CONTROLE DE <i>G. citricarpa</i> E <i>G. mangiferae</i> OBTIDA POR MEIO DE SEQUÊNCIAS DA REGIÃO ITS1-5.8S-ITS2 DO rDNA .....	80
FIGURA	8-	MACROMORFOLOGIA DE <i>Guignardia citricarpa</i> APÓS 20 DIAS DE CRESCIMENTO em MC A 28° C.....	81
FIGURA	9-	LINHAGENS ISOGÊNICAS PC7LE10 E PC7LE10 CURADA APÓS 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C EM MEIO BDA.....	84
FIGURA	10-	LINHAGENS ISOGÊNICAS PC7LD6 E PC7LD6 CURADA APÓS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C EM MEIO BDA (A), E EM 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C EM MEIO BDA (B)..	85

FIGURA 11-	LINHAGENS ISOGÊNCIAS PC3C E PC3C CURADA APÓS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C EM MEIO MC (A), EM 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C EM MEIO MC (B), EM 10 DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO BDA (C) E EM 20 DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO BDA (D).....	86
FIGURA 12-	LINHAGENS ISOGÊNICAS PCIAC19/02, PCIAC19/02 A E PCIAC19/02 B APÓS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C EM MEIO MC (A), EM 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C EM MEIO MC (B), EM 10 DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO BDA (C).....	89
FIGURA 13-	LINHAGENS ISOGÊNICAS PC33/05, 33/05 1NC, 33/05 2NC, 33/05 1C, 33/05 2C, 33/05 3C E 33/05 4C APÓS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C EM MEIO MC (A), EM 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C EM MEIO MC (B), EM 10 DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO BDA (C), E EM 20 DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO BDA (D).....	93
FIGURA 14-	FOTOMICROGRAFIA DA SUPERFÍCIE FOLIAR APRESENTANDO PICNÍDIOS APÓS 21 DIAS DE INOCULAÇÃO DAS LINHAGENS ISOGÊNICAS 33/05 1C CURADA (A) E PELA LINHAGEM PC33/05 CONTENDO RNAdf (B) .....	103
FIGURA 15-	FOTOMICROGRAFIA DA SUPERFÍCIE FOLIAR APRESENTANDO PICNÍDIOS APÓS 21 DIAS DE INOCULAÇÃO DAS LINHAGENS ISOGÊNICAS PC7LD6 CURADA (A) E PELA LINHAGEM PC7LD6 CONTENDO RNAdf (B) .....	104
FIGURA 16-	FOTOMICROGRAFIA DE ESPOROS E APRESSÓRIOS DA LINHAGEM PC33/05 APÓS 72 HORAS DE INCUBAÇÃO A 28° C.....	106
FIGURA 17-	FOTOMICROGRAFIA DE ESPOROS E APRESSÓRIOS DA LINHAGEM PC33/05 1C CURADA APÓS 72 HORAS DE INCUBAÇÃO A 28° C.....	107
FIGURA 18-	ELETOFORESE EM GEL DE AGAROSE DO PLASMÍDIO pTEL .....	111



FIGURA 19-	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DO DNA GENÔMICO DAS LINHAGENS DE <i>G. citricarpa</i> , <i>G. mangiferae</i> , <i>Phyllosticta spinarum</i> e <i>Aspergillus niger</i> APÓS CLIVAGEM COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>Bam</i> HI.....	112
FIGURA 20-	ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO DOS ISOLADOS EC86, EC216, PC16 E PC4 DE <i>G. mangiferae</i> .....	113
FIGURA 21-	ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO DO ISOLADO EC86 DE <i>G. mangiferae</i> . SETAS INDICAM BANDAS DE MAIOR INTENSIDADE.....	113

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO	1-	MÉDIA DO CRESCIMENTO RADIAL DAS LINHAGENS PC7LE10 E PC7LE10 CURADA APÓS 10 E 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28° C EM MEIO MC E BDA.....	83
GRÁFICO	2-	MÉDIA DO CRESCIMENTO RADIAL DAS LINHAGENS PC7LD6 E PC7LD6 CURADA APÓS 10 E 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28° C EM MEIO MC E BDA.....	83
GRÁFICO	3-	MÉDIA DO CRESCIMENTO RADIAL DAS LINHAGENS PC3C E PC3C CURADA APÓS 10 E 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28° C EM MEIO MC E BDA.....	84
GRÁFICO	4-	MÉDIA DO CRESCIMENTO RADIAL DA LINHAGEM PC1AC19/02 E SEUS SETORES CURADOS PC1AC19/02 A E PC1AC19/02 B APÓS 10 E 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28° C EM MEIO MC E BDA.....	88
GRÁFICO	5-	MÉDIA DO CRESCIMENTO RADIAL DA LINHAGEM PC33/05 E SEUS SETORES NÃO CURADOS 33/05 1NC E 33/05 2NC E OS SETORES CURADOS 33/05 1C, 33/05 2C, 33/05 3C E 33/05 4C APÓS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C EM MEIO BDA.....	90
GRÁFICO	6-	MÉDIA DO CRESCIMENTO RADIAL DA LINHAGEM PC33/05 E SEUS SETORES NÃO CURADOS 33/05 1NC E 33/05 2NC E OS SETORES CURADOS 33/05 1C, 33/05 2C, 33/05 3C E 33/05 4C APÓS 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C EM MEIO BDA.....	91
GRÁFICO	7-	MÉDIA DO CRESCIMENTO RADIAL DA LINHAGEM PC33/05 E SEUS SETORES NÃO CURADOS 33/05 1NC E 33/05 2NC E OS SETORES CURADOS 33/05 1C, 33/05 2C, 33/05 3C E 33/05 4C APÓS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C EM MEIO MC.....	91
GRÁFICO	8-	MÉDIA DO CRESCIMENTO RADIAL DA LINHAGEM PC33/05 E SEUS SETORES NÃO CURADOS 33/05 1NC E 33/05 2NC E OS SETORES CURADOS 33/05 1C, 33/05 2C, 33/05 3C E 33/05 4C APÓS 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C EM MEIO MC.....	92

GRÁFICO	9-	NÚMERO DE ESPOROS PRODUZIDOS PELAS LINHAGENS PC7LD6 E PC7LD6 CURADA APÓS 10 E 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28° C EM MEIO MC E BDA.....	97
GRÁFICO	10-	NÚMERO DE ESPOROS PRODUZIDOS PELAS LINHAGENS PC3C E PC3C CURADA APÓS 10 E 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28° C EM MEIO MC E BDA.....	97
GRÁFICO	11-	NÚMERO DE ESPOROS PRODUZIDOS PELA LINHAGEM PC19/02 E SEUS SETORES CURADOS PC19/02 A E PC19/02 B APÓS 10 E 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28° C EM MEIO MC E BDA.....	98
GRÁFICO	12-	NÚMERO DE ESPOROS PRODUZIDOS PELAS LINHAGENS PC7LE10 E PC7LE10 CURADA APÓS 10 E 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28° C EM MEIO MC E BDA.....	98
GRÁFICO	13-	NÚMERO DE ESPOROS PRODUZIDOS PELA LINHAGEM PC33/05, SEUS SETORES NÃO CURADOS 33/05 1NC, 33/05 2NC, E PELOS SETORES CURADOS 33/05 1C, 33/05 2C, 33/05 3C E 33/05 4C APÓS 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28° C EM MEIO MC.....	100
GRÁFICO	14-	NÚMERO DE ESPOROS PRODUZIDOS PELA LINHAGEM PC33/05, SEUS SETORES NÃO CURADOS 33/05 1NC, 33/05 2NC, E PELOS SETORES CURADOS 33/05 1C, 33/05 2C, 33/05 3C E 33/05 4C APÓS 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28° C EM MEIO BDA.....	101
GRÁFICO	15-	PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS PELAS LINHAGENS DE <i>G. citricarpa</i> NA SUPERFÍCIE DE FOLHAS DE CITROS AUTOCLAVADAS E INCUBADAS EM ÁGAR-ÁGUA POR 21 DIAS A 28° C.....	102
GRÁFICO	16-	NÚMERO MÉDIO DE ESPOROS GERMINADOS POR cm EM MEMBRANA DE CELOFANE APÓS 72 HORAS DE INCUBAÇÃO A 28° C.....	105

## LISTA DE TABELAS

TABELA	1- HOSPEDEIRO, ANO E LOCAL DE ISOLAMENTO DAS LINHAGENS FÚNGICAS UTILIZADAS.....	48
TABELA	2- COMPONENTES E CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS NAS REAÇÕES DE RAPD.....	62
TABELA	3- OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE RAPD.....	62
TABELA	4- COMPONENTES E CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS NA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS1, 5,8S E ITS2 DO DNA RIBOSSOMAL .....	63
TABELA	5- SEQÜÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS1, 5,8S E ITS2 DO DNA RIBOSSOMAL.....	63
TABELA	6- AVALIAÇÃO GERAL DAS LINHAGENS SUBMETIDAS À CURA EM COMPARAÇÃO AOS ISOLADOS DE <i>G. citricarpa</i> .....	109

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO	1- ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS PC7LE10 E PC7LE10 CURADA QUANTO AO CRESCIMENTO MICELIAL EM MC E BDA APÓS 10 E 20 DIAS DE CRESCIMENTO.....	132
ANEXO	2- ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS PC7LD6 E PC7LD6 CURADA QUANTO AO CRESCIMENTO MICELIAL EM MC E BDA APÓS 10 E 20 DIAS DE CRESCIMENTO.....	132
ANEXO	3- ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS PC3C E PC3C CURADA QUANTO AO CRESCIMENTO MICELIAL EM MC E BDA APÓS 10 E 20 DIAS DE CRESCIMENTO.....	133
ANEXO	4- ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS PC19/02, PC19/02 A E PC19/02 B, SENDO A E B SETORES CURADOS, QUANTO AO CRESCIMENTO MICELIAL EM MC E BDA APÓS 10 E 20 DIAS DE CRESCIMENTO.....	134
ANEXO	5- ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS 33/05, 33/05 1NC, 33/05 2NC (SETORES CURADOS), 33/05 1C, 33/05 2C E 33/05 3C E 33/05 4C (SETORES NÃO CURADOS), QUANTO AO CRESCIMENTO MICELIAL EM BDA APÓS 10 DIAS DE CRESCIMENTO.....	134
ANEXO	6- ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS 33/05, 33/05 1NC, 33/05 2NC (SETORES CURADOS), 33/05 1C, 33/05 2C E 33/05 3C E 33/05 4C (SETORES NÃO CURADOS), QUANTO AO CRESCIMENTO MICELIAL EM BDA APÓS 20 DIAS DE CRESCIMENTO.....	135
ANEXO	7- ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS 33/05, 33/05 1NC, 33/05 2NC (SETORES CURADOS), 33/05 1C, 33/05 2C E 33/05 3C E 33/05 4C (SETORES NÃO CURADOS), QUANTO AO CRESCIMENTO MICELIAL EM MC APÓS 10 DIAS DE CRESCIMENTO.....	136

ANEXO	8- ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS 33/05, 33/05 1NC, 33/05 2NC (SETORES CURADOS), 33/05 1C, 33/05 2C E 33/05 3C E 33/05 4C (SETORES NÃO CURADOS), QUANTO AO CRESCIMENTO MICELIAL EM MC APÓS 20 DIAS DE CRESCIMENTO.....	136
ANEXO	9- ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS PC7LE10 E PC7LE10 CURADA QUANTO A PRODUÇÃO DE ESPOROS APÓS INCUBAÇÃO EM MC E BDA DURANTE 20 DIAS A 28 °C.....	137
ANEXO	10- ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS PC7LD6 E PC7LD6 CURADA QUANTO A PRODUÇÃO DE ESPOROS APÓS INCUBAÇÃO EM MC E BDA DURANTE 20 DIAS A 28 °C.....	138
ANEXO	11- ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS PC3C E PC3C CURADA QUANTO A PRODUÇÃO DE ESPOROS APÓS INCUBAÇÃO EM MC E BDA DURANTE 20 DIAS A 28°C.....	138
ANEXO	12- ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS PC19/02, PC19/02 A E PC19/02 B (SETORES CURADOS) QUANTO A PRODUÇÃO DE ESPOROS APÓS INCUBAÇÃO EM MC E BDA DURANTE 20 DIAS A 28°C.....	139
ANEXO	13- ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS PC33/05, 33/05 1NC, 33/05 2NC (SETORES NÃO CURADOS), 33/05 1C, 33/05 2C, 33/05 3C E 33/05 4C (SETORES CURADOS) QUANTO A PRODUÇÃO DE ESPOROS APÓS INCUBAÇÃO EM BDA DURANTE 20 DIAS A 28 °C.....	139
ANEXO	14- ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS PC33/05, 33/05 1NC, 33/05 2NC (SETORES NÃO CURADOS), 33/05 1C, 33/05 2C, 33/05 3C E 33/05 4C (SETORES CURADOS) QUANTO A PRODUÇÃO DE ESPOROS APÓS INCUBAÇÃO EM MC DURANTE 20 DIAS A 28 °C.....	140

ANEXO	15-	ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS PC7LE10 E PC7LE10 CURADA QUANTO A PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS EM FOLHA DE CITROS AUTOCLAVADA EM ÁGAR-ÁGUA COM 3% DE MC APÓS 21 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C.....	141
ANEXO	16-	ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS PC3C E PC3C CURADA QUANTO A PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS EM FOLHA DE CITROS AUTOCLAVADA EM ÁGAR-ÁGUA COM 3% DE MC APÓS 21 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28 °C.....	141
ANEXO	17-	ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS PC7LD6 E PC7LD6 CURADA QUANTO A PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS EM FOLHA DE CITROS AUTOCLAVADA EM ÁGAR-ÁGUA COM 3% DE MC APÓS 21 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C.....	142
ANEXO	18-	ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS PC1AC1902, PC1AC1902 A E PC1AC1902 B (SETORES CURADOS) QUANTO A PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS EM FOLHA DE CITROS AUTOCLAVADA EM ÁGAR-ÁGUA COM 3% DE MC APÓS 21 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28 °C.....	142
ANEXO	19-	ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS 33/05, 1A, 1B (SETORES CURADOS), 2A, 2B E 3D (SETORES NÃO CURADOS) E 33/05 CURADA QUANTO A PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS EM FOLHA DE CITROS AUTOCLAVADA EM ÁGAR-ÁGUA COM 3% DE MC APÓS 21 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28 °C.....	143
ANEXO	20-	ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS 33/05 E 2 A QUANTO AO NÚMERO DE ESPOROS GERMINADOS APÓS 72 HORAS DE INCUBAÇÃO A 28 °C.....	144
ANEXO	21-	CRESCIMENTO RADIAL DAS LINHAGENS DE <i>G. citricarpa</i> APÓS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C NOS MEIOS DE CULTURA MC E BDA.....	145

ANEXO	22- CRESCIMENTO MICELIAL DAS LINHAGENS DE <i>G. citricarpa</i> APÓS 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C NOS MEIOS DE CULTURA MC E BDA.....	146
ANEXO	23- MAPA DO PLASMÍDIO p Bluescript II KS+.....	147



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b>	
3.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS E FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.....	23
3.2 O GÊNERO <i>Guignardia</i> (Viala e Ravaz) E SEU ANAMORFO <i>Phyllosticta</i> (Pers. Ex Desm.).....	26
3.3 MANCHA PRETA DO CITROS.....	30
3.4 MARCADORES MOLECULARES.....	31
3.4.1 Marcadores RAPD.....	34
3.4.2 Marcadores ITS.....	36
3.5 RNA DUPLA FITA EM FUNGOS.....	37
3.6 CURA DO RNA DUPLA FITA EM FUNGOS.....	43
3.7 ESTIMATIVA DO NÚMERO DE CROMOSSOMOS.....	45
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	
4.1 LINHAGENS UTILIZADAS.....	48
4.2 MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS.....	49
4.2.1 Meio Ágar-Água.....	49
4.2.2 Meio BDA.....	49
4.2.3 Meio Completo (MC).....	50
4.2.4 Meio Completo (MC) com Ciclohexamida.....	51
4.2.5 Meio LA (Luria Ágar).....	51
4.2.6 Meio LB (Luria-Bertani).....	51
4.3 SOLUÇÕES E TAMPÕES.....	51
4.3.1 Clorofane.....	51
4.3.2 Clorofil.....	52
4.3.3 DNase.....	52
4.3.4 Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 10%.....	52

4.3.5 Fenol saturado.....	52
4.3.6 GET.....	52
4.3.7 Gel de Agarose 1%.....	53
4.3.8 Gel de Agarose 1,5%.....	53
4.3.9 Nuclease S1.....	53
4.3.10 RNase.....	53
4.3.11 Solução de Vitaminas.....	53
4.3.12 Solução Salina.....	54
4.3.13 Solução “TWEN 80”.....	54
4.3.14 Solução de Acetato de Potássio 3M (KOAc) pH 5,2.....	54
4.3.15 Solução de Brometo de Etídio.....	55
4.3.16 Solução EDTA 0,5M pH 8,0 (ESTOQUE).....	55
4.3.17 Solução TRIS-HCl 1M pH 8,0 (ESTOQUE).....	55
4.3.18 Solução de Ciclohexamida (20 mg/mL).....	55
4.3.19 Solução de Lise.....	56
4.3.20 Solução Desnaturante.....	56
4.3.21 Solução Neutralizante.....	56
4.3.22 Tampão de corrida (“gel loading buffer”).....	56
4.3.23 Tampão de Extração (RAEDER; BRODA, 1985).....	57
4.3.24 Tampão TE.....	57
4.3.25 Tampão TBE 5X (Solução Estoque).....	57
4.3.26 Tampão TAE 10X.....	57
4.3.27 Tampão de transferência SSC 20X.....	58
4.3.28 Tampão OLB.....	58
4.4 PREPARO DE MATERIAL.....	58
4.4.1 Esterilização.....	58
4.4.2 Incubação.....	59
4.5 INFLUÊNCIA DO RNAdf EM <i>G. citricarpa</i> .....	59
4.5.1 Extração de Ácidos Nucléicos totais (RAEDER; BRODA, 1985 modificado por BLANCO, 1999).....	59

4.5.2 Identificação da Presença de RNA dupla fita.....	60
4.5.3 Confirmação da natureza das bandas deRNAdf.....	60
4.5.4 Cura do RNAdf.....	61
4.5.5 Análise da Identidade Genética por RAPD.....	61
4.5.6 Seqüenciamento da Região ITS1-5,8S-ITS2 DO Rdna.....	63
4.5.6.1 Amplificação.....	63
4.5.6.2 Purificação do DNA.....	64
4.5.6.3 Reação de seqüenciamento.....	64
4.5.6.4 Purificação da Reação de Seqüenciamento.....	65
4.5.6.5 Edição e Análise das seqüências.....	65
4.5.6.6 Análise Filogenética.....	66
4.5.7 Avaliação da Influência do RNAdf na morfologia de <i>G. citricarpa</i> .....	66
4.5.7.1 Caracterização Macromorfológica.....	66
4.5.7.2 Produção de Esporos.....	67
4.5.7.3 Formação de Picnídios de <i>G. citricarpa</i> em folhas autoclavadas.....	67
4.5.7.4 Melanização de Apressório e Germinação de Esporos.....	68
4.6 ESTIMATIVA DO NÚMERO DE CROMOSSOMOS.....	68
4.6.1 Transformação de <i>Escherichia coli</i> .....	68
4.6.1.1 Obtenção de células competentes.....	68
4.6.1.2 Transformação.....	69
4.6.2 Purificação do Plasmídio.....	69
4.6.3 <i>Southern Blotting</i> e Hibridização.....	70
4.6.3.1 <i>Southern Blotting</i> .....	70
4.6.3.2 Marcação da sonda.....	71
4.6.3.3 Hibridização.....	71
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	
5.1 INFLUÊNCIA DO RNAdf EM <i>G. citricarpa</i> .....	72
5.1.1 Caracterização do RNAdf.....	72
5.1.2 Cura do RNAdf.....	75
5.1.3 Análise Molecular.....	77

5.1.3.1 RAPD.....	77
5.1.3.2 Seqüenciamento da Região ITS15,8S-ITS2 DO Rdna.....	79
5.1.4 Análise Morfológica.....	81
5.1.4.1 Macromorfologia.....	81
5.1.4.2 Crescimento Radial.....	82
5.1.4.3 Esporulação.....	96
5.1.4.4 Produção de Picnídios em Folhas Cítricas.....	101
5.1.4.5 Melanização de Apressório e Germinação de Esporos.....	104
5.2 ESTIMATIVA DO NÚMERO DE CROMOSSOMOS.....	110
5.2.1 Obtenção do Plasmídio pTEL.....	110
5.2.2 <i>Southern Blotting</i> e Hibridização.....	111
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>115</b>
<b>7 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>116</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>132</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O fungo *Guignardia citricarpa* é o agente causal da doença Mancha Preta dos Citros (MPC), que, atualmente, está distribuída em regiões subtropicais do mundo, entre elas, o Brasil (GÓES *et al.*, 2005). A MPC caracteriza-se pelas lesões com bordas salientes e com depressão no centro, onde se observam pequenos pontos pretos, os picnídios. As lesões podem atingir os frutos maduros ou no início de maturação, podendo aparecer após a colheita, no transporte e armazenamento (ROBBS; BITTENCOURT, 1995). Esta doença tem causado grande prejuízo aos citricultores brasileiros. O gênero *Guignardia*, descrito em 1982 por Viala e Ravaz, compreende as formas teleomórficas de espécies de *Phyllosticta* e de alguns outros gêneros relacionados de fungos mitosporicos, geralmente saprófitas ou semiparasitas de folhas (SIVANESAN, 1984). As estruturas de frutificação são os picnídios, que macroscopicamente são pequenos, globosos, pretos e semi-eruptivos. A fase sexuada corresponde à produção de ascósporos em pseudotécios, os quais se encontram em número de oito no interior dos ascos (SIVANESAN, 1984). Vários fungos deste gênero já foram descritos como endofíticos em diversos hospedeiros vegetais.

Quando um fungo é encontrado no interior de plantas durante pelo menos uma parte de seu ciclo de vida e, aparentemente, não lhe causa danos, é denominado endofítico. Os fungos endofíticos podem ser identificados por exame microscópico do tecido vegetal ou podem ser isolados em meios de cultura, pois geralmente são intercelulares, enquanto que, os fungos fitopatogênicos são apontados como causadores de várias doenças. (STONE, 1988; CARROL, 1988; MOORE-LANDECKER, 1996). Os modelos de interação fungo endofítico e planta ainda não são totalmente conhecidos, mas vários fatores envolvidos na colonização da planta devem ser comuns com espécies fitopatogênicas. O sucesso da penetração na planta hospedeira pela maioria dos fungos, patogênicos ou não, depende da diferenciação do micélio em estruturas especializadas, denominadas apressórios (KUBO *et al.*, 1996).

A presença de RNAs dupla fita (RNA<sub>df</sub>) em fungos tem sido relacionada a diversas alterações fenotípicas nos seus hospedeiros. Em fungos fitopatogênicos,

vários autores têm relacionado a existência destes elementos com virulência alterada, em geral, reduzida. A existência destas micoviroses nestes fungos também vêm sendo relacionadas com outras alterações morfológicas, como variações nas taxas de crescimento e reprodução destes fungos (KAVA-CORDEIRO, 2004).

Embora haja um grande número de relatos sobre RNAs dupla fita em fungos, o significado biológico dessas micoviroses, incluindo sua influência na patogenicidade e/ou influência no fenótipo do hospedeiro, ainda é incerto para a maioria dos casos. Para que a interferência estabelecida pelo RNAdf seja compreendida, é necessário obter linhagens isogênicas livres de RNAdf e assim comparar estas linhagens quanto às possíveis alterações morfológicas e também quanto à capacidade de invasão em seus hospedeiros com as linhagens com o RNAdf. A cura do RNAdf pode ser realizada utilizando ciclohexamida no meio de cultura ou através do isolamento de colônias monospóricas. Entretanto, tais metodologias já foram testadas sem sucesso no fungo *G. citricarpa* (MONTENEGRO, 2007). Assim, é premente o desenvolvimento de uma metodologia de cura para este fungo. A comprovação da isogenia das linhagens pode ser realizada utilizando-se marcadores moleculares e seqüenciamento de DNA.

Algumas técnicas moleculares utilizadas principalmente em fungos para a caracterização da identidade do isolado são: Polimorfismos do DNA Amplificados ao Acaso (RAPDs) e Seqüenciamento das Regiões Internas Transcritas (ITS1 e ITS2) do DNA ribossômico (rDNA). Além de avaliarem a variabilidade genética, estes marcadores moleculares podem determinar relações filogenéticas, e também colaborar na identificação de um determinado isolado. As seqüências codificantes do rDNA evoluem muito lentamente e são altamente conservadas, possibilitando a sua utilização em estudos de organismos pouco relacionados taxonomicamente. Ao contrário do rDNA, as regiões espaçadoras internas destes genes, conhecidas como ITS, evoluem rapidamente, apresentando alto polimorfismo, e sendo desta forma, de grande interesse nos estudos filogenéticos de gêneros, espécies e populações (WHITE; MORROW, 1990).

As espécies *G. citricarpa*, *G. mangiferae* e *Phyllosticta spinarum* são morfológicamente muito semelhantes e colonizam plantas cítricas. Entretanto, enquanto

*G. citricarpa* causa a Mancha Preta dos Citros, *G. mangiferae* e *P. spinarum* são endofíticas neste hospedeiro. Pouco se sabe sobre a genética destas espécies. Em 1999, Blanco sugeriu, por meio de eletroforese em campo pulsado, que a espécie *G. mangiferae* possui pelo menos 8 cromossomos, totalizando um genoma de aproximadamente 21,5 Mb. A técnica de eletroforese em campo pulsado revolucionou o estudo citogenético da maioria dos fungos, sendo possível à elaboração de um cariótipo eletroforético (o genoma em bandas cromossômicas) determinando o número e o tamanho dos cromossomos (SKINNER; BUDDE; LEONG, 1991). Outra forma de determinar o número de cromossomos de determinada espécie fúngica é pela hibridização de DNA genômico digerido com uma enzima de restrição, com sondas de regiões teloméricas.

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- Desenvolver um protocolo de cura de RNA*df* para o fungo *G. citricarpa*;
- Avaliar a influência de RNA*df* em características morfológicas e relacionadas à patogenicidade como: crescimento radial, produção de esporos, germinação e melanização de apressório, comparando linhagens isogênicas do fungo *G. citricarpa* curadas e não curadas do RNA*df*;
- Comprovar a isogenia das linhagens curadas e infectadas com RNA*df* por meio de marcadores moleculares do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), e por meio de seqüências da região ITS1-5,8S- ITS2 do DNA ribossomal;
- Determinar o número de cromossomos em linhagens de *Guignardia citricarpa*, *G. mangiferae* e *Phyllosticta spinarum* utilizando hibridização com sonda heteróloga de região telomérica.



### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS E FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

São denominados endofíticos aqueles fungos encontrados no interior de plantas durante todo o seu ciclo de vida ou parte dele, e que aparentemente não causam danos ao hospedeiro. Considera-se, que entre esses fungos e seus hospedeiros, existe uma relação mutualística neutra. Por serem geralmente intercelulares, os fungos endofíticos podem ser identificados por exame microscópico do tecido vegetal, ou podem ser isolados em meios de cultura. Enquanto que, os fungos fitopatogênicos são apontados como causadores de várias doenças (STONE, 1988; CARROLL, 1988; MOORE-LANDECKER, 1996).

Dentre os fungos de isolamento freqüente, destaca-se o gênero *Phyllosticta*, que corresponde à forma anamórfica do ascomiceto *Guignardia*. A separação de espécies em *Phyllosticta* é baseada principalmente no hospedeiro do qual foi isolado, e em características morfológicas dos picnídios, conídios e micélio. Na taxonomia deste fungo, a importância da especificidade com o hospedeiro tem sido superestimada, pois, somente uma pequena fração de fitopatogênicos é realmente específica a um hospedeiro. Assim, existe uma dificuldade muito grande em se classificar isolados desse gênero. Fungos do gênero *Guignardia* vêm sendo associados a várias doenças vegetais, inclusive à Mancha Preta de Citros (MPC). Linhagens deste gênero são isoladas do interior de tecidos de várias espécies de citros sem a MPC, ou seja, em plantas assintomáticas, sendo então denominadas de endofíticas. Com o avanço das técnicas de biologia molecular, vem sendo possível traçar um perfil mais preciso na caracterização destas espécies e várias classificações estão sendo revistas (VAN DER AA, 1973; CARROLL; CARROLL, 1978; PETRINI, 1986; LEUCHTMANN *et al.*, 1992; JOHNSTON; FULLERTON, 1988; SIVANESAM, 1984).

Os modelos de interação fungo endofítico e planta ainda não são totalmente conhecidos, mas vários fatores envolvidos na colonização da planta devem ser comuns em espécies fitopatogênicas. O sucesso da penetração na planta hospedeira pela

maioria dos fungos, patogênicos ou não, depende da diferenciação da hifa em estruturas especializadas, denominadas apressórios (KUBO *et al.*, 1996). Algumas espécies de *Colletotrichum*, *Magnaporthe* e *Phyllosticta* produzem apressório complexo e fortemente pigmentado com melanina (SHAW; KUO; HOCH, 1998). Este pigmento media a formação de uma pressão hidrostática essencial para a ação mecânica do apressório (HOWARD; FERRARI, 1989; BOURETT; HOWARD, 1990). O tratamento de conídios com inibidores de síntese de melanina como Triciclazol e Piroquilon, resulta na produção de apressórios não pigmentados e não funcionais, acarretando a incapacidade do fungo penetrar na planta (WOLOSHUK; SISLER, 1982; BELL; WHEELER, 1986; DEAN, 1997).

Ainda não existe uma distinção exata entre microrganismos epifíticos, endofíticos e patogênicos. Como bem expressa Azevedo (1998), um microrganismo epifítico pode, eventualmente, ser encontrado dentro de um vegetal; um endofítico, em certas condições, pode tornar-se um patógeno e um patógeno, em determinadas condições, não afeta o seu hospedeiro, podendo ser considerado um endofítico.

A comunidade endofítica, cuja composição varia em função do hospedeiro e das condições ambientais, se inter-relaciona dentro da planta, em um equilíbrio harmônico. A quebra dessa harmonia afeta o comportamento de todos os integrantes da comunidade, dando condições para que fungos oportunistas manifestem seu potencial patogênico ao hospedeiro (MAKI, 2006).

Ocorre também, em outros casos, como observa Clay, (1987) em que as interações planta-endofítico geram um melhor desempenho da planta, como maior tolerância ao ataque de insetos (CARROLL; CARROLL, 1978; CLEMENTE *et al.*, 1990; CARROLL 1988), resistência a doenças e parasitas (WHITE; COLE, 1985; WHITE; COLE, 1986; CLARK; MILLER; WHITNEY, 1989; CALHOUN *et al.*, 1992) e antiherbivoria pela produção de toxinas (WHITE; COLE, 1985).

Bactérias e fungos endofíticos, podem ser capazes de produzir metabólitos secundários que inibem o desenvolvimento de patógenos (LI *et al.*, 2001; STROBEL *et al.*, 2001; ZOU; TAN, 2001), anti-helmínticos e inseticidas (AZEVEDO *et al.*, 2000;

ESPOSITO; AZEVEDO, 2004), apresentando grande potencial que pode ser explorado na agricultura (ZOU; TAN, 2001).

O isolamento de fungos endofíticos pertencentes a espécies historicamente patogênicas tem levado ao uso do termo “endofitismo” como sinônimo de latência, presumindo que alterações nas condições microambientais levariam ao surgimento de sintomas, sugerindo assim transições entre os estados endofítico e patogênico. Este é o caso de alguns sistemas plantas-microrganismos, mas não pode ser considerado regra (KAVA-CORDEIRO, 2004).

Os microrganismos endofíticos penetram nos tecidos vegetais de seus hospedeiros pelos estômatos e raízes, ferimentos ou cicatrizes, ou ainda através da secreção de enzimas hidrolíticas (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004). A penetração pode ocorrer por meio de esporos levados pelo vento ou hifas que invadem os tecidos. Muitos endófitos produzem massas de conídios delgados, característica associada com a dispersão por chuvas (RIBEIRO, 1995). Outra forma de propagação se dá pela transmissão vertical por meio de sementes (WHITE; MORGAN-JONES; MORROW, 1993; CLAY, 2004).

Utilizando a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) Strobel *et al.* (2000) detectou acérvulos de *Pestalotiopsis microspora* e estruturas sexuadas de *P. hansenii*, ambos fungos endofíticos produtores de taxol. Pimentel *et al.* (2001a) observou conídios, conidióforos e fiálides dos fungos entomopatogênicos *Beauveria* sp. isolado do milho e *Paecilomyces* sp. isolados do milho e da soja. Glienke-Blanco *et al.* (2002), analisando a variabilidade genética de *G. citricarpa* isolada de citros observaram picnidiósporos, conidióforos, ascos jovens, ascósporos, hifas e outras estruturas através de microscopia óptica.

Independentemente dos métodos utilizados para detecção dos microrganismos endofíticos, são importantes os cuidados que devem ser tomados durante o processo de isolamento, removendo a microbiota epifítica e outros contaminantes externos da superfície das folhas, pecíolos e sementes (MOORE-LANDECKER, 1996).

Existe uma diversidade enorme de microrganismos endofíticos presentes no interior de plantas saudáveis com grande potencial para serem estudados. Dreyffus e

Chapella (1994) estimam que ocorram, no mínimo, um milhão de espécies de fungos endofíticos. No Brasil, exemplos desta diversidade podem ser encontrados nos trabalhos de Pereira, Azevedo e Petrini (1993); Pereira (1993); Glienke (1995); Souza (1996); Araújo (2000); Rodrigues e Dias-Filho (1996); Azevedo (1998); Maitan (1998); Araújo, Silva e Azevedo (2000); Pimentel *et al.* (2001a); Pimentel *et al.* (2001b); Souza, Astolfi e Pereira (2001); Souza *et al.* (2004); Rubini *et al.* (2005); Almeida, Yara e Almenida (2005).

De cada planta hospedeira pode-se isolar espécies endofíticas com grande diversidade genética. Tal diversidade foi encontrada em isolados do fungo *Guignardia citricarpa* e *G. mangiferae*, obtidos de citros (GLIENKE, 1995), em duas espécies de *Colletotrichum* sp. isoladas de *Maytenus ilicifolia* (PILEGGI, 2006) e também *Pestalotiopsis* sp. isolados de *Maytenus ilicifolia* (FIGUEIREDO, 2006). A diversidade das espécies pode variar de acordo com o hospedeiro, distribuição geográfica, idade da planta, condições ecológicas e sazonais, incluindo altitude e precipitação. Uma ou duas espécies são predominantes como endofíticas em um dado hospedeiro, enquanto outros isolados são pouco freqüentes (CARROLL; CARROLL, 1978; ARNOLD *et al.* 2003). Além da produção de antimicrobianos, fungos endofíticos podem excluir patógenos que ocupem o mesmo nicho ecológico, por competição, como relatado por Bao e Lazarovits (2001) com *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* patogênico e *Fusarium oxysporum* não patogênico.

### 3.2 O GÊNERO *Guignardia* (Viala e Ravaz) E SEU ANAMORFO *Phyllosticta* (Pers. Ex Desm.)

O gênero *Guignardia* foi descrito em 1982 por Viala e Ravaz, e compreende as formas teleomórficas de espécies de *Phyllosticta* e de alguns outros gêneros relacionados de fungos mitospóricos geralmente saprófitas ou semiparasitas de folhas (SIVANESAN, 1984).

Diversos autores isolaram espécies de *Phyllosticta* de plantas aparentemente saudáveis, descrevendo-as como endofíticas (CARROLL; CARROLL, 1978; PETRINI,

1986; LEUCHTMANN *et al.*, 1992; GLIENKE, 1995; PENNA, 2000). No entanto, existe um grande número de relatos citando este gênero como fitopatogênico de diversas culturas com grande importância econômica como arroz (SUGHA; SINGH; SHARMA, 1986), cana-de-açúcar (PONS, 1990), tabaco (PATEL; PATEL; TILVA, 1988), eucalipto (CROUS *et al.*, 1993) e também frutíferas como abacate e tomate (BAKER, 1938), manga e mamão (McMILLAN, 1986), uva (IBRAHIM; BAYCA, 1989) e, principalmente, em citros (McONIE, 1964; HERBERT; GRECH, 1985; JOHNSTON; FULLERTON, 1988).

O fungo *Guignardia citricarpa* Kiely (anamorfo: *Phyllosticta citricarpa* (McALP.) Van Der Aa) é um Loculoascomiceto da ordem Dothideales, família Dothideaceae. Possui estroma plectenquimatoso, pseudotécio globoso a subgloboso medindo 125 a 360 µm de diâmetro contendo um poro de 14 a 16 µm e paredes espessas com 20 a 22 µm. Seu asco apresenta forma de clava, arredondado na extremidade superior e é bitunicado. Contém oito ascósporos unicelulares, hialinos, ligeiramente cinzentos, rombóides, contendo grânulos e um grande vacúolo central. Os ascósporos são cobertos com um quepe gelatinoso nas extremidades. Segundo Sivanessam (1984) pseudoparáfises são encontradas em pseudotécios maduros. De acordo com Johnston e Fullerton (1988), as formas anamorfas e teleomorfa geralmente são encontradas associadas.

Cardoso-Filho (2003) avaliou o uso de indutores de resistência *Saccharomyces cerevisiae*, Bion<sup>®</sup> (acibenzolar- S- metil) e ácido salicílico ao fitopatógeno *G. citricarpa*. O autor destaca que os compostos presentes no albedo (mesocarpo) da laranja, como a celulose, carboidratos solúveis, pectinas, compostos fenólicos (flavonóides), aminoácidos e vitaminas podem exibir ação antimicrobiana para o controle da MPC. Neste contexto, ele avaliou os extratos produzidos pelo albedo da laranja e comprovou ação fungicida ou fungistática, inibindo a germinação, esporulação e crescimento micelial *in vitro*, de *G. citricarpa*.

Fialho (2004) avaliou *in vitro*, o potencial de linhagens de *S. cerevisiae* como agentes no controle biológico contra *G. citricarpa*, nos frutos pós-colheita. Rodrigues (2006) avaliou o efeito dos principais fungicidas utilizados no campo para o controle da

doença. Também avaliou 96 linhagens de fungos, para a seleção de potenciais agentes no controle biológico, demonstrando que algumas espécies de *Trichoderma*, são capazes de atuar *in vitro*, como biocontroladores do fitopatógeno *G. citricarpa*.

Dados moleculares têm fornecido informações para que vários autores revisem e ajustem a classificação de espécies de *G. citricarpa* e *Phyllosticta*. Estes dados também vêm sendo utilizados para demonstrar o grande grau de variabilidade genética intraespecífica. Blanco (1999) e Christo (2002) observaram esta variabilidade entre linhagens isoladas de lesão de Mancha Preta de Citros (MPC), ou seja, linhagens de *G. citricarpa*, utilizando dados de RAPD. Esta variabilidade também foi evidenciada em linhagens isoladas em plantas assintomáticas, atualmente descritas como *Guignardia mangiferae* (GLIENKE-BLANCO *et al.*, 2002; CHRISTO, 2002; BAAYEN *et al.*, 2002; RODRIGUES, 2004).

Em 1999, Blanco comparou geneticamente, por meio de marcadores de RAPD, linhagens de populações patogênicas e endofíticas de *Guignardia* spp. de diversas regiões e hospedeiros. Constatou-se a existência de três populações de *Guignardia* geneticamente muito diferentes coexistindo em citros, sendo duas endofíticas e uma patogênica, sugerindo que talvez estas três populações pudessem pertencer a espécies distintas. O desenvolvimento de um par de oligonucleotídeo iniciador capaz de amplificar um fragmento de 370 pb, específico para linhagens patogênicas de *G. citricarpa*, veio a corroborar para distinção genética entre estes grupos (GLIENKE *et al.*, 2007).

Análises morfológicas de uma linhagem de *Phyllosticta*, isolada de Ericaceae, realizadas por Okani (2001), permitiram a sua inclusão no gênero *Guignardia* (Anamorfo: *Phyllosticta*). Análises moleculares da região ITS1, 5,8S e ITS2 indicaram a existência de total identidade com o fungo *Phyllosticta capitalensis* e os autores denominaram esta nova espécie de *G. endophyllicola*. Estudos de populações de *G. citricarpa* (Anamorfo: *Phyllosticta citricarpa*) e *Guignardia* spp. provenientes de diversas regiões e espécies hospedeiras, foram realizados por Glienke-Blanco *et al.* (2002) e Baayen *et al.* (2002), através de análises de seqüências ITS, marcadores RAPD, AFLP e características morfológicas. Os resultados revelaram que as linhagens isoladas de

lesões de MPC pertencem à espécie *G. citricarpa*, enquanto as linhagens endofíticas, isoladas de plantas e frutos sadios de *Citrus* spp. pertencem à espécie *G. mangiferae* (Anamorfo: *Phyllosticta capitalensis*), elou a outras descrições sinônimas, como: *G. endophyllicola* (Anamorfo: *Phyllosticta capitalensis*), *Guignardia* sp (Anamorfo: *P. anacardiacearum*), *Guignardia psidii*, entre outros. Os autores sugerem, ainda, que a denominação mais correta para a forma teleomórfica de *Phyllosticta capitalensis*, seria *Guignardia mangiferae*, por ter sido a nomenclatura mais antiga associada à espécie. Deve-se considerar, portanto, que o simples isolamento de *Guignardia* a partir de tecidos sintomáticos ou ao contrário, isolamentos a partir de tecidos assintomáticos, não se constitui em garantia de se tratar de *G. citricarpa* e *G. mangiferae*, respectivamente, como demonstrado por Baldassari (2005).

A espécie *Guignardia mangiferae* (*Phyllosticta mangiferae*) tem sido descrita na literatura como sendo o agente causal de necrose em folhas de manga (MENEZES; OLIVEIRA, 1993), apresentando características morfológicas extremamente semelhantes às observadas em *G. citricarpa*, o que tem dificultado a identificação de frutos e folhas livres da MPC. Por outro lado, McMillan (1986) identificou o fungo *G. citricarpa* como o agente causal de doenças em folhas da manga apenas com base em características morfológicas. Stringari (2004), utilizando características morfológicas e dados moleculares de marcadores RAPD e seqüenciamento da região ITS1 e ITS2 do rDNA, analisou a variabilidade genética entre linhagens patogênicas de *G. citricarpa* (isoladas de lesões da MPC) e linhagens endofíticas de *Phyllosticta* sp e *G. mangiferae* (isoladas de folhas assintomáticas) de diversas regiões e hospedeiros (citros, erva-mate, goiabeira e mangueira). A alta similaridade genética entre os isolados endofíticos, sugeriu a identificação como *G. mangiferae* (Anamorfo: *Phyllosticta capitalensis*), corroborando com os estudos anteriores, onde foram utilizados marcadores RAPD (CHRISTO, 2002), seqüências ITS e dados de AFLP (BAAYEN *et al.*, 2002).

### 3.3 MANCHA PRETA DO CITROS

A doença mancha preta dos citros (MPC) foi descrita na Austrália em 1885 por Kiely, posteriormente na África do Sul, como consequência da importação de mudas da Austrália. Atualmente está distribuída em regiões subtropicais do mundo, entre elas o Brasil (GÓES *et al.*, 2005).

O ciclo da doença (MPC) inicia-se com a disseminação dos conídios ou picnidiósporos (esporos assexuais) e ascósporos (esporos sexuais) do fungo *Guignardia citricarpa*. Os conídios (picnidiósporos) são responsáveis pelas infecções à curta distância e estão localizados no interior dos picnídios oriundos dos frutos infectados. Um agregado de conídios emerge através da abertura do picnídio (ostíolo), dissolve-se na água da chuva, orvalho ou irrigação, e cai sobre os pequenos frutos susceptíveis que se formam após as floradas. Já os ascósporos são responsáveis pela disseminação à curta e longa distância, pois são lançados dos pseudotécios que se formam em folhas caídas ao solo, e são levados por correntes aéreas, infectando pequenos frutos susceptíveis (ROBBS, 1990).

Em estudo epidemiológico da MPC, Spósito *et al.* (2008) analisou 27270 frutos colhidos de 303 árvores no Estado de São Paulo, quanto à incidência da doença (porcentagem de frutos doentes por árvore) e quanto à severidade da doença (área com sintoma do fruto). Os autores encontraram frutos doentes em 251 árvores da 303 analisadas (83%), com diferentes níveis de incidência. Algumas árvores tinham a maioria das frutas com lesões agregadas e de alta gravidade, enquanto outras tinham a maioria das frutas com poucas lesões e baixa gravidade. Segundo os autores, quando o agente patogênico é disperso pela água da chuva, esta pode transportar muitos esporos de uma vez, formando uma lesão. O padrão de sintomas resultantes a partir deste tipo de dispersão é tipicamente agregada. Os autores concluíram que além dos ascósporos os conídios também são importantes inóculos na epidemiologia da doença.

A MPC caracteriza-se por apresentar lesões com bordas salientes e com depressão no centro, onde se observam pequenos pontos pretos, os picnídios. As lesões podem atingir os frutos maduros ou no início de maturação, podendo aparecer após a colheita, no transporte e



armazenamento (ROBBS; BITTENCOURT, 1995). A MPC afeta apenas a casca do fruto e o flavedo (epicarpo), sem causar dano internamente, limitado pelo albedo (mesocarpo). Porém, sua comercialização no mercado de frutas é prejudicada, assim como a sua exportação devido à barreira fitossanitária existente na União Européia, por ser uma doença quarentenária A1. Nos casos em que a doença atinge o pedúnculo do fruto, pode ocorrer a queda prematura do fruto, aumentando as perdas na produção e até limitando seriamente a citricultura em vários estados brasileiros (GÓES *et al.*, 2005; ROBBS; BITTENCOURT, 1995).

### 3.4 MARCADORES MOLECULARES

A variabilidade genética em microrganismos pode ser detectada por técnicas clássicas ou moleculares. As técnicas clássicas baseiam-se na análise de fenótipos a partir da caracterização morfológica (produção de conídios, crescimento radial da colônia), ou bioquímica (produção de substâncias), entretanto nem sempre fornecem dados suficientes para conduzir estudos populacionais e muitas vezes, de sistemática. As técnicas moleculares, por sua vez, fornecem ferramentas para evidenciar e entender melhor diversos aspectos relacionados direta ou indiretamente com o DNA. Desta forma, a análise dos ácidos nucleicos vem sendo amplamente utilizada na diferenciação de organismos e no esclarecimento taxonômico e filogenético dos organismos estudados (ALBERTS *et al.*, 2004).

Os diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente nos ácidos nucleicos têm permitido a análise molecular da variabilidade do DNA, determinando pontos de referência nos cromossomos, tecnicamente denominados marcadores moleculares. Por marcador molecular define-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, ou de um segmento específico de DNA (GRATTAPAGLIA; FERREIRA, 1998).

Os dados moleculares freqüentemente complementam e corroboram hipóteses baseadas em estudos morfológicos, embora, algumas vezes os resultados obtidos da análise de DNA sejam conflitantes com dados de análises exclusivamente fenotípicas.

Esta contradição pode ser observada principalmente na classificação taxonômica de microrganismos (SAMUELES; SEIFERT, 1995).

Algumas técnicas moleculares utilizadas principalmente em fungos para a detecção do polimorfismo genético de seqüência de DNA são: Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE), Polimorfismos dos fragmentos de Restrição (RFLPs), Polimorfismos do DNA Amplificados ao Acaso (RAPDs), Sequenciamento das Regiões Internas Transcritas (ITS1, ITS2, ITS4 e ITS5) do DNA ribossômico (rDNA). Além de avaliarem a variabilidade genética, estes marcadores moleculares podem determinar relações filogenéticas, como também colaborar na identificação de um determinado isolado. Tais marcadores podem ser gerados independentemente do fenótipo e revelarem polimorfismos altamente informativos em seqüências de DNA (ALBERTS *et al.*, 2004; BAAYEN *et al.*, 2002; BONANTS *et al.*, 2003; PANDEY; REDDY; SURYANARAYANEN, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2004; STRINGARI, 2004)

A técnica de eletroforese em campo pulsado consiste na alteração da orientação dos campos elétricos periodicamente. Assim, as moléculas maiores dos cromossomos demoram mais tempo para se reorientar no novo campo, e em conseqüência levam mais tempo para começar a migrar. Essa técnica veio a contribuir para a elucidação dos cariótipos de fungos, uma vez que estes são muito pequenos em comparação com outros eucariotos, o que tornava impossível a realização de cariótipos convencionais (ALBERTS *et al.*, 2004).

A técnica de RFLP passou a ser utilizada com a descoberta de que os sítios para enzimas de restrição poderiam ser polimórficos, ou seja, alterações em um único par de bases, que muitas vezes são neutras, poderiam ser detectadas pela presença ou ausência destes sítios para endonucleases. Esta técnica propiciou a introdução de um elevado número de marcadores moleculares nas análises de variabilidade genética (ALBERTS *et al.*, 2004). Dentre as inúmeras aplicações dos marcadores RFLP pode-se citar o estudo da evolução do genoma; a identificação de genes específicos; o estudo de genética de populações; a taxonomia e obtenção de mapas genéticos (MICHELMORE; PARAN; KESSELI, 1991). Entretanto, seu uso torna-se limitado, pois é necessário DNA de alta qualidade e em grande quantidade (GLIENKE, 1995).

O uso do DNA ribossomal (rDNA) como marcador molecular, também pode ser empregado na análise da variabilidade genética, para uma ampla faixa de níveis taxonômicos. As seqüências codificantes do rDNA evoluem muito lentamente e são altamente conservadas, possibilitando a sua utilização em estudos com organismos pouco relacionados taxonomicamente. Ao contrário do rDNA, as regiões espaçadoras internas destes genes, conhecidas como ITS, evoluem rapidamente, apresentando alto polimorfismo, e sendo desta forma, de grande interesse nos estudos filogenéticos de gêneros, espécies e populações (WHITE; MORROW, 1990).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tornou-se uma das mais importantes e utilizadas técnicas da Biologia Molecular, por apresentar rapidez, baixo custo e capacidade de amplificação de pequenas quantidades de DNA (MULLIS; FALOONA, 1987; WHITE; COLE, 1986).

Concebida por Kary Mullis em meados da década de 80, a técnica baseia-se na amplificação de fragmentos de seqüências de DNA com alta especificidade e fidelidade, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos ou não. Tais oligonucleotídeos iniciadores delimitam a seqüência de DNA gerando um sinal molecular que pode ser amplificado (MULLIS; FALOONA, 1987; WHITE; COLE, 1986; MCPHERSON, 1991; GRATTAPAGLIA; FERREIRA, 1998).

A PCR consiste em uma técnica *in vitro* capaz de produzir múltiplas cópias de seqüências específicas de DNA. Alterando-se as condições de reação, a PCR pode amplificar cadeias simples de DNA, detectar e distinguir entre genes portadores de mutação em uma única base ou proporcionar suficiente DNA para análise e/ou manipulação subsequente (WALKER; RAPPLEY, 1999). Uma das limitações da técnica PCR é a necessidade do conhecimento prévio da seqüência que flanqueia o segmento a ser amplificado para que os nucleotídeos possam ser construídos (WATSON *et al.*, 1992; ALBERTS *et al.*, 2004). A técnica de RAPD, entretanto, não apresenta este obstáculo, pois segundo Williams *et al.* (1990) baseia-se na amplificação de segmentos de DNA por um único oligonucleotídeo iniciador de seqüência arbitrária que amplifica várias regiões simultaneamente.

### 3.4.1 Marcadores RAPD

O RAPD é baseado em polimorfismo amplificado ao acaso, e envolve a utilização de oligonucleotídeos iniciadores de seqüência arbitrária, que amplificam várias regiões simultaneamente (WILLIAMS *et al.*, 1990; WELSH; McCLELLAND, 1990; VILARINHOS *et al.*, 1995; FUNGARO *et al.*, 1996; ALZATE-MARIN *et al.*, 1997; ABBASI *et al.*, 1999; PAAVANEM-HUHTALA; AVIKAINEM; YLI-MATTILA, 2000). Dessa forma, não é necessário o desenvolvimento prévio de uma biblioteca de sondas específicas para o organismo de interesse.

A técnica de RAPD utiliza o mesmo princípio da PCR (SAIKI *et al.*, 1985). A principal diferença entre a PCR usual e o RAPD está na reação de amplificação que utiliza apenas um único oligonucleotídeo iniciador, com seqüência arbitrária de 10 a 15 bases. A amplificação somente ocorre se este oligonucleotídeo iniciador for complementar a um sítio em uma das fitas, e complementar a um mesmo sítio (orientação invertida) na outra fita de DNA (GRATTAPAGLIA; FERREIRA, 1998). Segundo Williams *et al.* (1993), o tamanho ideal do oligonucleotídeo para amplificação de RAPD é em torno de dez bases, devendo seu conteúdo GC ser em torno de 50 a 70%, e no mínimo de 40%. Além disso, os oligonucleotídeos não devem conter seqüências palindrômicas, a fim de evitar o autopareamento.

Os marcadores RAPD têm sido amplamente utilizados para o estudo de diversos grupos de seres vivos. A partir dos marcadores moleculares clonados e seqüenciados há a possibilidade de sintetizar oligonucleotídeos iniciadores específicos aumentando o seu poder de resolução. Esses marcadores permitem caracterizar e avaliar o grau de similaridade genética entre genótipos inter e intraespecíficos, sendo altamente sensível a diferenças de até um único nucleotídeo entre o oligonucleotídeo e o DNA molde. Permitem ainda, analisar a estrutura genética em populações naturais, populações de melhoramento e bancos de germoplasma; a construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica, a localização de genes que determinem características de interesse econômico, e ainda a obtenção de novos marcadores para

diagnósticos via PCR (FUNGARO; VIEIRA, 1998; FUNGARO, 2000; GLIENKE-BLANCO *et al.* 2002; ANCHORENA-MATIENZO, 2002).

Diferentes níveis taxonômicos podem ser inferidos através de marcadores RAPD, cujos padrões podem apresentar-se como variáveis, quando polimórficos, e constantes, quando não-polimórficos. A variabilidade genética existente em isolados de *Fusarium oxysporum* foi avaliada utilizando a técnica de RAPD (BENTLEY; PEGG; DALE, 1994; MANULIS *et al.*, 1993; SILVA-HANLIN; HANLIN, 1999; WOO *et al.*, 1996; WOUDET *et al.*, 1995; WRIGHT *et al.*, 1996).

Pioli *et al.* (2003) caracterizaram, pela técnica de RAPD, isolados do complexo *Diaporthe/Phomopsis* coletados de soja na Argentina, eles foram separados em quatro grupos (i) *Diaporthe phaseolorum* variedade meridionalis, (ii) *D. phaseolorum* variedade caulivora, (iii) *D. phaseolorum* variedade sojæ, e (iv) *Phomopsis longicolla*, revelando a existência de variabilidade entre isolados da mesma variedade, que pode ser demonstrada utilizando esse marcador. Fernandez e Hanlin (1996), obtiveram resultados concordantes entre a análise molecular por RAPD e as características morfoculturais, separando os isolados coletados de soja em dois grupos: *Diaporthe phaseolorum* e *Phomopsis longicolla*.

A técnica RAPD também é utilizada como um método eficiente na diferenciação de microrganismos patogênicos e não patogênicos. Guthrie *et al.* (1992) e Vasconcelos (1994) caracterizaram diferentes espécies do gênero *Colletotrichum* diferenciando-as quanto à sua patogenicidade. Grajal-Martin, Simon e Muehlbauer (1993) conseguiram diferenciar o tipo 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* de três outros grupos, por marcadores RAPDs. Da mesma maneira, isolados patogênicos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* que atacam cravos, puderam ser distinguidas de vários não patogênicos pela mesma técnica (MANULIS *et al.*, 1993). Blanco (1999), utilizando seis oligonucleotídeos iniciadores de RAPD confirmou a existência de três populações distintas de *G. citricarpa* coexistindo em citros, sendo duas endofíticas e uma patogênica, responsável pelas lesões da mancha preta nos citros. Glienke-Blanco *et al.* (2002) utilizando sete oligonucleotídeos iniciadores de RAPD, encontraram alta

variabilidade genética em linhagens endofíticas de *G. citricarpa*, isoladas de plantas assintomáticas de citros.

Em 1999 foi identificado por Blanco um marcador molecular do tipo RAPD, exclusivo de linhagens patogênicas de citros do fungo *G. citricarpa*. A banda foi recuperada do gel, clonada e seqüenciada. Esta seqüência, aparentemente, não é codificadora e, a partir dela, foi desenhado um par de oligonucleotídios iniciadores para amplificar esta seqüência por PCR. Desta forma, linhagens de *G. citricarpa* podem ser identificadas e também com a utilização destes oligonucleotídios iniciadores, existe a possibilidade de um diagnóstico rápido de plantas infectadas com linhagens patogênicas deste fungo, mesmo antes do aparecimento das lesões que caracterizam a doença.

#### 3.4.2 Marcadores ITS

O DNA ribossômico contido nas regiões organizadoras de nucléolos (NOR), tem sido objeto de um grande número de estudos, com diversas aplicações em genética, evolução e melhoramento. Tal interesse está diretamente relacionado à estrutura destas regiões, que se encontra em locais específicos do genoma, e repetidos em seqüências inúmeras vezes. A função do rDNA é codificar as diferentes moléculas de RNA ribossômico (WHITE; MORROW, 1990).

Segundo White e Morrow (1990), as regiões espaçadoras internas (ITS), evoluem rapidamente, apresentando alto polimorfismo, ao contrário do rDNA e sendo assim, essas regiões são de grande interesse nos estudos filogenéticos com relação a gênero, espécies e populações.

Esta característica permite, ainda, a sua utilização na obtenção de polimorfismos de comprimento de fragmentos (RFLP) nos loci de rDNA. O número de cópias de uma determinada seqüência de rDNA, e variações de nucleotídeos nestas seqüências, também têm sido utilizados em tais estudos (FERREIRA, 1994).

Manulis, *et al.* (1993) avaliaram a relação filogenética e variação genética dentro de 24 isolados do complexo *Fusarium solani* por meio da seqüência de rDNA e marcador RFLP, e concluíram que esta espécie é formada por espécies filogenéticas distintas. Utilizando a mesma técnica, Ouellet e Seiffert (1993) diferenciaram *F. graminearum* de outras 11 espécies que atacam trigo, além de terem permitido a identificação de diversas raças desta espécie, provenientes de isolados morfologicamente semelhantes. Jasalavich, Ostrofsky e Jellison (2000) utilizaram os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4 (específico para basidiomicetos) na identificação de diferentes espécies. A amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2 detectou a presença de Basidiomicetos em diferentes amostras. Testes complementares foram realizados no produto da amplificação, por meio da técnica de RFLP, permitindo a identificação de espécie.

Mostert *et al.* (2001) usaram análise filogenética das regiões 5,8S, ITS1 e ITS2, e com o uso de seqüência mitocondrial para auxiliar a elucidação da taxonomia de espécies de *Phomopsis* obtidas de vinhedos. Eles observaram que os fungos endofíticos tratavam-se de *Diaporthe perijuncta* e *Phomopsis* sp grupo 1. Já os isolados patogênicos e com alta virulência pertenciam a espécie *viticola*, assim como os isolados descritos em estudos anteriores como *Phomopsis* grupo 2. Eles também puderam elucidar que os isolado descritos na Austrália como *Phomopsis* táxon 4 tratavam-se de *Libertella* sp, excluindo-o do complexo *P. viticola*. Djaquida *et al.* (2004) utilizaram o seqüenciamento das regiões ITS1, 5,8S e ITS2 e do gene mitocondrial *atp6* para avaliar a diversidade molecular de linhagens patogênicas ao girassol de *Diaporthe helianthi* (anamórfico *Phomopsis helianthi*) isolados de diferentes origens geográficas.

### 3.5 RNA DUPLA FITA EM FUNGOS

A presença de RNAs dupla fita em fungos tem sido relacionada a diversas alterações fenotípicas nos seus hospedeiros (BOLAND, 1992; ELLISTON, 1982; DAY *et al.*, 1997; ZHOU e BOLAND, 1999). Em fungos fitopatogênicos, vários autores têm relacionado á existência destes elementos com virulência alterada, em geral, reduzida.

A existência destas micoviroses nestes fungos também vem sendo relacionada com outras alterações morfológicas, como variações nas taxas de crescimento e reprodução destes fungos (BOLAND, 1992; ELLISTON, 1982).

RNAs dupla fita (RNAdf) são comumente encontrados em fungos e podem estar associados a partículas virais (BUCK, 1986). A maioria desses micovírus existe como simples partícula contendo um único RNAdf em um capsídio protéico composto por polipeptídeos (CASTRO *et al.*, 1999). Outros RNAdf não são encapsulados e parecem estar associados à membrana do fungo hospedeiro (MARTINS *et al.*, 1999).

A organização desses elementos é complexa. Existem diferenças significativas em tamanho e forma de apresentação do genoma (íntegro ou fragmentado), o que torna necessário vários grupos para acomodá-los (NUSS; KOLTIN, 1990).

Em recente revisão, Mertens (2004) relatou cinco famílias de vírus de RNAdf que vem sendo identificadas infectando fungos. São elas:

- Hypoviridae: genoma de um segmento, com vesículas de 50 a 80 nm que não possuem capsídio protéico;
  - Totiviridae: genoma de um segmento e com capsídio icosaédrico de 30 a 40 nm de diâmetro;
  - Chrysoviridae: genoma com quatro segmentos, com capsídio protéico icosaédrico de 30 a 40 nm de diâmetro;
- (estas três famílias são exclusivas de fungos)
- Partitiviridae: genoma com dois segmentos, com capsídio protéico icosaédrico com 30 a 40 nm de diâmetro (hospedeiros de vírus desta família podem ser fungos e plantas);
  - Reoviridae: genoma com 10,11 ou 12 segmentos, empacotados em capsídios protéicos icosaédricos de 70 a 90 nm de diâmetro. Esta é a família mais numerosa de vírus de RNAdf, sendo que os hospedeiros destes vírus podem pertencer a diferentes táxons, como: fungos, plantas, artrópodos, peixes, répteis, pássaros e mamíferos

Os micovírus são regularmente transmitidos através do contato citoplasmático pela fusão de hifas. Partículas virais também podem ser transmitidas para os esporos durante o desenvolvimento do fungo, mas, aparentemente não podem infectar através da parede celular intacta (TIAGO, 2001). Segundo Buck (1986), os micovírus não têm



habilidade de lisar as células do hospedeiro, sendo que o único mecanismo natural de transmissão é o citoplasmático, refletindo em uma gama limitada de hospedeiros, já que fungos filamentosos possuem um sistema de auto-reconhecimento geneticamente regulado que impede a fusão de hifas entre linhagens incompatíveis. Este sistema de incompatibilidade vegetativa, de acordo com McCabe, Pfeiffer e Van Alfen (1999), limita a transmissão dos micovírus através da reprodução sexual em populações fúngicas.

A identificação das bandas extras, correspondentes a RNA dupla fita, é relativamente simples. Deve ser utilizado um protocolo de extração de ácidos nucleicos e posterior visualização destes ácidos nucleicos em gel de agarose. A confirmação da natureza das bandas extras, quando encontradas, geralmente é feita com tratamentos com DNase e RNase. Alguns fungos como o *Uncinula necator*, fitopatogênico e biotrófico obrigatório, exigem adaptações no protocolo convencional conforme descrito por Délye e Corio-Costet (1998). Pesquisas indicam que essas partículas virais estão presentes em, aproximadamente, 30% de todas as espécies de fungos (BUCK, 1986).

Geralmente, RNAs dupla fita são latentes ou crípticos mas, em alguns casos, fenótipos particulares são observados em fungos que contém esses micovírus (CASTRO *et al.*, 1999). A presença de certos elementos de RNAdf está fortemente correlacionada com alterações na patogenicidade, principalmente hipovirulência (BOLAND, 1992; DALZOTO *et al.*, 2006). Todavia, infecções por RNAdf podem, também, alterar a morfologia da colônia e reduzir a taxa de crescimento e esporulação de seus hospedeiros (ELLISTON, 1982). Boland (1992) cita uma possível associação entre RNAdf e hipovirulência no fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, já que isolados virulentos não apresentaram esses elementos e a transmissão de RNAdf ocorreu associada com o fenótipo de hipovirulência para as linhagens virulentas. Em outro estudo com *S. sclerotiorum*, Zhou e Boland (1999) verificaram que linhagens hipovirulentas (com RNAdf) produziam menor quantidade de massa micelial do que linhagens virulentas (livres de RNAdf) em meio de batata líquido (PDB). Também as linhagens hipovirulentas apresentaram uma menor produção e/ou um atraso na produção de ácido oxálico em comparação com linhagens virulentas, especialmente durante os primeiros dias de cultura (3 a 7 dias). Já para a espécie *Sclerotinia minor*,

Melzer e Boland (1996) verificaram que a presença de RNAdf não necessariamente induz a hipovirulência, uma vez que alguns isolados virulentos também apresentaram esses elementos. Entretanto, todos os isolados hipovirulentos continham RNAdf.

Comparando linhagens de *Chalara elegans* que continham RNAdf, quanto ao crescimento, patogenicidade e sobrevivência no solo, Punja (1994) verificou que a presença de múltiplos elementos de RNAdf no fungo estava associada com um aumento na esporulação, alteração da morfologia da colônia e redução no crescimento e na patogenicidade. Resultados semelhantes foram obtidos por Howitt *et al.* (1995) em *Botrytis cinerea*. Estes autores compararam várias linhagens contendo RNAdf com linhagens livres destes elementos e encontraram uma diferença na taxa de crescimento e virulência, sendo menores para o grupo contendo RNAdf. Castro *et al.* (1999) observaram neste mesmo fungo que células infectadas com vírus apresentaram um importante grau de degeneração celular em seu citoplasma, inclusive com o desaparecimento de organelas.

Chu *et al.* (2002) evidenciaram a presença de RNAdf em linhagens de *Fusarium graminearum* e, então, analisaram com mais detalhes uma destas linhagens, verificando mudanças morfológicas como redução do crescimento, aumento da pigmentação, redução da virulência para trigo e decréscimo na produção de toxinas. Além disso, o RNAdf foi transmitido para uma linhagem livre deste elemento por fusão de hifas e a linhagem receptora adquiriu o vírus associado ao fenótipo da linhagem doadora. Dalzoto *et al.* (2006) relatou alterações relacionadas ao RNAdf em *Beauveria bassiana*, esses elementos foram relacionados à hipovirulência desse fungo, onde a média de mortalidade contra o inseto *Euschistus heros* foi reduzida em linhagens contendo RNAdf quando comparado com a isogênica livre de RNAdf.

Embora haja um grande número de relatos sobre RNAs dupla fita em fungos, o significado biológico dessas micoviroses, incluindo sua influência na patogenicidade e/ou influência no fenótipo do hospedeiro, ainda é incerto para a maioria dos casos. Conseqüentemente, estas infecções têm gerado grande interesse e têm se tornado alvo de extensas pesquisas, especialmente em fitopatógenos onde há um grande potencial na utilização de RNAs dupla fita como agentes de controle biológico, utilizando a

hipovirulência que estes vírus podem conferir a estes fungos (KAVA-CORDEIRO, 2004).

Resultados favoráveis da utilização de vírus no controle biológico de fungos fitopatogênicos vêm sendo obtidos com os vírus de hipovirulência de *Cryphonectria parasítica*. Este fungo é responsável pelo cancro em castanheiras. Na Europa, esta doença vem sendo controlada pela disseminação de linhagens hipovirulentas (com vírus) e atualmente, lesões de cancro curadas estão sendo encontradas e investigadas. Em todas é confirmada a presença do RNAdf do hipovírus (ROBIN; HEINIGER, 2001). HOEGGER *et al.* (2003) comprovaram a disseminação dos vírus presentes nas linhagens infectadas em cancros previamente tratados com o fungo infectado com o vírus e também em novas lesões da doença, que não tinham sido tratadas anteriormente.

Vários pesquisadores têm estudado a correlação entre variações na patogenicidade, marcadores moleculares e compatibilidade vegetativa de isolados de espécies fúngicas. Wright *et al.* (1996) evidenciaram uma alta correlação entre agrupamentos obtidos com dados de patogenicidade, compatibilidade vegetativa e marcadores RAPD em *Fusarium oxysporum*. Até então, a classificação de *F. oxysporum* em *formae speciales* e raças era feita de acordo com o hospedeiro e o cultivar, respectivamente. Em trabalhos realizados por Steenkamp *et al.* (1998), utilizando a espécie *Sphaeropsis sapinea*, os autores identificaram quatro linhagens contendo RNAdf, destas, duas linhagens apresentaram um crescimento mais lento e as outras duas um crescimento mais regular. Estas linhagens foram testadas quanto à virulência, e esta se apresentou menor nas duas linhagens com crescimento mais lento. Dessa forma, a redução da virulência em *S.sapinea* apresentou-se positivamente correlacionada com crescimento mais lento *in vitro*, sugerindo que a presença de RNAdf pode não estar relacionado a essas características.

Zabalgogezcoa *et al.* (1998), utilizando *Epichloe festucae*, não observaram diferenças com relação à virulência entre linhagens infectadas e não infectadas por RNAdf. Resultados diferentes foram encontrados por Ahn e Lee (2001) que identificaram em *Nectria radicicola* RNA dupla fita de 4 tamanhos diferentes (6,0, 5,0,

2,5, e 1,5 Kb). Em testes de cura, os autores verificaram que o RNAdf de 6,0 Kb está associado com altos níveis de virulência e esporulação, sugerindo que este RNAdf é um regulador positivo da virulência neste fungo.

Satélites de certos RNA dupla fita são responsáveis pelo *sistema matador*, que fazem com que seu hospedeiro secrete toxinas, como ocorre em *Saccharomyces cerevisiae* (WRIGHT *et al.*, 1996) e *Ustilago maydis* (SHELBOURN; DAY; BUCK, 1988). As linhagens matadoras contêm segmentos de RNAdf encapsulados que são responsáveis por informações requeridas para replicação e para a estrutura viral, e também por codificar polipeptídeos tóxicos e provavelmente por um papel na imunidade do fungo para a toxina que ele produz.

Em fungos entomopatogênicos, Leal *et al.* (1994) realizaram bioensaios utilizando o fungo *Metarhizium anisopliae* contra o afídio *Myzus persicae* e não detectaram diferenças de virulência entre a linhagem com RNAdf e a linhagem isogênica (sem o RNAdf), ao contrário do que é descrito para a maioria dos fitopatógenos. Também Tiago (2001) analisou a correlação entre a presença de RNA dupla fita e produção de proteases degradadoras de cutícula, secreção de proteína total e produção de conídios em linhagens isogênicas de *Metarhizium anisopliae* variedade *acridum* (= *Metarhizium flavoviride*) e *Paecilomyces fumosoroseus*. Neste trabalho, não foi encontrada correlação entre os parâmetros analisados com a presença ou ausência de RNA dupla fita, sugerindo que a infecção deve ser latente nesses fungos. Em bioensaio com o inseto *Euchistus heros*, linhagens com e sem RNA dupla fita de *M. anisopliae* apresentaram desempenho semelhante na mortalidade deste inseto (RIBEIRO, 1995). Na espécie *M. flavoviride*, Martins *et al.* (1999) verificaram que linhagens com RNAdf não foram associadas com hipovirulência em teste contra o gafanhoto *Rammatocerus schistocercoides*.

Resultados diferentes foram obtidos por Frazzon *et al.* (2000). Estes autores analisaram a produção de proteases e quitinases em linhagens de *Metarhizium anisopliae* com e sem RNA dupla fita e verificaram que as linhagens com RNAdf secretavam estas enzimas em menor quantidade. Gimenez-Pecchi *et al.* (2002) também observaram que as linhagens de *M. anisopliae* com RNA dupla fita secretavam

endoquitinases em menor quantidade que as linhagens sem RNA dupla fita. SANTI *et al.* (2000) também verificou que as mesmas linhagens com RNA dupla fita investigadas por Gimenez-Pecchi *et al.* (2002) também foram, em regra geral, menos infectivas contra o carrapato *Boophilus microplus*. Resultados semelhantes foram obtidos por DALZOTO *et al.* (2006) com o entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Em bioensaio com o percevejo marrom da soja, *Euchistus heros*, uma linhagem com RNAdf foi menos virulenta que a mesma linhagem curada deste vírus, evidenciando o caráter de hipovirulência deste vírus neste fungo.

Em bioensaio com o fungo *Paecilomyces fumosoroseus*, Azevedo *et al.* (2000) também não encontraram nenhuma diferença estatística entre o isolado com RNA dupla fita e a linhagem isogênica sem o RNAdf, indicando que os RNAs dupla fita não causam hipovirulência neste fungo.

### 3.6 CURA DO RNA DUPLA FITA EM FUNGOS

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para obter a cura do RNA dupla fita em fungos fitopatogênicos. Fulbright (1984) utilizou ciclohexamida para curar o fungo *Endothia parasitica*, patogênico de castanheiras, e obteve a cura da linhagem GHU4, que determinou aumento na virulência e recuperação da morfologia típica da colônia. Segundo Stryer (1988), a ciclohexamida inibe a síntese de proteínas, pois inibe a atividade da peptidil-transferase da subunidade 60S do ribossomo e inibe a síntese de RNA. Este antibiótico também foi utilizado para a cura do RNAdf em outras espécies de fungos (BOTTACIN; LEVESQUE; PUNJA, 1994; DALZOTO, 2004).

Já Robinson e Deacon (2001), não obtiveram sucesso na cura total do RNAdf do fungo fitopatogênico *Rhizoctonia solani* (AG3) utilizando ciclohexamida com incubação prolongada de 8 semanas, nem com a técnica de subculturas de pontas de hifas. Boland (1992) também não obteve a cura do RNAdf em *Sclerotinia sclerotiorum*, utilizando subculturas de pontas de hifas e tratamento das colônias com calor ou ciclohexamida. O autor associou a hipovirulência do fungo com a presença do RNAdf.

Em testes de cura com ciclohexamida ou emetina, Ahn e Lee (2001), perceberam que apenas com a eliminação de segmento 6,0 kb de RNAdf em *Nectria radicola*, a fisiologia do fungo foi alterada. Ocorreu uma diminuição da virulência, esporulação e pigmentação. Desta forma, o segmento 6,0 kb RNAdf é um regulador positivo na fisiologia deste fungo, diferentemente de outros trabalhos, em que a presença do RNAdf torna o fungo hipovirulento, como foi relatado por outros autores (FULBRIGHT, 1984; BOLAND 1992).

Utilizando outra técnica na tentativa de eliminar o RNAdf de *Paecilomyces fumosoroseus*, um fungo entomopatogênico, (AZEVEDO *et al.* 2000) obtiveram a cura em um dos isolados através da cultura de colônias monospóricas. Este trabalho mostrou pela primeira vez que fragmentos de RNAdf não causaram efeitos de hipovirulência em *P. fumosoroseus*.

Varga *et al.* (1998) obtiveram resultados variáveis para três técnicas de cura de RNAdf utilizadas em *Aspergillus sect. flavi*. Com ciclohexamida a cura ocorreu em 40% dos isolados com RNAdf. Usando a técnica de colônia monospórica seqüencial, a freqüência de cura variou de 11 a 100% e com a técnica de clorato para seleção de mutantes para o metabolismo de nitrogênio, a freqüência de cura variou de 0 a 100%. Os autores ainda verificaram que a presença e/ou ausência de RNAdf não está associada à produção de aflatoxina.

Diapeningen (2007) isolou uma linhagem selvagem de *Aspergillus niger* com RNAdf que formou setores sem conídios e com taxa de crescimento reduzida. Observou-se que esse fenótipo anormal possui titulação de micovírus elevada quando comparada com o micélio adjacente da colônia, devido a intensidade das bandas de RNAdf. Esta foi a única linhagem que foi curada através de isolamento seqüencial de ponta de hifa de um total de 10 linhagens.

Romo (2007), identificou um vírus de RNAdf que infecta o endofítico *Epichlöe festucae* como pertencente à família Totiviridae. As tentativas feitas para curar linhagens infectadas por calor falharam, e o que se observou é que em temperaturas elevadas, a concentração do vírus aumenta nesta espécie. Segundo o autor, este fato sugere a destruição de mecanismos mantenedores da homeostase nas células.

### 3.7 ESTIMATIVA DO NÚMERO DE CROMOSSOMOS

O *Southern blotting* é uma técnica que permite obter informação sobre a massa molecular e a quantidade relativa de uma determinada seqüência de DNA. É um método de biologia molecular que serve para verificar se uma determinada seqüência de DNA está ou não presente em uma amostra de DNA analisada. A técnica, desenvolvida por Edwin Southern em 1975, é uma combinação de eletroforese em gel do DNA (este é geralmente fragmentado por enzimas de restrição antes de fazer o *Southern*), transferência deste para uma membrana e hibridização com uma sonda marcada. Após a hibridização, a membrana é lavada para remover a sonda não ligada a DNA e obtém-se uma imagem através de autoradiografia ou autofluorescência. A imagem obtida dá a localização do DNA que apresenta a seqüência complementar da sonda, com a intensidade do sinal dando uma medida relativa da quantidade de DNA que hibridiza (ALBERTS *et al.*, 2004).

Outra utilidade dessa técnica é permitir detectar fragmentos de DNA específicos em amostras de composição complexa, possibilitando inclusive a estimativa do número de cópias daquela seqüência no genoma (Madsen *et al.*, 2003).

Guimarães *et al.* desenvolveram em 2005 marcadores moleculares do tipo RGA (análogos a genes de resistência), através de *Southern blotting*, visando sua aplicação na identificação de locos associados à resistência no mapa genético de *Arachis* spp. Inicialmente, avaliou-se o polimorfismo de cada RGA, utilizando-o como sonda no DNA dos parentais contrastantes (*A. stenosperma* V10309 (resistente) e *A. duranensis* K7988 (suscetível)) quanto à resistência às manchas foliares e ao nematóide das galhas e na planta F<sub>1</sub> híbrida. Em seguida, as sondas selecionadas como polimórficas entre os parentais foram testadas em representantes da progênie F<sub>2</sub>, visando a sua inclusão em mapa genético de *Arachis* spp. e sua posterior associação com genes de resistência.

A presença de linhagens transformantes foi identificada por Shaw, 2002, utilizando, *Southern blotting* e posteriormente hibridização. Conídios de *Phyllosticta ampellicida* germinam depois de terem contato com um substrato. Linhagens

transgênicas de *P. ampellicida* expressando uma proteína cálcio-sensível luminescente, foram desenvolvidas. Pelo uso do *Southern blotting*, o número de cópias do transgene e o número de inserções pode ser determinado. Isto é importante porque a presença de vários exemplares pode ser a causa de instabilidade, resultando em uma menor expressão (SHAW, 2002).

*Southern blotting* foi utilizado por Jin, (2005) para estimar o número de cópias do gene EhHOG em *Eurotium herbariorum*, espécie fúngica isolada de água do mar morto. A clivagem do DNA genômico foi realizada com as enzimas *EcoRI*, *HindIII* e *BamHI*. O autor sugeriu a existência de apenas uma cópia do gene EhHOG no genoma. Esse gene codifica uma proteína ativada mitogen-quinase (MAPK), que desempenha um papel essencial na osmoregulação em levedura e em muitos outros eucariotos.

O tamanho do genoma do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* foi estimado através da medição da intensidade da fluorescência das DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) com núcleos corados por microscopia confocal e pela soma das médias de massas moleculares de DNA cromossômico e do tamanho de moléculas separadas por PFGE. Este estudo fornece evidência para a natureza diplóide de *P. brasiliensis* e representa um ponto de partida para novas investigações da organização do genoma deste patógeno. Através desta técnica, foi possível separar cromossomos de até 10 Mb, fornecendo provas de polimorfismo cromossômico em *P. brasiliensis*. Sondas homólogas foram usadas na hibridização para confirmar o número e polimorfismo das bandas cromossômicas (CANO, 1998).

Nagy e Hornok (1994) conseguiram estimar diferenças no número e tamanho de cromossomo entre dois táxons, *Fusarium acuminatum* subsp. *acuminatum* e *F. acuminatum* subsp. *armeniicum*, que foram submetidas à análise comparativa de cariótipo utilizando *Southern blotting*.

Na espécie de fungo fitopatogênico de videiras, tomates e plantas ornamentais, *Botrytis cinerea*, Levis *et al.* (1997) conseguiram isolar uma seqüência telomérica, que foi utilizada como sonda na hibridização, para determinar o número de cromossomos característico da espécie. Eles clivaram o DNA genômico de



diversas linhagens de *B. cinerea* com enzimas de restrição e submeteram ao *Southern blotting* e hibridização utilizando a seqüência telomérica clonada em plasmídeo e denominada pTEL, como sonda. Os autores concluíram que as bandas encontradas se referem a um número mínimo de 7 a 8 cromossomos entre as linhagens analisadas. Em 2002, utilizando a mesma seqüência como sonda, Viaud *et al.* (1996) determinaram que para 9 isolados do entomopatógeno *Beauveria bassiana*, o número de cromossomos variou entre 7 e 8, entretanto devido a intensidade de algumas bandas, os autores sugeriram que pode haver 2 regiões teloméricas diferentes formando única banda.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LINHAGENS UTILIZADAS

As linhagens fúngicas utilizadas pertencem às espécies *Guignardia citricarpa* (PC3C, PCIAC 19/02, PC7LB6, PC7LD6, PC7LE10, PC28/05, PC32/05 e PC33/05), *G. mangiferae* (EC01/05, EC19/05 e EC22/05) e *Phyllosticta spinarum* (ECPR3, ECPR5) apresentadas na Tabela 1. Todas as linhagens pertencem à coleção de microrganismos do Laboratório de Genética de Microrganismos da UFPR (LabGeM).

TABELA 1 – HOSPEDEIRO, ANO E LOCAL DE ISOLAMENTO DAS LINHAGENS FÚNGICAS UTILIZADAS (CONTINUA)

ESPÉCIE	LINHAGEM	HOSPEDEIRO	ANO	ISOLAMENTO
<i>G. citricarpa</i>	PC3C	<i>Citrus</i> sp	-	África do Sul
<i>G. citricarpa</i>	PCIAC 19/02	<i>Citrus</i> sp (limão Eureka)	2002	Cordeirópolis/SP
<i>G. citricarpa</i>	PC7LB6	<i>Citrus</i> sp	1996	Mogi-Guaçu/SP
<i>G. citricarpa</i>	PC7LD6	<i>Citrus</i> sp	1996	Mogi-Guaçu/SP
<i>G. citricarpa</i>	PC7LE10	<i>Citrus</i> sp	1996	Mogi-Guaçu/SP
<i>G. citricarpa</i>	PCFTCA 1	<i>Citrus</i> sp	2006	Cerro Azul/PR
<i>G. citricarpa</i>	PCFTCA 3	<i>Citrus</i> sp	2006	Cerro Azul/PR
<i>G. citricarpa</i>	PCFTCA 4	<i>Citrus</i> sp	2006	Cerro Azul/PR
<i>G. citricarpa</i>	PCFTCA 6	<i>Citrus</i> sp	2006	Cerro Azul/PR
<i>G. citricarpa</i>	PCFTCA 7	<i>Citrus</i> sp	2006	Cerro Azul/PR
<i>G. citricarpa</i>	PCFTCA 8	<i>Citrus</i> sp	2006	Cerro Azul/PR
<i>G. citricarpa</i>	PCFTCA 9	<i>Citrus</i> sp	2006	Cerro Azul/PR
<i>G. citricarpa</i>	PCFTCA 10	<i>Citrus</i> sp	2006	Cerro Azul/PR
<i>G. citricarpa</i>	PCFTCA 11	<i>Citrus</i> sp	2006	Cerro Azul/PR
<i>G. citricarpa</i>	PCJF/06	<i>Citrus</i> sp	2006	Cerro Azul/PR
<i>G. citricarpa</i>	PC28/05	<i>Citrus</i> sp	2005	Jaboticabal/SP
<i>G. citricarpa</i>	PC32/05	<i>Citrus</i> sp	2005	Jaboticabal/SP
<i>G. citricarpa</i>	PC33/05*	<i>Citrus</i> sp	2005	Jaboticabal/SP
<i>G. mangiferae</i>	EC01/05	<i>Citrus</i> sp	2005	Jaboticabal/SP
<i>G. mangiferae</i>	EC19/05	<i>Citrus</i> sp	2005	Jaboticabal/SP
<i>G. mangiferae</i>	EC22/05	<i>Citrus</i> sp	2005	Jaboticabal/SP

Fonte: O Autor

TABELA 1 – HOSPEDEIRO, ANO E LOCAL DE ISOLAMENTO DAS LINHAGENS FÚNGICAS UTILIZADAS (CONCLUSÃO DA TABELA)

Nota: \* linhagem com teste de patogenicidade comprovada.

<i>P. spinarum</i>	ECPR3	<i>Citrus limon</i>	1997	Rio Negro/PR
<i>P. spinarum</i>	ECPR5	<i>Citrus limon</i>	1997	Rio Negro/PR

Fonte: O Autor

A linhagem Top 10 de *Escherichia coli* foi utilizada na produção de células competentes, a fim de replicar o plasmídeo utilizado neste trabalho.

A linhagem MSE de *Aspergillus nidulans* foi utilizada como controle na hibridização, por ter número de cromossomos conhecido.

## 4.2 MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

### 4.2.1 Meio Ágar-Água

H <sub>2</sub> O dest.	1.000 mL
Agar	15 g

O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH 1M.

### 4.2.2 Meio BDA

Batata descascada e cortada	200 g
Dextrose	20 g
Água destilada	p/ 1.000 mL

A batata foi fervida em água destilada por quinze minutos. Depois de peneirado, a dextrose foi adicionada ao caldo resultante e o volume foi completado para 1.000 mL com água destilada. O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH 0,1 M. Para meio BDA sólido, foi acrescentado 1,5% de ágar. O meio foi autoclavado e armazenado em temperatura ambiente.

#### 4.2.3 Meio Completo (MC) (PONTECORVO *et al.*, 1953, modificado por AZEVEDO; COSTA, 1973)

NaNO <sub>3</sub>	6,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g
KCl	0,5 g
FeSO <sub>4</sub>	0,01 g
ZnSO <sub>4</sub>	0,01 g
Glicose	10,0 g
Extrato de levedura	2,0 g
Peptona	2,0 g
Caseína hidrolizada	1,5 g
Solução de vitaminas	1,0 mL
Água destilada	p/ 1.000 mL

O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH 1 mol/L. Para MC sólido, foram acrescentados 1,5% de ágar. O meio foi autoclavado e armazenado em temperatura ambiente.

#### 4.2.4 Meio Completo (MC) com ciclohexamida

Eventualmente ao MC foi adicionada ciclohexamida. Após a fusão do meio, quando este estava com uma temperatura entre 45 e 50°C recebeu a adição da ciclohexamida em concentrações variadas (100, 50, 15, 10, 5, 1 e 0,5 µg/mL), logo depois o MC foi homogeneizado para depois então ser plaqueado em placas de Petri.

#### 4.2.5 Meio LA (Luria Ágar)

Meio LB acrescentado de 1,5% de ágar. Quando necessário, foi acrescentada ampicilina (250 µg/mL).

#### 4.2.6 Meio LB (Luria-Bertani)

bacto-triptona	10 g
bacto-extrato de levedura	5 g
NaCl	10 g
H <sub>2</sub> O dest.	p/ 1.000 mL

O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 5 M. Quando necessário, foi acrescentada ampicilina (250 µg/mL). O meio foi autoclavado e armazenado em temperatura ambiente.

### 4.3 SOLUÇÕES E TAMPÕES

#### 4.3.1 Clorofane

Fenol equilibrado e clorofórmio p.a. na proporção de 1:1.

#### 4.3.2 Clorofil

Clorofórmio	24 volumes
Álcool Isoamílico	1 volume

#### 4.3.3 DNAse (Invitrogen)

A enzima foi fornecida na concentração de 100U/ $\mu$ L, sendo preparada conforme instruções do fabricante. Foi armazenada a -20° C.

#### 4.3.4 Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 10%

SDS	10,0 g
Água destilada	p/ 100,0 mL

#### 4.3.5 Fenol Saturado

Um volume de fenol cristalizado foi dissolvido em banho-maria a 60°C e acrescentado um volume de tampão Tris-HCl 0,2 M pH 8,0. Após agitação por 30 minutos, a fase aquosa foi retirada e então acrescentado um volume de tampão Tris-HCl 0,2 M pH 8,0. Este processo foi repetido até atingir o pH desejado (pH: 8,0). Em seguida, foi adicionado um volume final de 1/10 do tampão Tris-HCl 0,2 M pH 8,0 e estocado em frasco escuro a uma temperatura de 4°C. Usado após 48 horas.

#### 4.3.6 GET

Glicose	4,5 g
EDTA 0,5M pH 8,0 (autoclavado)	10 mL

Tris-HCl 1M pH 7,4 (autoclavado)	p/ 1.000 mL
H <sub>2</sub> O destilada	p/ 500 mL

A solução foi autoclavada e mantida a 4° C.

#### 4.3.7 Gel de Agarose 1% (p/v) em Tampão TBE 1X

Agarose	1,0 g
Tampão TBE 1X	p/ 100,0 mL

#### 4.3.8 Gel de Agarose 1,5% (p/v) em Tampão TBE 1X

Agarose	1,5 g
Tampão TBE 1X	p/ 100,0 mL

#### 4.3.9 Nuclease S1 (Invitrogen)

A enzima foi fornecida na concentração de 1.000 U/ $\mu$ L. Foi feita uma diluição de 1:10 na solução tampão de diluição também fornecida, e estocada a -20° C.

#### 4.3.10 RNase (USB)

A enzima foi fornecida na concentração de 81,4 U/mg. Foi preparada na concentração de 10 mg/mL em acetato de sódio (pH 5,0) e aquecida a 100° C por 15 minutos. Foi estocada a -20° C.

#### 4.3.11 Solução de Vitaminas

Ácido Nicotínico	100,0 mg
------------------	----------

Ácido <i>p</i> -Aminobenzóico	10,0 mg
Biotina	0,2 mg
Piridoxina	50,0 mg
Riboflavina	100,0 mg
Tiamina	50,0 mg
H <sub>2</sub> O destilada autoclavada	p/ 100 mL

A solução foi aquecida em banho-maria a 98°C por 15 minutos e armazenada em frasco escuro, previamente autoclavado, a 4°C.

#### 4.3.12 Solução Salina

NaCl 0,85% (p/v) em H<sub>2</sub>O destilada.

A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

#### 4.3.13 Solução de “Twen 80”

“Twen 80” 0,1% (v/v) em H<sub>2</sub>O destilada.

A solução foi autoclavada e mantida a 4° C.

#### 4.3.14 Solução de Acetato de Potássio 3M (KOAc) pH 5,2

KOAc 5M (estoque)	60 mL
Ácido acético glacial	11,5 mL
H <sub>2</sub> O Milli-Q autoclavada	28,5 mL

A solução foi mantida a 4° C.

- KOAc 5M (estoque):



KOAc	246,87 g
H <sub>2</sub> O Milli-Q autoclavada	p/ 500 mL

#### 4.3.15 Solução de Brometo de Etídio

O brometo de etídio foi dissolvido (1,0% p/v) em água destilada. No momento do uso, foram adicionados 5 µl em 100 mL de água destilada. A solução foi mantida em temperatura ambiente.

#### 4.3.16 Solução EDTA 0,5 M pH 8,0 (estoque)

O pH desta solução foi ajustado para 8,0 com pastilhas de NaOH 10 mol/L. A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

#### 4.3.17 Solução Tris-HCl 1 M pH 8,0 (estoque)

O pH desta solução foi ajustado para 8,0 com HCl 5 mol/L. A solução foi autoclavada e mantida a 4°C. Ocasionalmente o pH foi ajustado para outros valores.

#### 4.3.18 Solução de Ciclohexamida (20 mg/mL)

Ciclohexamida	0,61g
Acetona	0,5mL
H <sub>2</sub> O Milli-Q autoclavada	30mL

A solução foi esterilizada por filtração. No momento do uso, foi diluída convenientemente.

#### 4.3.19 Solução de Lise

NaOH 1,8M	0,5 mL
SDS 10%	0,5mL
H <sub>2</sub> O Milli-Q autoclavada	p/ 5,0 mL

Misturou-se primeiro o NaOH com a água e depois acrescentou-se o SDS. Esta solução não pode ser estocada e foi preparada no momento do uso.

#### 4.3.20 Solução Desnaturante

NaCl	1,5 M
NaOH	0,5 N

#### 4.3.21 Solução Neutralizante

Tris-HCl pH 7,4	1,0 M
NaCl	1,5 M

#### 4.3.22 Tampão de corrida (“gel loading buffer”)

Sacarose	38%
Azul de bromofenol	1%
EDTA	67 mM

#### 4.3.23 Tampão de Extração de DNA (RAEDER; BRODA, 1985)

Tris-HCl pH 8,0	200 mM
NaCl	250 mM
EDTA	25 mM
SDS (p/v)	1%

A solução foi preparada e aquecida a 60°C no momento do uso.

#### 4.3.24 Tampão TE

Tris-HCl pH 8,0	10mM
EDTA pH 8,0	1mM

#### 4.3.25 Tampão TBE 5x (solução estoque)

Tris-base	54 g
Ácido Bórico	27,5 g
EDTA 0,5 M pH 8,0	20 mL
H <sub>2</sub> O destilada	p/ 1000 mL

A solução foi autoclavada e mantida em temperatura ambiente. No momento do uso, foi diluída convenientemente em água destilada.

#### 4.3.26 Tampão de corrida TAE 10X

Tris-base	48,4 g
-----------	--------

Ácido Acético Glacial	11,42 g
EDTA 0,5 M	20,0 mL
Água Milli-Q	q.s.p 1000 mL

#### 4.3.27 Tampão de Transferência SSC 20X

NaCl	175,3 g
Citrato de sódio	88,2 g
Água Milli-Q	q.s.p. 1000 mL

#### 4.3.28 Tampão OLB

Tris-HCl – pH 8,0	250 nmol/L
MgCl	25 mmol/L
$\beta$ -mercaptoetanol	2, 5 mmol/L
Hepes	2, 5 mmol/L
dNTPs: dATP, dGTP, dTTP e dCTP	2 mmol/L
oligonucleotídeos	1 mg/mL

### 4.4 PREPARO DE MATERIAL

#### 4.4.1 Esterilização

Meios de cultura, soluções e palitos de transferência foram esterilizados em autoclave, à pressão de 1 atmosfera por 20 minutos.

Vidrarias foram esterilizadas em forno Pasteur a 180°C por 6 horas.

#### 4.4.2 Incubação

4.4.2.1 Linhagens de *G. citricarpa*, e *P. spinarum* e *G. mangiferae* e *Aspergillus nidulans*: placas com meio sólido foram incubadas em estufa tipo BOD, a 28° C ou 37° C, por tempo e luminosidade variados, conforme especificado nas metodologias.

4.4.2.2 Linhagem de *E. coli*: placas com meio sólido e frascos com meio líquido foram incubados em estufa a 37° C, por tempo variado, conforme especificado nas metodologias.

#### 4.5 INFLUÊNCIA DO RNAdf EM *G. citricarpa*

4.5.1 Extração de Ácidos Nucléicos totais (RAEDER; BRODA, 1985 modificado por BLANCO, 1999)

Fragmentos de micélio de *G. citricarpa* foram inoculados em nove pontos, em placas de Petri contendo meio completo sólido (item 4.2.4). Após 5 a 6 dias de crescimento, as colônias foram retiradas do meio com o auxílio de uma espátula, cuidando para não deixar resíduo de meio de cultura. O micélio foi colocado em frascos fechados com filme de parafina, congelados e armazenados ou levados ao liofilizador (com o filme de parafina perfurado). Após a liofilização, os frascos foram fechados hermeticamente e armazenados em freezer ou procedeu-se a extração de ácidos nucleicos.

Ao micélio liofilizado, foi adicionado nitrogênio líquido e este foi triturado em gral de porcelana até obtenção de um pó bem fino. Este pó de micélio foi aliqotado em tubos de 2 mL (40 a 60 mg/tubo) no qual foi acrescentado o tampão de extração (item 4.3.23), previamente aquecido em banho-maria a 70°C, proporcionando uma suspensão homogênea após agitação suave. Foi incubado por 20 minutos à mesma temperatura. Foi acrescentado um volume de fenol equilibrado e após a mistura das fases, foi centrifugado a 5.000 rpm por 15 minutos. A fase aquosa foi coletada e transferida a um novo tubo, foi acrescentado um volume de clorofane (item 4.3.1) e centrifugado nas mesmas condições. Após novamente coletar a fase aquosa e transferir a um novo tubo, foi acrescentado um volume de clorofil (item 4.3.2), misturado e centrifugado. À fase aquosa, foi acrescentado

lentamente um volume de isopropanol, e mantida a solução a  $-20^{\circ}\text{C}$  por, no mínimo, 1 hora para precipitação dos ácidos nucléicos. A suspensão foi centrifugada a 11.000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante foi desprezado. O precipitado foi lavado com etanol 70% (1 mL por tubo) e novamente centrifugado (11.000 rpm por 5 minutos). Repetiu-se este procedimento e então os tubos foram deixados abertos e invertidos para secagem, a  $37^{\circ}\text{C}$  por uma hora ou durante a noite em temperatura ambiente. Os ácidos nucléicos foram ressuspensos em TE (item 4.3.24) ou água Milli-Q esterilizada, conforme especificado em cada protocolo.

#### 4.5.2 Identificação da Presença de RNA dupla fita

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1% (item 4.3.7) ou 1,5% (item 4.3.8), dependendo da finalidade da corrida, utilizando como tampão TBE 1x (item 4.3.25) a 3 V/cm. O DNA de fago  $\lambda$  clivado com a enzima *HindIII* foi utilizado como marcador padrão de peso molecular.

A verificação da presença de bandas de RNA dupla fita das linhagens de *Guignardia citricarpa* foi feita por meio de eletroforeses dos ácidos nucléicos totais em gel de agarose 1,5% (item 4.3.8). A estimativa do tamanho das bandas de RNA<sub>df</sub> foi feita com o programa Kodak 1D 3.5.0 Scientific Imaging System, utilizando como padrão de peso molecular o fago  $\lambda$  clivado com a enzima *HindIII*.

#### 4.5.3 Confirmação da natureza das bandas de RNA<sub>df</sub>

Os ácidos nucléicos de cada linhagem investigada que apresentaram bandas extras foram tratados com DNase (item 4.3.3), RNase (item 4.3.10) e Nuclease S1 (item 4.3.9) para confirmar a natureza das bandas observadas, uma vez que a enzima Nuclease S1 cliva apenas ácidos nucléicos de fita simples.

Os sistemas de digestão foram mantidos em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$  por, no mínimo, 1 hora.

#### 4.5.4 Cura do RNAdf

Os isolados foram repicados em meio completo (MC) (item 4.2.4) com ciclohexamida nas concentrações de: 100, 50, 15, 10, 5, 1 e 0,5  $\mu\text{g/mL}$ , em duas repetições.

Para a cura do RNAdf, também foi utilizada a técnica de incubação em temperatura moderadamente alta (37°C) por 2 gerações. De início, para cada linhagem foi realizado um repique em MC. As placas de Petri ficaram em estufa à 37°C por 20 dias, e a partir das colônias que se desenvolveram, foi realizado mais um repique para obter a 2ª geração à 37°C. Após 20 dias, foi realizado o 3º repique, porém, neste, as placas ficaram em estufa à 28°C para obter material para a extração de DNA. Todos os repiques foram feitos com auxílio de lupa para a secção das pontas das hifas crescidas nos meios de cultura (repiques de pontas de hifas).

#### 4.5.5 Análise da Identidade Genética por RAPD

Para comprovar a isogenia das linhagens analisadas foi utilizada a técnica de RAPD. Primeiramente o DNA foi extraído conforme descrito no item 4.5.1, logo em seguida a concentração do DNA foi estimada por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (item 4.3.7), utilizando como padrão de peso molecular o DNA do fago  $\lambda$  clivado com *HindIII* com concentração conhecida. Após eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio (item 4.3.15), observado sobre transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentado.

Para amplificação das amostras, foi utilizada uma mistura conforme descrito na Tabela 2. Foram misturadas quantidades apropriadas de água Milli-Q autoclavada, tampão 10X,  $\text{MgCl}_2$ , dNTPs, oligonucleotídeo iniciador e Taq DNA Polimerase (Invitrogen), em um único tubo formando um *mix*. Foram colocados 22  $\mu\text{L}$  desse *mix* (para reações com volume final de 25 $\mu\text{L}$ ) em cada um dos tubos de microcentrifuga, para a amplificação. Foi adicionado a cada tubo 3  $\mu\text{L}$  do DNA das amostras analisadas. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram OPX 7, OPX 11, OPX 14 e OPX 19, suas seqüências estão descritas na Tabela 3.

Regiões do DNA foram amplificadas em termociclador (Mastercycler Gradiente – Eppendorf) programado para realizar reação de 40 ciclos de 1 minuto a 92 °C, 1 minuto e 30 segundos a 37°C e 2 minutos a 72°C. Houve desnaturação inicial de 4 minutos a 95°C e extensão final de 3 minutos a 72° C.

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese (3 V/cm) em gel de agarose 1,5% (item 4.3.8), utilizando como marcador de peso molecular DNA *ladder* de 100pb (Ludwig Biotec). O gel foi corado com solução de brometo de etídio (item 4.3.15) durante 15 minutos. Observou-se em transiluminador de luz ultravioleta (Ultraviolet Benchtop transilluminators) e fotodocumentou-se utilizando o programa Digidoc it.

TABELA 02: COMPONENTES E CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS NAS REAÇÕES DE RAPD

Componentes	Concentração estoque	Concentração final	Volume da reação (µL)
Água Milli-Q	-		13,2
Tampão	10 X	1X	2,5
MgCl <sub>2</sub>	50Mm	3,0 mM	1,5
d’NTPs	1,25 Mm	100µM	2,0
oligonucleotídeo iniciador	4µM	0,4 µM	2,5
Taq Polimerase (Invitrogen)	5 U/µL	1,5 U	0,3
DNA		50 ng	3,0
Total			25,0

FONTE: O autor

TABELA 03: OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE RAPD

Oligonucleotídeos iniciadores	Seqüência
OPX07	5’ GAGCGAGGCT 3’
OPX11	5’ GGAGCCTCAG 3’
OPX14	5’ ACAGGTGCTG 3’
OPX19	5’ CCCAGCTAGA 3’

FONTE: Operon Technologies®



#### 4.5.6 Seqüenciamento da Região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA

##### 4.5.6.1 Amplificação

Inicialmente foi feita uma PCR com as 16 amostras das linhagens contendo o RNAdf e as linhagens curadas. As condições da reação foram realizadas de acordo com a descrição de White e Morrow (1990), com algumas modificações, tendo como volume final 50 $\mu$ L. A reação foi realizada com os oligonucleotídeos iniciadores LS266 e V9D (Tabela 4), que são universais para fungos e permitem amplificar a região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA Ribossomal.

TABELA 4: COMPONENTES E CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS NA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS1, 5,8S E ITS2 DO DNA RIBOSSOMAL

Componentes	Concentração estoque	Concentração final	Volume da reação ( $\mu$ L)
Água Milli-Q	-		33,2
Tampão	10 X	1X	5,0
MgCl <sub>2</sub>	50Mm	3,0 mM	3,0
d'NTPs	1,25 Mm	100 $\mu$ M	4,0
oligonucleotídeo iniciador V9D	4 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M	0,8
oligonucleotídeo iniciador LS266	4 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M	0,8
Taq Polimerase (Invitrogen)	5 U/ $\mu$ L	1,5 U	0,2
DNA		50 ng	3,0
Total			50,0

TABELA 5. SEQÜÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS1, 5,8S E ITS2 DO DNA RIBOSSOMAL

Oligonucleotídeos iniciadores	Seqüência
LS266	5' GCATTCCCAAACAACCTCGAC 3'
V9D	5' TTACGTCCCTGCCCTTTGTA 3'
ITS1	5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'
ITS4	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'
ITS 5	5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAA 3'

A amplificação foi realizada em um termociclador Eppendorf (Modelo: Mastercycler Gradiente), com desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos; 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 56°C, 1 minuto a 72°C; seguida de extensão final de 3 minutos a 72°C.

#### 4.5.6.2 Purificação do DNA

Aos produtos da PCR com os oligonucleotídeos iniciadores LS266 e V9D (Tabela 5) foram acrescentados 34 µL de acetato de amônio (AcNH<sub>4</sub>) 7,5M e 100 µL de etanol 96%. Os tubos ficaram em temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida foram centrifugados por 15 minutos a 14000 rpm. Os *pellets* resultantes foram lavados com 250 µL de etanol 70% (recém preparado), centrifugou-se por 15 minutos a 14000 rpm e descartou-se o etanol. O *pellet* foi seco na estufa a 37°C por 30 minutos e resuspendidos em 15µL de água Milli-Q. Para confirmação da presença do DNA na amostra, 1µL foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5%.

#### 4.5.6.3 Reação de Seqüenciamento

O seqüenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA foi realizado pelo método de terminação de cadeia segundo Sanger *et al.* (1977), utilizando a incorporação de dideoxinucleotídeos fluorescentes, em Seqüenciador Automático de DNA megaBACE.

Para a reação de seqüenciamento foram utilizados cerca de 50ng da reação de PCR purificada, 0,2 µM do oligonucleotídeo iniciador ITS1 (Tabela 5) e 4µL de mistura para sequenciamento ET (Kit: “DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE” da Amersham Biosciences), completando com água Milli-Q para um volume final de 10µL. As mesmas condições foram aplicadas para o oligonucleotídeo iniciador ITS4 (Tabela 5).

A amplificação foi realizada em um termociclador Eppendorf (Modelo: Mastercycler Gradient), seguindo uma desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto; 30 ciclos de 10 segundos a 96°C, 1 minuto e 5 segundos a 50°C, 4 minutos a 60°C, 20 min a 8°C.

#### 4.5.6.4 Purificação da Reação de Seqüenciamento

Ao produto da reação de seqüenciamento foram adicionados 1µL de acetato de amônio (AcNH<sub>4</sub>) 7,5M e 30µL de etanol 96%. Após a homogeneização por inversão 30 vezes a placa foi centrifugada por 45 minutos à 2500 RCF a 4°C.

O sobrenadante foi descartado por inversão da placa seguido de *spin* a 500 RCF, com a placa invertida com papel toalha. O *pellet* lavado com 100 µL de etanol 70% (recém preparado, não gelado). Seguindo-se uma nova centrifugação a 2500 RCF por 45 minutos, o sobrenadante foi descartado por inversão da placa seguido de *spin* a 750 RCF, com a placa invertida com papel toalha. Em seguida a placa ficou em estufa a 37°C durante 3 minutos.

Após esse tratamento, cada amostra foi ressuspensa em 10µL de *Loading Solution* e, submetida à eletroforese em Seqüenciador Automático de DNA modelo megaBACE, da Amersham Biosciences, utilizando-se os seguintes parâmetros: voltagem de injeção: 2V; tempo de injeção: 80 segundos; voltagem da corrida: 8V por 160 minutos.

Todos os procedimentos, desde a reação de seqüenciamento, foram realizados sob proteção de luz direta cobrindo a placa com papel alumínio.

#### 4.5.6.5 Edição e Análise das Seqüências

As seqüências obtidas foram alinhadas e editadas com auxílio do programa BioEdit (HALL, 1977). Estas foram analisadas e comparadas com outras seqüências existentes no banco de dados (NCBI), pelo programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997), o qual permite detectar homologia de uma seqüência biológica com seqüências

caracterizadas já existentes. O programa usa um algoritmo heurístico e procura por homologia através de regiões alinhadas localmente de identidade e/ou similaridade entre uma seqüência desconhecida e seqüências de um banco de dados. Para análise das seqüências obtidas no presente trabalho, foi utilizado o programa BLASTn que compara seqüências de nucleotídeos com um banco de dados de seqüências de nucleotídeos.

#### 4.5.6.6. Análise Filogenética

Após a edição, alinhamento e análise prévia das seqüências, estas foram submetidas ao software MEGA 3.1 (KUMAR; TAMURA, NEI, 2004) para obtenção das árvores filogenéticas baseadas em distância. A consistência dos nós obtidos foi avaliada pelo procedimento de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) com 10000 reamostragens.

Foram utilizadas como referência linhagens de *G. citricarpa* e *G. mangiferae* (como grupo externo) depositadas no *GenBank*. As descrições das linhagens encontram-se no Anexo 20.

#### 4.5.7 Avaliação da Influência do RNAdf na morfologia de *G. citricarpa*

Uma forma de verificar a influência deste RNAdf na patogenicidade de *G. citricarpa* é promovendo a cura de uma linhagem com o RNAdf e comparando a linhagem curada com a linhagem infectada. Para isso, deve-se analisar alterações na morfologia das colônias, alteração no número de esporos produzidos, diferença no tempo de crescimento radial da colônia e modificações no padrão de germinação dos conídios e indução do apressório.

##### 4.5.7.1 Caracterização Macromorfológica

A caracterização macromorfológica das linhagens de *G. citricarpa* foi realizada utilizando como base a morfologia da colônia em dois meios de cultura. Discos de micélio (8 mm) provenientes de colônias com sete dias de crescimento em MC, foram

colocados no centro de placas de Petri com diferentes meios de cultura: Batata-dextrose-ágar (BDA) (item 4.2.3) e MC (item 4.2.4). Foram incubados durante 20 dias, a 28°C, sob luz contínua. Foram analisadas 5 placas de cada linhagem. O diâmetro das colônias foi medido no 10º dia e no 20º dia de incubação.

Para este experimento foi utilizado o delineamento estatístico inteiramente casualizado (DIC) e a partir dos dados obtidos foi realizada a análise de variância (ANOVA) e o Teste de Tukey para médias, utilizando o programa ASSISTAT (SILVA, 1996; SILVA; AZEVEDO, 2002; SILVA; AZEVEDO, 2006).

#### 4.5.7.2 Produção de Esporos

Para a avaliação da produção de esporos, foi retirado um disco de 8 mm de diâmetro tangencialmente ao centro da colônia. Este material foi colocado em 2 mL de solução Tween 80 0,1% (item 4.3.13) e macerado com o auxílio de um bastão de vidro por 2 minutos. Após agitação por 30 segundos em agitador de tubos (tipo Vortex) foi transferida uma alíquota para a Câmara de Neubauer, onde foi feita a contagem dos esporos.

Para este experimento foi utilizado o delineamento estatístico inteiramente casualizado (DIC) com 5 repetições e a partir dos dados obtidos foi realizada a análise de variância (ANOVA) e o Teste de Tukey para médias, utilizando o programa ASSISTAT (SILVA, 1996; SILVA; AZEVEDO, 2002; SILVA; AZEVEDO, 2006).

#### 4.5.7.3 Formação de Picnídios de *G. citricarpa* em folhas autoclavadas

Para testar se a presença de RNAdf interfere na formação de picnídios, folhas de citros foram lavadas em água corrente, cortadas em pequenos fragmentos de 1cm<sup>2</sup> e autoclavados por 20 minutos em água destilada. Quatro fragmentos foram colocados em cada uma das 2 placas de Petri contendo meio ágar-água com 3% de MC (item 4.2.1), adjacente a discos de micélio (Ø 8 mm) de colônias das linhagens analisadas. As placas foram vedadas com filme de PVC e mantidas a 28°C, sob luz constante, em

BOD durante 21 dias. Após este período, os picnídios crescidos sobre os fragmentos foliares foram contados com auxílio de lupa.

Para este experimento foi utilizado o delineamento estatístico inteiramente casualizado (DIC) com 8 repetições e a partir dos dados obtidos foi realizado a análise de variância (ANOVA) e o Teste de Tukey para médias, utilizando o programa ASSISTAT (SILVA, 1996; SILVA; AZEVEDO, 2002; SILVA; AZEVEDO, 2006).

#### 4.5.7.4 Melanização de Apressório e Germinação de Esporos

Inicialmente foi preparada uma suspensão de  $10^3$  esporos /mL das linhagens analisadas. Para a germinação dos esporos, 2 mL da suspensão de esporos foram colocados em cubas plásticas separadas por compartimento com uma membrana de celofane de  $1\text{cm}^2$  (MEMBRA-cel MD27X/00 clear) em cada compartimento. As cubas foram tampadas e mantidas em estufa a  $28^\circ\text{C}$  durante 72 horas. Após esse período o celofane foi fixado em lâmina de vidro e levado ao microscópio para a observação da germinação dos esporos e da melanização do apressório. O experimento foi realizado em quadruplicata e fundamentado estatisticamente utilizando o delineamento estatístico experimento em blocos ao acaso (DBC) e a partir dos dados obtidos foi realizada a análise de variância (ANOVA) e o Teste de Tukey para médias, utilizando o programa ASSISTAT (SILVA, 1996; SILVA; AZEVEDO, 2002; SILVA; AZEVEDO, 2006).

## 4.6 ESTIMATIVA DO NÚMERO DE CROMOSSOMOS

### 4.6.1 Transformação de *Escherichia coli*

#### 4.6.1.1 Obtenção de células competentes

Foi selecionada uma colônia isolada de cultura nova de *E. coli*, linhagem Top 10, como fonte de inóculo em 10 mL de meio LB (item 4.2.7). Após crescimento durante 12 a 16 horas em estufa a  $37^\circ\text{C}$  sob agitação de 180 rpm. Foi retirada uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  e inoculada em 10 mL de meio LB novamente, nas mesmas condições. Após crescimento de 5 horas, a cultura foi colocada no gelo e aliquoteada em volumes de 1 mL. Após

centrifugar por 1 minuto a 4° C, 11.000 rpm, o meio de cultura foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 100 µL de CaCl<sub>2</sub> 0,1M, esterilizado e gelado.

#### 4.6.1.2 Transformação

Foi acrescentado 1 µL de DNA plasmidial à suspensão de células. Essa mistura foi mantida por 30 minutos no gelo, por 2 minutos a 42° C e novamente no gelo por 10 minutos. Foi acrescentado 1 mL de LB e deixado em estufa, a 37 ° C por 30 minutos a uma hora. Foi retirada uma alíquota de 100 µL desta cultura e espalhada com o auxílio de alça de Drigalski em placas de Petri contendo 25 mL de meio LA (item 4.2.6) com ampicilina. Uma colônia proveniente desta cultura foi inoculada em meio LB contendo ampicilina (item 4.2.7) e crescida por 12 a 16 horas em estufa a 37° C sob agitação de 180 rpm. Após crescimento, foi retirada uma alíquota para armazenar em solução 1:1 de meio LB com ampicilina e Glicerol e mantida a -20° C e com o restante da amostra foi realizada a extração do plasmídeo (mini-prep).

#### 4.6.2 Purificação do Plasmídeo

A extração de DNA plasmidial foi realizada utilizando-se 1,5 mL da cultura obtida no item anterior, centrifugada por 1 minuto a 11.000 rpm. Após descartar o sobrenadante, foram adicionados 180 µL de GET (item 4.3.6) e, então, as células foram ressuspensionadas com o auxílio de agitador (tipo Vortex). Após centrifugar novamente nas mesmas condições, as células foram ressuspensionadas em 150 µL de GET contendo 0,5 µL de RNAse (20 mg/mL, item 4.3.10). Foram adicionados 150 µL de solução de lise (item 4.3.19) que foi misturado, invertendo-se os tubos com cuidado. Após incubação por 5 minutos em temperatura ambiente, foram acrescentados 150 µL de solução de KOAc 3M pH 5,2 (item 4.3.14). A mistura foi homogeneizada por inversão cinco vezes, e os tubos foram incubados abertos em estufa a 90° C por 30 minutos. Os tubos foram fechados e mantidos em banho de gelo por 10 minutos. Depois de centrifugar por 10 minutos a 11.000 rpm, o sobrenadante foi transferido para um tubo novo, onde foi adicionado 0,6x de volume de isopropanol. Os tubos foram misturados por inversão e centrifugados por 10

minutos a 11.000 rpm a 20° C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70%, centrifugando por 5 minutos. Os tubos foram deixados secar por 60 minutos a 37° C ou durante a noite em temperatura ambiente, cobertos com papel toalha. O DNA foi ressuspenso em 30 µL de água Milli-Q autoclavada. A qualidade do DNA obtido e sua concentração foram avaliadas em eletroforese em gel de agarose. Este DNA foi mantido a -20° C.

#### 4.6.3 Southern Blotting e Hibridização

##### 4.6.3.1 Southern Blotting

Após a obtenção de DNA genômico, aproximadamente 3µg, de 3 linhagens de *Guignardia mangiferae* (EC01/05, EC19/05, EC22/05), 4 linhagens de *G. citricarpa* (PC28/05, PC32/05, PC33/05 e PCIAC19/02), 2 linhagens de *Phyllosticta spinarum* (ECPR3, ECPR5) e uma amostra de MSE *Aspergillus nidulans* (controle) foram clivados com 40U da enzima de restrição *Bam*HI durante 5 horas a 37°C e os fragmentos resultantes foram separados em gel de agarose 1% em TAE (item 4.3.26), com 0,7V/cm durante 14 horas. Em seguida, o gel foi tratado com HCl 0,2N por 10 minutos, lavado em água Milli-Q e deixado em solução desnaturante (item 4.3.20) por 45 minutos. Após mais uma lavagem com água Milli-Q, o gel foi deixado por 30 minutos em solução neutralizante (item 4.3.21) e novamente lavado em água Milli-Q. Após nova imersão em solução neutralizante (item 4.3.21) por 30 minutos o gel foi lavado em água Milli-Q e colocado em suporte em contato com uma membrana de nylon (Hybond-N PROMEGA) e submetido à transferência por capilaridade, segundo Southern (1975), utilizando tampão de transferência SSC 20X (item 4.3.27), como descrito por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989).

Após 18 horas de transferência, a membrana foi lavada em SSC 5X, colocada para secar em papel de filtro por 30 minutos e em seguida deixada a 80°C por 2 horas, para fixar o DNA na membrana.



#### 4.6.3.2 Marcação da sonda

O DNA sonda foi desnaturado em banho-maria a 100° C durante 5 minutos e mantido em banho de gelo por 5 minutos. A marcação foi realizada como descrito por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989).

Aproximadamente 50 ng da sonda de DNA foram marcados com dCTP p<sup>32</sup>. A um volume de 16 µL do fragmento foram acrescentados 2 µL de dCTP p<sup>32</sup>, 5 µL de tampão OLB, (item 4.3.28) 1 µL de BSA 10 mg/mL e 1 µL da enzima DNA polimerase I (fragmento *Klenow*). A solução foi incubada a 37° C por 20 horas e aquecida a 94° C por 5 minutos no momento do uso, para desnaturação da sonda.

O DNA-sonda utilizado foi o plasmídeo pTEL construído a partir do plasmídeo pBluescript II KS+ 3.0 kb (LEVIS *et al.* 1997) mais a região telomérica de *B. cinerea* clivado com a enzima de restrição *Bam*HI. Essa enzima corta o DNA apenas uma vez e não corta a seqüência da sonda.

#### 4.6.3.3 Hibridização

A membrana contendo o DNA foi transferida para frascos de hibridização e foi incubada a 50° C durante 72 horas, em solução de hibridização (NaPO<sub>4</sub> 0,5 M pH 8,0, SDS 2% e DNA timo 20 µg/mL desnaturado por 5 minutos (36µL-10 µg/mL), para pré-hibridização da membrana. Após esse período, a solução de hibridização foi substituída e recebeu a adição da sonda marcada e desnaturada por 16 horas. A membrana foi lavada duas vezes durante 20 minutos cada em condição de alta estringência em solução de SSC 2X, SDS 0,1% a 50° C. A exposição a radiação ocorreu *overnight*.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

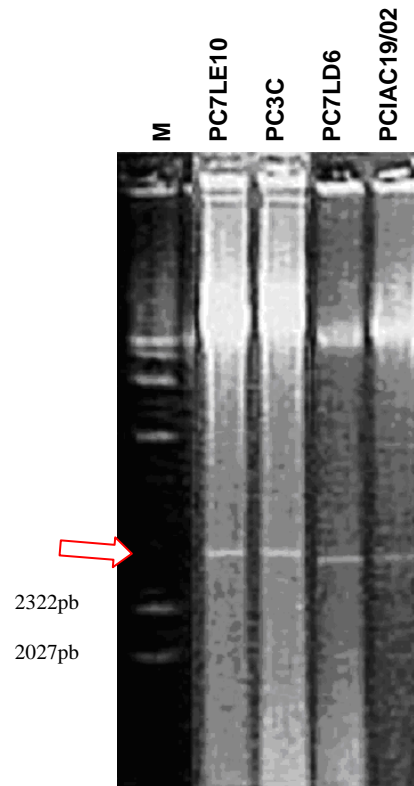
### 5.1. INFLUÊNCIA DO RNAdf EM *G. citricarpa*

A fim de verificar a possível ação das partículas RNAdf na morfologia e fisiologia do fungo *G. citricarpa*, inicialmente foram selecionadas linhagens com presença do RNAdf e posteriormente submetidas à cura, visando a obtenção de linhagens isogênicas.

#### 5.1.1. Caracterização do RNAdf

Foram investigadas 18 linhagens de *G. citricarpa* quanto à presença de RNAdf, sendo evidenciado que cinco linhagens apresentaram bandas de RNAdf (Figuras 1 e 2). A linhagem 33/05 ainda não havia sido relatada como hospedeira de RNAdf. A presença de RNAdf nas demais (PC7LE10, PC3C, PC7LD6, PCIAC19/02) já havia sido relatada por Kava-Cordeiro (2004), sendo confirmada neste trabalho. Segundo Kava-Cordeiro (2004), tais moléculas provavelmente correspondem a partículas virais da família Totiviridae, de aproximadamente 3100 pb.

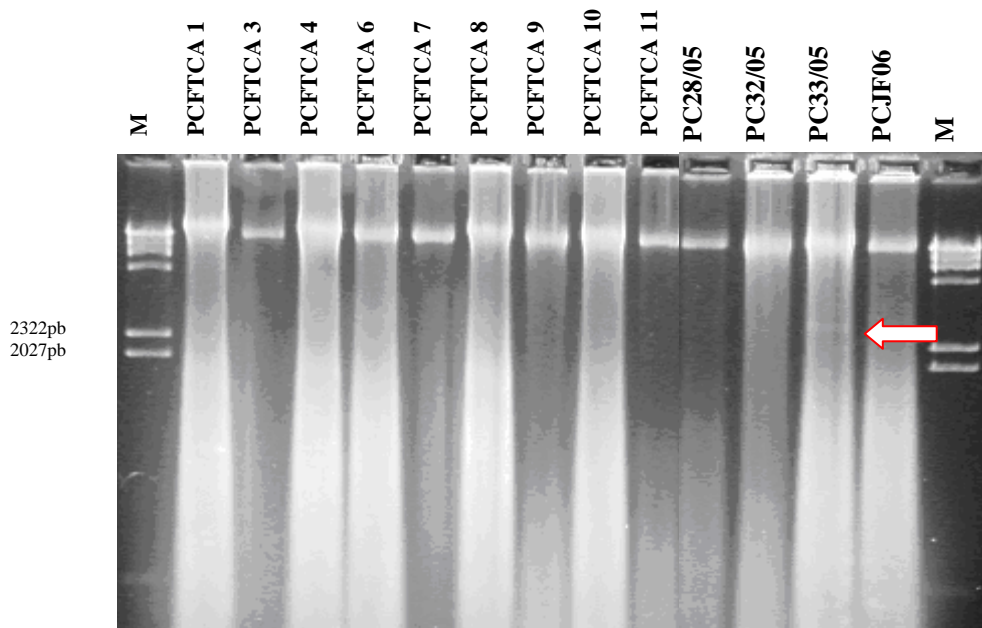
As partículas de RNAdf detectadas por microscopia eletrônica de transmissão na linhagem PCIAC19/02 apresentaram um tamanho aproximado de 30nm de diâmetro e o número de partículas visualizadas foi muito grande. Isso sustenta a hipótese dessas linhagens estarem infectados com vírus da família Totiviridae (KAVA-CORDEIRO, 2004).



**FONTE:** KAVA-CORDEIRO (2004)

**FIGURA 1:** ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DE ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS DE QUATRO LINHAGENS DE *G. citricarpa*

Notas: M: marcador de peso molecular DNA  $\lambda$ /HindIII. Seta indica a presença de RNAdf.



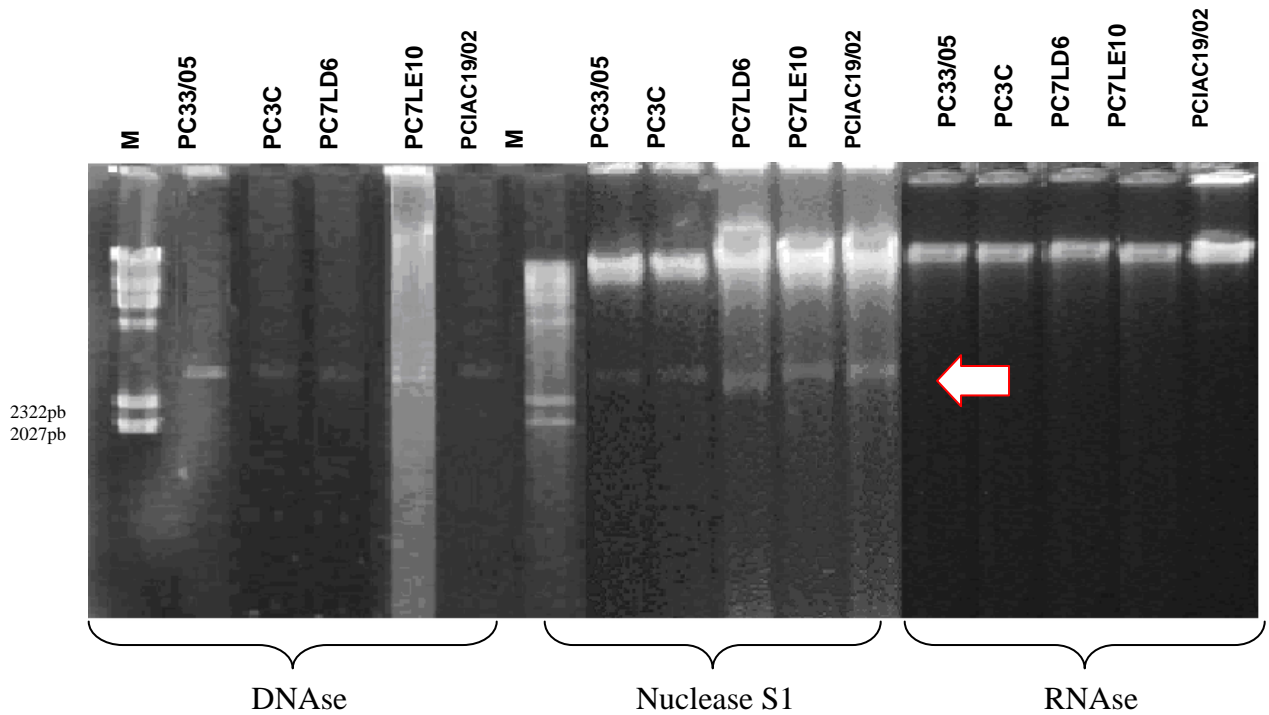
**FONTE:** O autor

**FIGURA 2:** ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DE ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS DE 13 LINHAGENS DE *G. citricarpa*

Notas: M: marcador de peso molecular DNA  $\lambda$ /HindIII. Seta indica a presença de RNAdf.

Nas figuras 1 e 2 as setas indicam as bandas de RNAdf de aproximadamente 3100 pb evidenciadas nas linhagens PC7LD6, PCIAC 19/02, PC3C, PC7LE10 e PC33/05. As linhagens PCFTCA 1, PCFTCA 3, PCFTCA 4, PCFTCA 6, PCFTCA 7, PCFTCA 8, PCFTCA 9, PCFTCA 10, PCFTCA 11, PCJF06, PC28/05 e PC32/05 não apresentaram RNAdf e portanto, não foram utilizadas no restante do trabalho.

A fim de confirmar que as bandas apresentadas pelas linhagens referem-se realmente a RNAdf, o DNA genômico foi submetido a três tratamentos, com Nuclease S1, com DNase e com RNase (Figura 3).



**FONTE:** O autor

**FIGURA 3:** PERFIL ELETROFORÉTICO DO DNA GENÔMICO DAS LINHAGENS COM RNAdf APÓS TRATAMENTO COM DNase, NUCLEASE S1 e RNase

Notas: (A) M: marcador de peso molecular DNA  $\lambda$ /HindIII. Seta indica a presença de RNAdf de aproximadamente 3100pb.

### 5.1.2 Cura do RNAdf

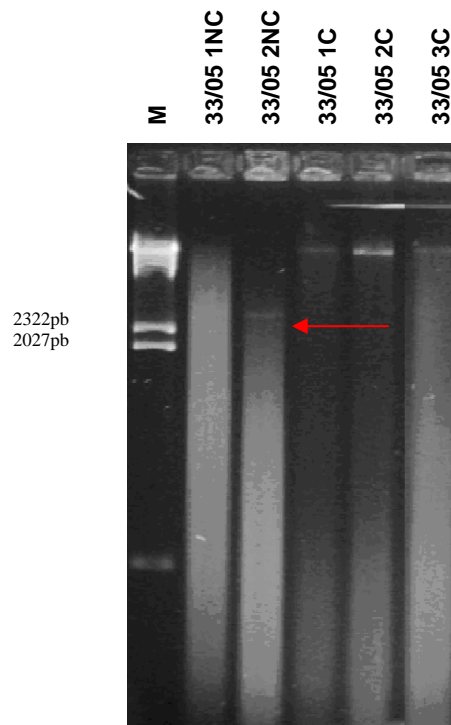
Inicialmente testou-se o protocolo de cura por tratamento com ciclohexaminada. Entretanto, todas as linhagens analisadas se mostraram extremamente sensíveis à presença de ciclohexamida em meio de cultura, inclusive na menor concentração utilizada, de 0,5 µg/mL. Nenhum dos pontos de repique das linhagens analisadas se desenvolveu e formou uma nova colônia tanto à 28°C quanto à 37°C, inviabilizando, portanto, a tentativa de cura por esta metodologia. Tal dificuldade já havia sido reportada por Robinson e Deacon (2001) no fungo fitopatogênico *Rhizoctonia solani* (AG3).

Sendo assim, foi testado o protocolo de cura por meio de exposição à temperatura moderadamente elevada, e repique em ponta de hifa. As placas de Petri contendo os inóculos de cada linhagem estudada foram incubadas a 37°C, temperatura moderadamente elevada para essa espécie. As colônias de todas as linhagens cresceram, mas com crescimento bastante reduzido.

Durante o tratamento para cura do RNAdf vários setores foram produzidos, especialmente nas linhagens PC33/05 e PCIAC19/02. Tais setores foram utilizados para obtenção de DNA e observou-se que em alguns deles não houve a cura do RNAdf (Figura 4). Os setores PC33/05 1NC e PC33/05 2NC, após o tratamento com temperatura moderadamente elevada, ainda apresentam a banda característica de RNAdf evidenciando portanto que não foram curados. Entretanto os setores PC33/05 1C, PC33/05 2C, PC33/05 3C e PC33/05 4C não apresentam mais a banda de RNAdf. Estes setores (PC33/05 1NC, PC33/05 2NC) foram utilizados como controle nos experimentos de avaliação da influência destas partículas virais na morfologia e fisiologia de *G. citricarpa*, visto que pertencem à colônias que sofreram o mesmo tratamento para cura.

A Figura 5 apresenta a eletroforese do DNA das cinco linhagens de *G. citricarpa* após tratamento, revelando sucesso na cura destas linhagens, uma vez que não apresentam as bandas correspondentes ao RNAdf.

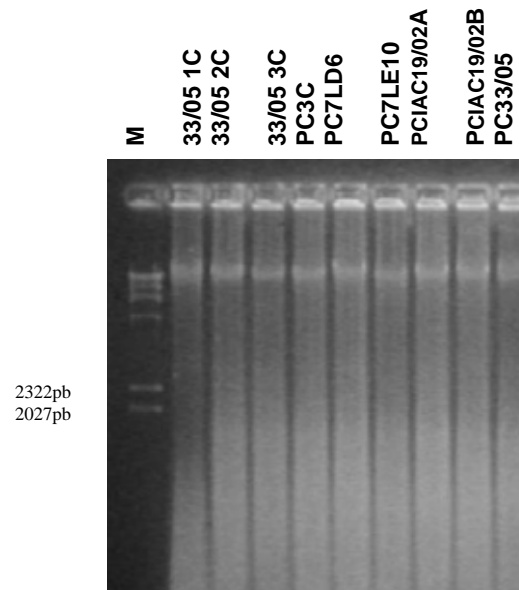
Robinson e Deacon (2001), não obtiveram sucesso na cura total do RNAdf do fungo fitopatogênico *Rhizoctonia solani* (AG3) com a técnica de subculturas de pontas de hifas. Tal dificuldade também foi relatada por Boland (1992), que também não obteve a cura do RNAdf em *Sclerotinia sclerotiorum*, utilizando subculturas de pontas de hifas e tratamento das colônias com calor ou ciclohexamida. O autor associou a hipovirulência do fungo com a presença do RNAdf.



**FONTE:** O autor

**FIGURA 4:** PERFIL ELETROFORÉTICO DO DNA GENÔMICO DOS SETORES DA LINHAGEM PC33/05

Notas: (A) M: marcador de peso molecular DNA  $\lambda$ HindIII. Seta indica a presença de RNAdf.



**FONTE:** O autor

**FIGURA 5:** PERFIL ELETROFORÉTICO DO DNA GENÔMICO DAS LINHAGENS DE *G. citricarpa* APÓS TRATAMENTO PARA CURA DO RNAdf

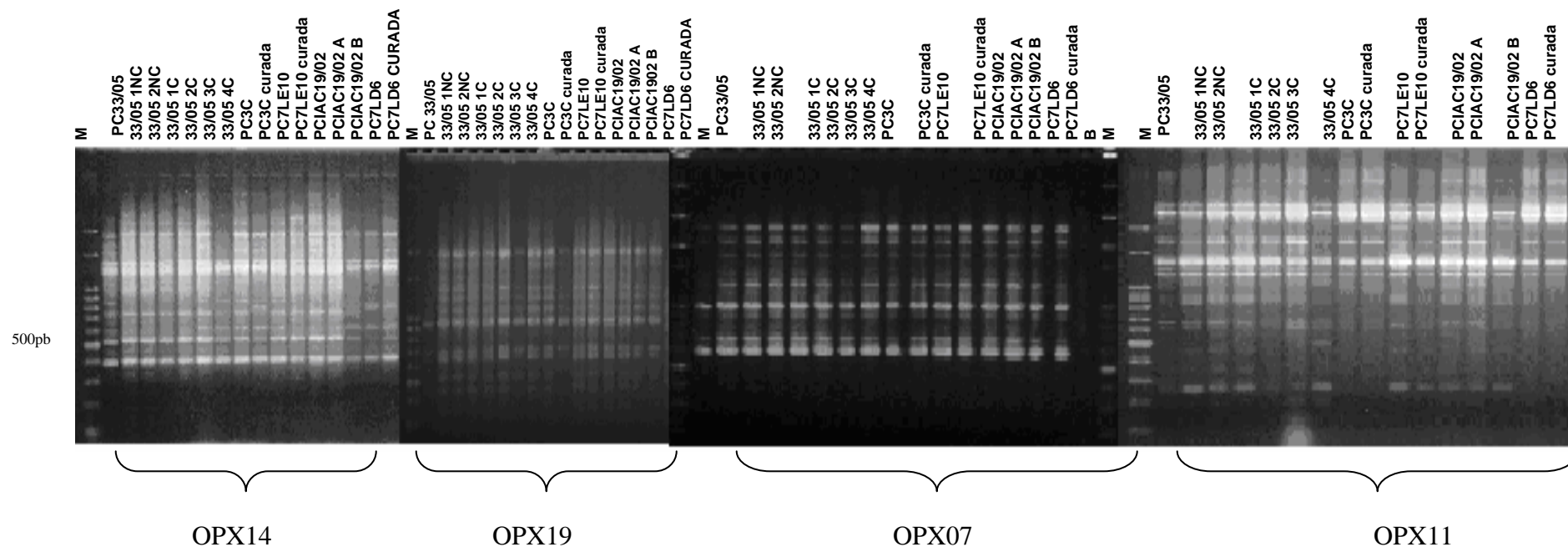
Notas: (A) M: marcador de peso molecular DNA  $\lambda$ HindIII. Seta indica a banda de DNA.

### 5.1.3 Análise Molecular

A fim de confirmar a isogenia das linhagens curadas com as linhagens contendo RNAdf, foi realizada a análise por meio de marcadores moleculares do tipo RAPD e seqüenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA.

#### 5.1.3.1. RAPD

Foram utilizados 4 oligonucleotídeos iniciadores gerando 46 bandas (Figura 6). Uma vez que as linhagens pertencem à mesma espécie, apresentaram perfis de bandas muito semelhantes. Em princípio, é possível verificar que os setores curados referem-se a *G. citricarpa*, descartando-se a possibilidade de corresponderem a contaminantes.



Nota: M: Marcador de peso molecular, DNA *Ladder* de 100pb. B: Controle sem DNA.

FIGURA 06: PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DE RAPD UTILIZANDO OS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES OPX

07, OPX11, OPX14, OPX19 DAS LINHAGENS CURADAS E COM RNAdf DE *Guignardia citricarpa*

FONTE: O autor



### 5.1.3.2. Seqüenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA

Para comprovar que as linhagens infectadas com RNAdf e as linhagens curadas são realmente isogênicas, foi realizada uma PCR com os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4, que amplificam a região ITS1 – rDNA 5,8S – ITS2, e são universais para fungos. Dentre as amostras submetidas à reação não foi observado polimorfismo, pois todos apresentaram a amplificação de um fragmento de aproximadamente 650 pb, de acordo com o esperado para fungos Ascomicetos, que amplificam fragmentos de aproximadamente 700 pb (WHITE; MORROW, 1990).

Procedeu-se então, o seqüenciamento desta região. Após o alinhamento e edição das seqüências contendo a região ITS1 – rDNA 5,8S – ITS2, das linhagens infectadas com RNAdf e as linhagens curadas, os nucleotídeos foram comparados com o banco de dados de seqüência (Genbank). Foi possível a verificação de que as linhagens curadas não se tratam de contaminantes, o que poderia justificar as alterações em características morfológicas e fisiológica descritas neste trabalho. Esse resultado vem corroborar com os dados obtidos por meio de marcadores RAPD.

Para montar a árvore filogenética (Figura 7), onde é possível visualizar a semelhança entre as seqüências, foram utilizadas, além das 16 seqüências obtidas neste trabalho, mais 3 de *G. mangiferae* (EU273524.1, EF488437.1, DQ480349.1) e 3 de *G. citricarpa* (AF374370.1, AF374371.1, AF346772.1) retiradas do banco de dados de seqüências (Genbank). As linhagens de *G. mangiferae* foram utilizadas como grupo externo.

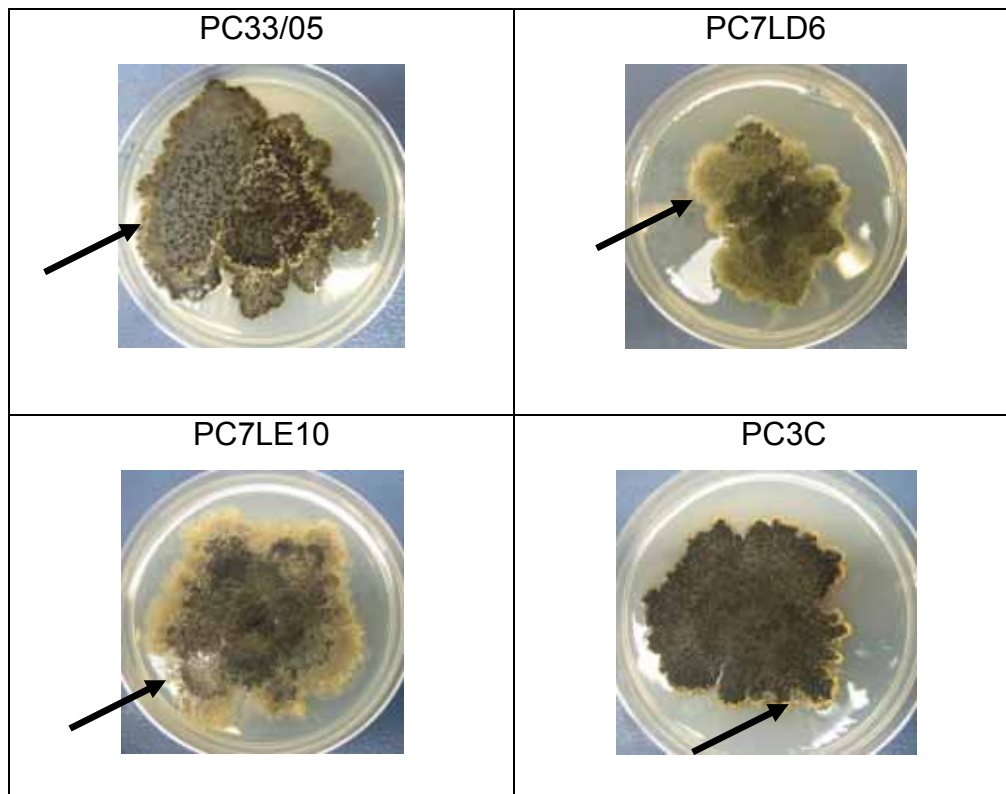


#### 5.1.4. Análise Morfológica

Cinco linhagens isogênicas de *G. citricarpa*, contendo RNAdf e curadas foram submetidas à análise comparativa das características morfológicas e fisiológicas, como: crescimento micelial, melanização de apressório, tamanho do tubo germinativo, produção de esporos, produção de picnídios e taxa de germinação de esporos.

##### 5.1.4.1. Macromorfologia

Após 2 gerações de incubação a 37°C e o repique em ponta de hifa, verificou-se que quando incubadas novamente a 28°C, as linhagens PC33/05, PC7LD6, PC7LE10 e PC3C cresceram de maneira diferente da habitual, formando setores de morfologia diferente, como pode ser observado na figura 8. A formação de setores pode refletir a instabilidade mitótica deste fungo e pode, também, estar relacionado à perda do RNAdf.



**FONTE:** O autor

**FIGURA 8:** MACROMORFOLOGIA DE *Guignardia citricarpa* APÓS 20 DIAS DE CRESCIMENTO EM MC A 28° C

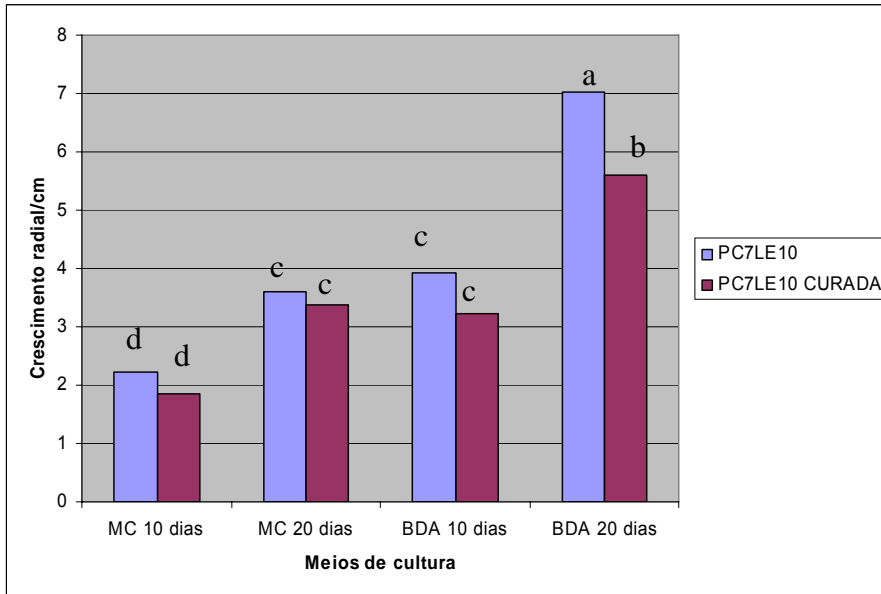
**Nota:** setas indicam os setores

#### 5.1.4.2. Crescimento Radial

A fim de avaliar a influência do RNAdf na taxa de crescimento radial, as linhagens isogênicas de cada linhagem de *G. citricarpa* foram avaliadas comparativamente após 10 e 20 dias de crescimento nos meios de cultura MC e BDA a 28° C. Nos Gráficos 1 a 5 estão representadas as médias de 5 repetições. Nos Anexos 1 a 5 estão representados os resultados das Análises de Variância (ANOVA) e dos testes de média Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Para as linhagens PC7LE10, PC7LD6 e PC3C, houve diferença significativa no diâmetro radial entre as linhagens isogênicas, após 20 dias de incubação no meio de cultura BDA. As linhagens curadas cresceram menos que as linhagens originais contendo as partículas de RNAdf (Gráficos 1 a 3, Figuras 9, 10 e 11 e Anexos 1 a 3). Para as linhagens PC7LD6 e PC3C tais diferenças já são observadas após 10 dias de crescimento em meio BDA. Entretanto, o Meio Completo não permite tal discriminação.

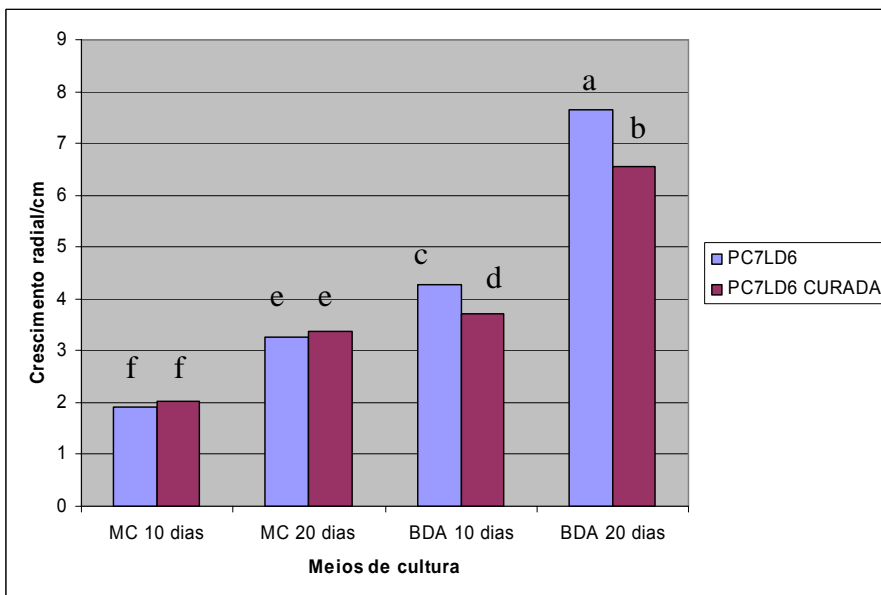
Em estudos feitos com a espécie *Chalara elegans*, Punja (1994), também, verificou que a presença de RNAdf no fungo estava associada com a redução do crescimento e alterações da colônia. Resultados contrários a este foram obtidos por Zhou e Boland (1999), estes autores verificaram que linhagens hipovirulentas (com RNAdf) de *S. sclerotiorum*, produziam menor quantidade de massa micelial do que linhagens virulentas (livres de RNAdf) em meio de batata líquido (PDB). Melzer e Boland (1996) observaram que para a espécie *Sclerotinia minor*, a presença de RNAdf não necessariamente induz a hipovirulência, uma vez que alguns isolados virulentos também apresentaram esses elementos.



**FONTE:** O autor

**GRÁFICO 1:** MÉDIA DO CRESCIMENTO RADIAL DAS LINHAGENS PC7LE10 E PC7LE10 CURADA APÓS 10 E 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28° C EM MEIO MC E BDA

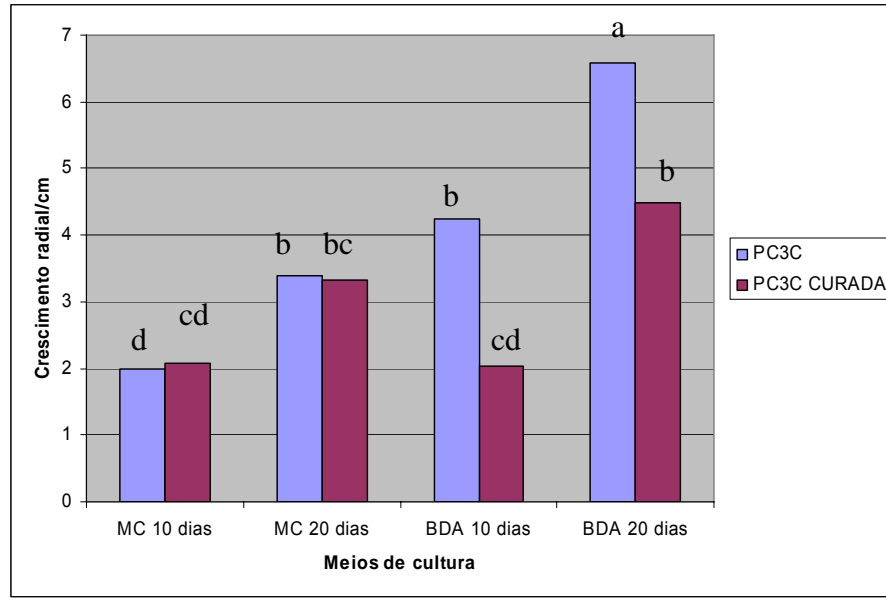
Nota: As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



**FONTE:** O autor

**GRÁFICO 2:** MÉDIA DO CRESCIMENTO RADIAL DAS LINHAGENS PC7LD6 E PC7LD6 CURADA APÓS 10 E 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28° C EM MEIO MC E BDA

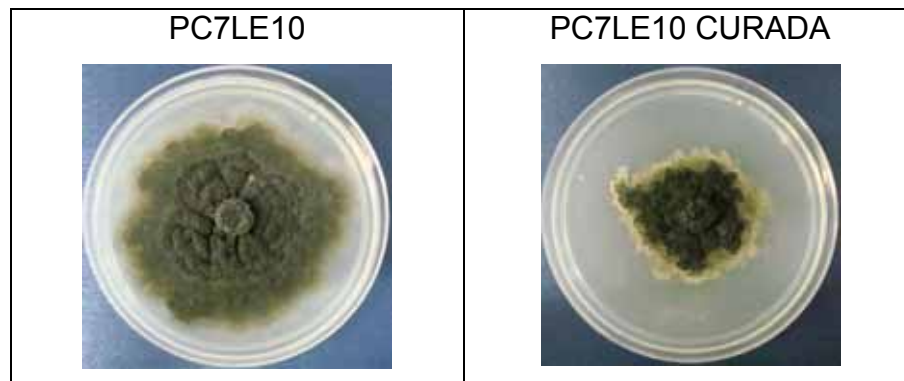
Nota: As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



**FONTE:** O autor

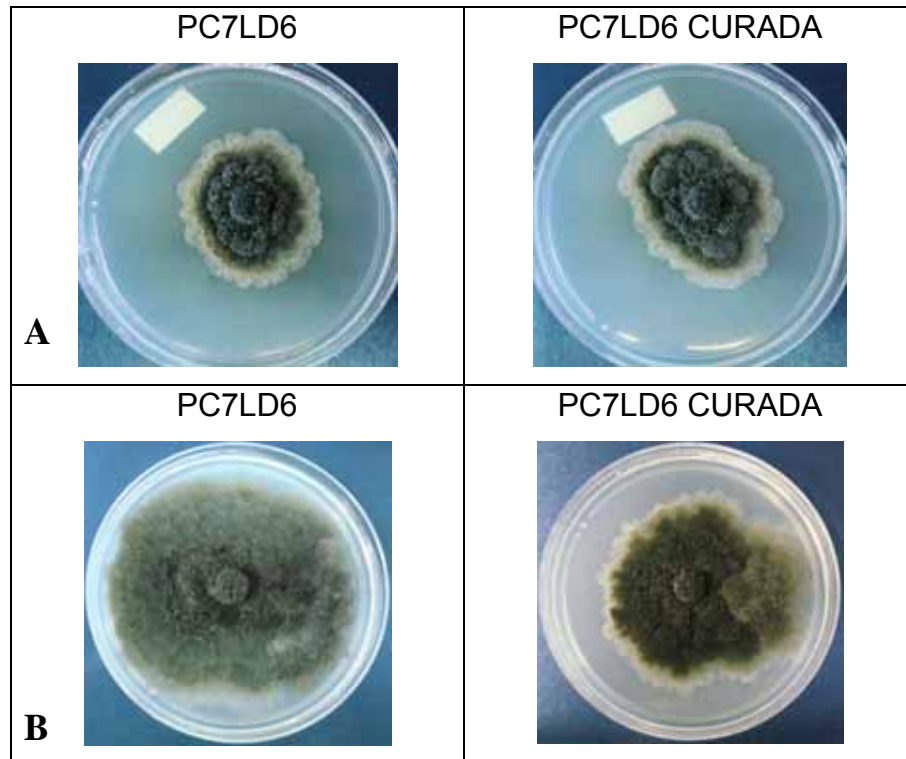
**GRÁFICO 3:** MÉDIA DO CRESCIMENTO RADIAL DAS LINHAGENS PC3C E PC3C CURADA APÓS 10 E 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28° C EM MEIO MC E BDA

Nota: As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



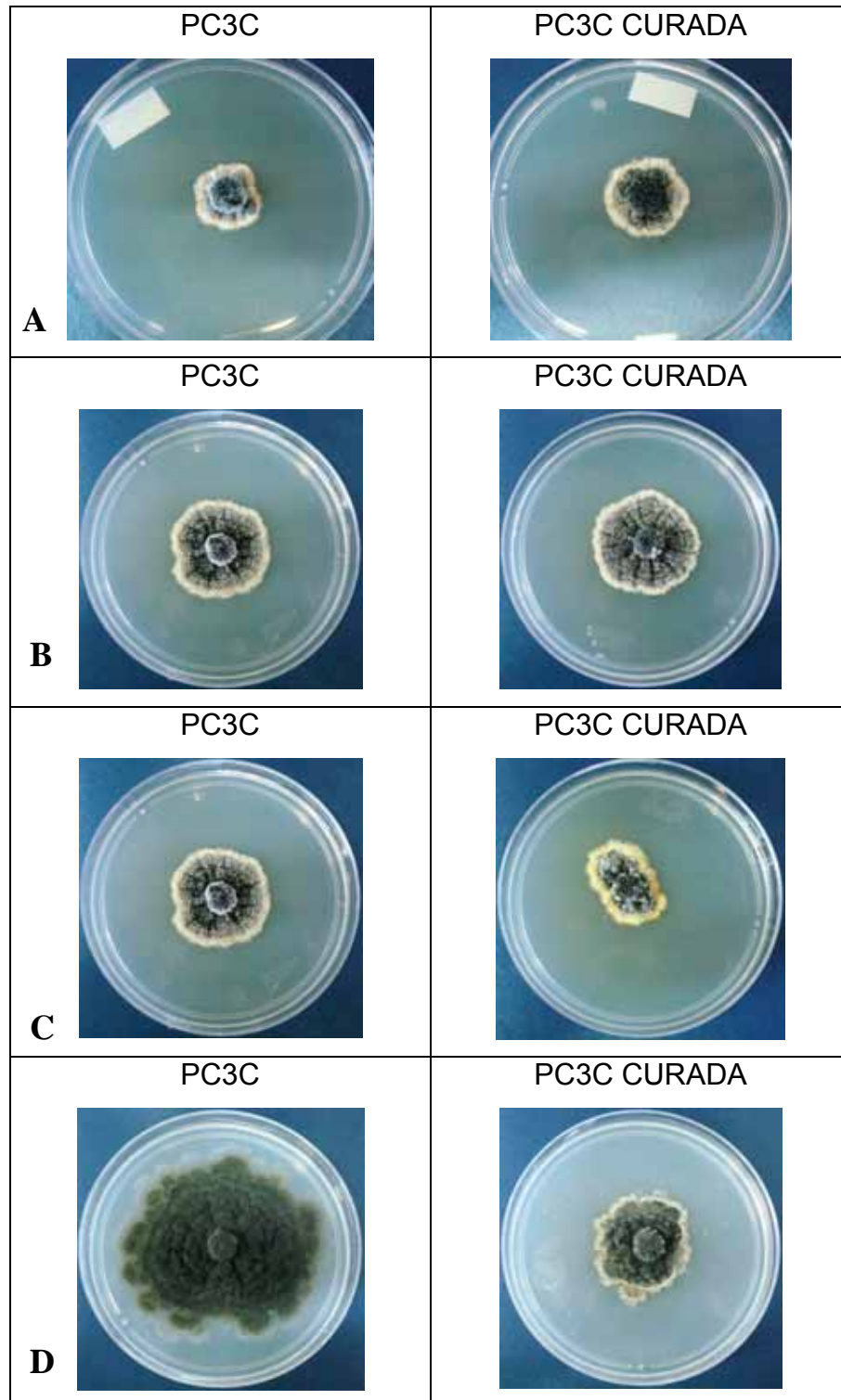
**FONTE:** O autor

**FIGURA 9:** LINHAGENS ISOGÊNICAS PC7LE10 E PC7LE10 CURADA APÓS 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C EM MEIO BDA



**FONTE:** O autor

**FIGURA 10:** LINHAGENS ISOGÊNICAS PC7LD6 E PC7LD6 CURADA APÓS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C EM MEIO BDA (A), E EM 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C EM MEIO BDA (B)

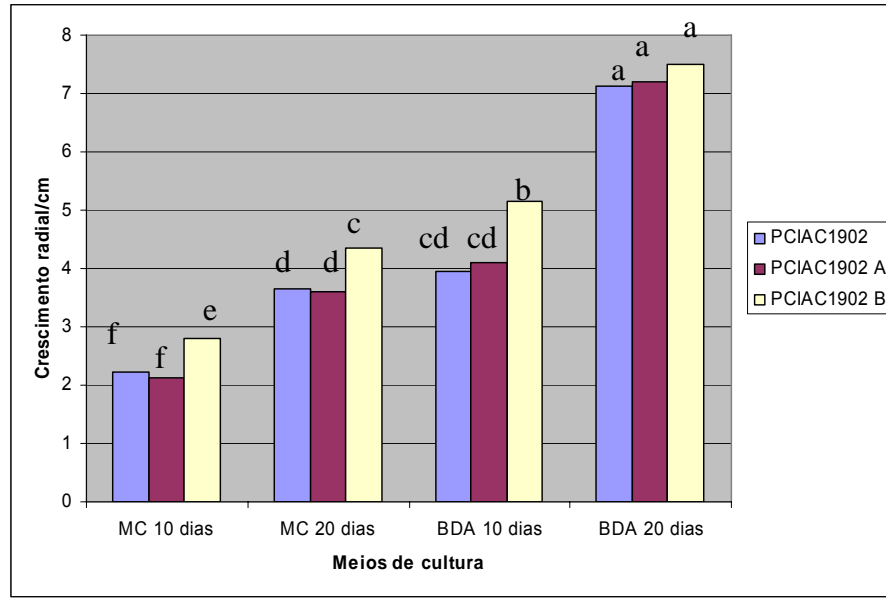


**FONTE:** O autor

**FIGURA 11:** LINHAGENS ISOGÊNCIAS PC3C E PC3C CURADA APÓS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C EM MEIO MC (A), EM 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C EM MEIO MC (B), EM 10 DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO BDA (C) E EM 20 DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO BDA (D)



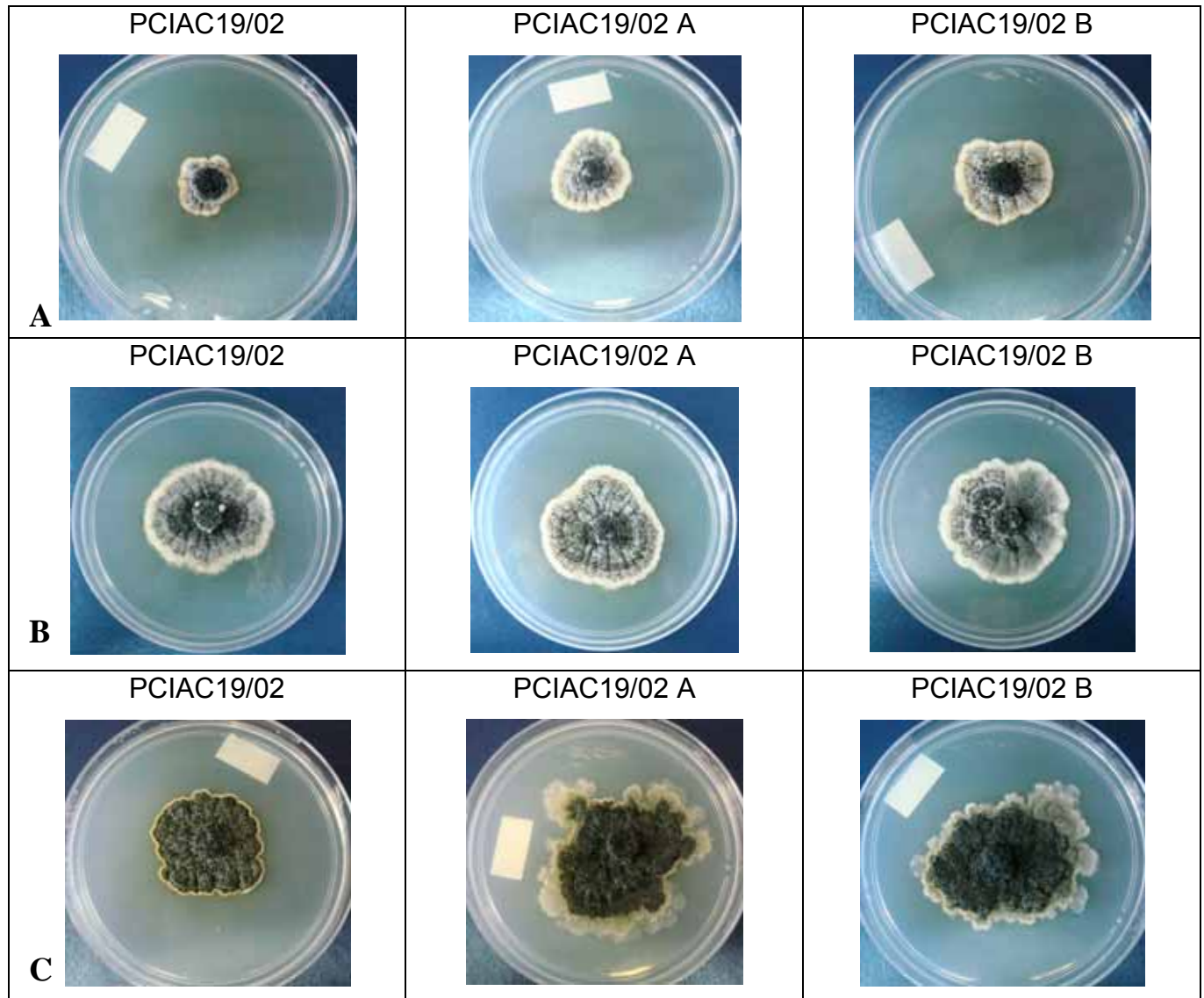
Há vários relatos na literatura que demonstram diferentes influências que partículas de RNAdf causam sobre diferentes espécies fúngicas. No presente trabalho também foi observado respostas diferentes em função da presença de RNAdf. Na linhagem PCIAC19/02 o RNAdf parece exercer pouca influência no crescimento micelial, porém quando ela é observada, percebe-se que o RNAdf parece limitar o crescimento do fungo. Isto pode ser observado no Gráfico 4 (também na Figura 17 e Anexo 4), uma vez que as linhagens curadas PCIAC19/02 A e PCIAC19/02 B apresentaram crescimento radial superior em quase todos os tempos e meios de cultivo analisados neste trabalho. Resultados semelhantes foram obtidos por Howitt *et al.* (1995) em *Botrytis cinerea*. Estes autores compararam várias linhagens contendo RNAdf com linhagens livres destes elementos e encontraram uma diferença na taxa de crescimento e virulência, sendo menores para o grupo contendo RNAdf. A diferença de ação do RNAdf observada no presente trabalho, pode ser causada por vários fatores. Uma possibilidade é a de que a partícula de RNAdf presente nesta linhagem, não seja a mesma encontrada nas demais analisadas aqui. Reforça esta hipótese, a sutil diferença de tamanho desta partícula quando separada por eletroforese em gel de agarose (Figura 1). A fim de comprovar tal hipótese, sugere-se que seja realizada eletroforese em gel de poliacrilamida que possui maior capacidade de separação de moléculas de tamanhos muito próximos. Além disso, faz-se necessário o seqüenciamento destas moléculas de RNAdf e a análise em microscopia eletrônica de transmissão. Tais experimentos serão realizados em etapas futuras.



**FONTE:** O autor

**GRÁFICO 4:** MÉDIA DO CRESCIMENTO RADIAL DA LINHAGEM PCIAC19/02 E SEUS SETORES CURADOS PCIAC19/02 A E PCIAC19/02 B APÓS 10 E 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28° C EM MEIO MC E BDA

Nota: As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

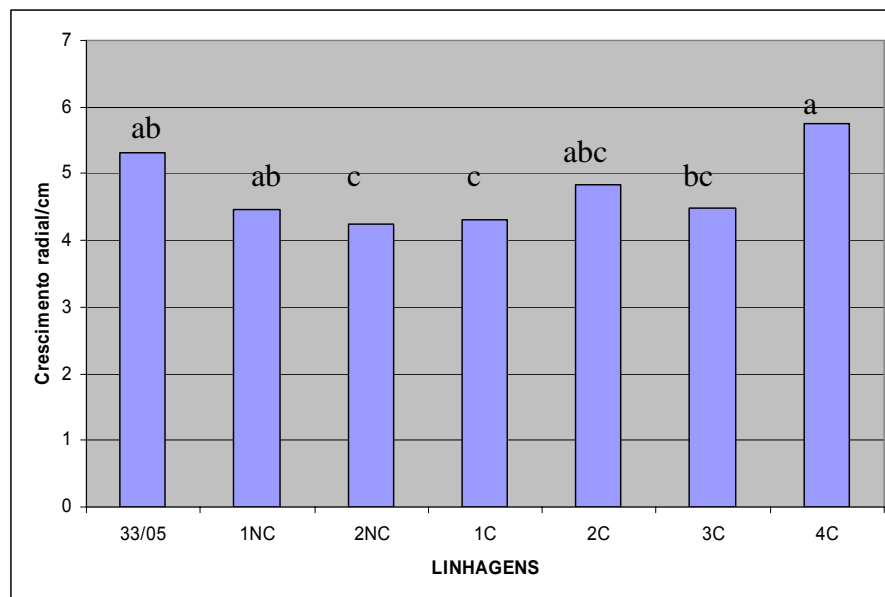


**FONTE:** O autor

**FIGURA 12:** LINHAGENS ISOGÊNICAS PCIAC19/02, PCIAC19/02 A E PCIAC19/02 B APÓS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C EM MEIO MC (A), EM 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C EM MEIO MC (B), EM 10 DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO BDA (C)

Em função da linhagem PC33/05 possuir além de setores curados também setores não curados (mas que passaram pelo estresse da temperatura elevada), as análises foram feitas separadamente (Gráficos 5 a 8 e Anexos 5 a 8). Em todos os tempos de incubação e meios de cultura, o setor curado PC33/05 1C apresentou crescimento estatisticamente menor que a linhagem com o RNA<sup>df</sup> (Gráficos 5 a 8, setas vermelhas). Por outro lado, o setor PC33/05 2C (curado) apresentou crescimento radial menor estatisticamente que a linhagem portadora do RNA<sup>df</sup> (PC33/05) apenas quando incubado em meio MC (Gráficos 7 e 8).

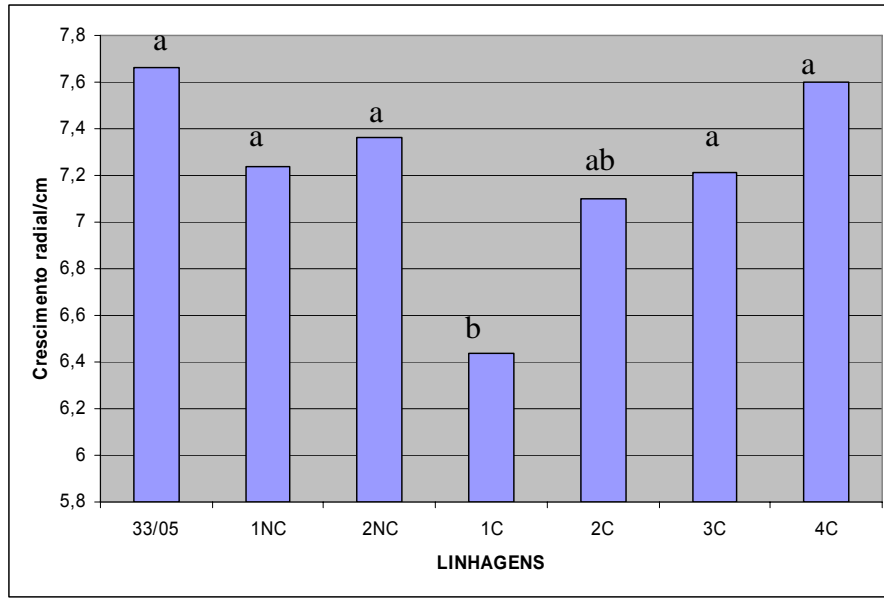
Considerando a linhagem PC33/05 e seus setores (PC33/05 1NC e PC33/05 2NC que passaram pelo estresse da temperatura elevada, mas não perderam o RNAdf) e as linhagens isogênicas curadas PC33/05 1C, PC33/05 2C, PC33/05 3C e PC33/05 4C após 10 dias de crescimento em meio MC, observou-se que a linhagem PC33/05 com RNAdf cresceu menos que o setor PC33/05 1NC e a linhagem PC33/05 4C. Comparando com setores PC33/05 2NC, PC33/05 1C e PC33/05 2C, a PC33/05 original apresentou um crescimento micelial maior (Gráfico 5, Figura 13 e anexo 5). Após 10 dias em BDA os setores PC33/05 2NC e PC33/05 1C cresceram significativamente menos quando comparadas a linhagem PC33/05 com RNAdf, comparando com os demais setores não houve diferença significativa (Gráfico 5). Após 20 dias de incubação em MC os setores PC33/05 1C e PC33/05 2C cresceram menos que a linhagem PC33/05, já o setor PC33/05 4C cresceu mais que a linhagem PC33/05 (Gráfico 8). Em BDA a linhagem PC33/05 1C foi a única que cresceu significativamente menos comparando com a linhagem PC33/05. Nos outros setores não houve diferença significativa de crescimento (Gráfico 6, Figura 13 e anexo 5).



**FONTE:** O autor

**GRÁFICO 5:** MÉDIA DO CRESCIMENTO RADIAL DA LINHAGEM PC33/05 E SEUS SETORES NÃO CURADOS PC33/05 1NC E PC33/05 2NC E OS SETORES CURADOS PC33/05 1C, PC33/05 2C, PC33/05 3C E PC33/05 4C APÓS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C EM MEIO BDA

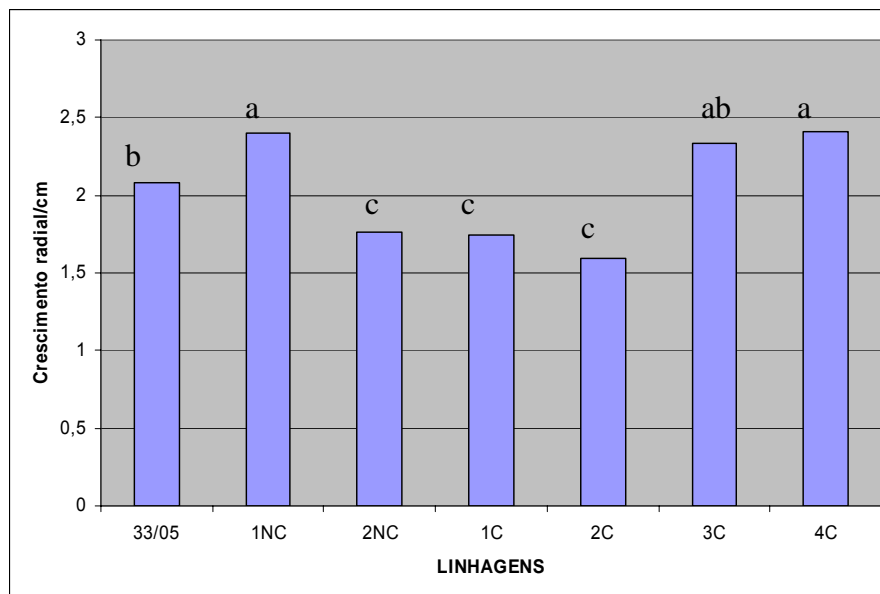
Nota: As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



**FONTE:** O autor

**GRÁFICO 6:** MÉDIA DO CRESCIMENTO RADIAL DA LINHAGEM PC33/05 E SEUS SETORES NÃO CURADOS PC33/05 1NC E PC33/05 2NC E OS SETORES CURADOS PC33/05 1C, PC33/05 2C, PC33/05 3C E PC33/05 4C APÓS 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C EM MEIO BDA

Nota: As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



**FONTE:** O autor

**GRÁFICO 7:** MÉDIA DO CRESCIMENTO RADIAL DA LINHAGEM PC33/05 E SEUS SETORES NÃO CURADOS PC33/05 1NC E PC33/05 2NC E OS SETORES CURADOS PC33/05 1C, PC33/05 2C, PC33/05 3C E PC33/05 4C APÓS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C EM MEIO MC

Nota: As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

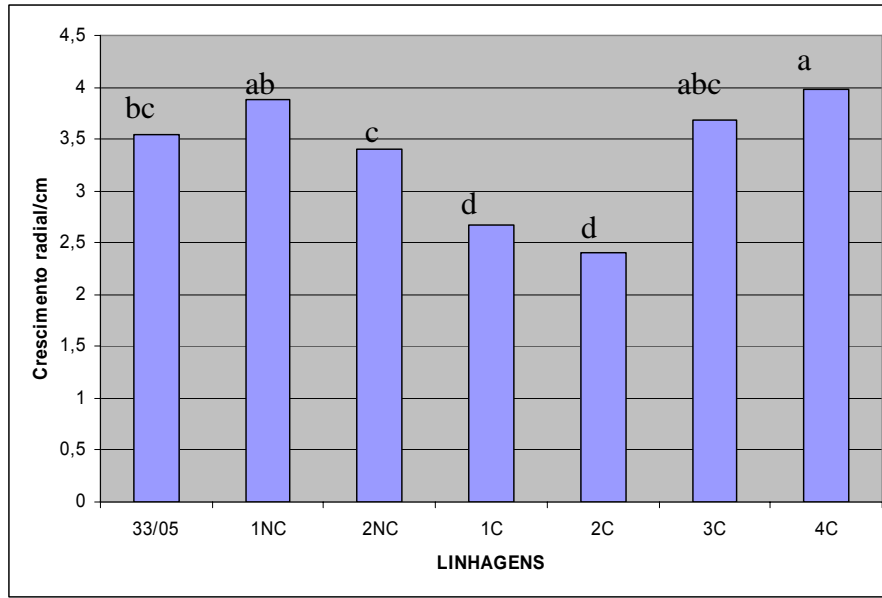


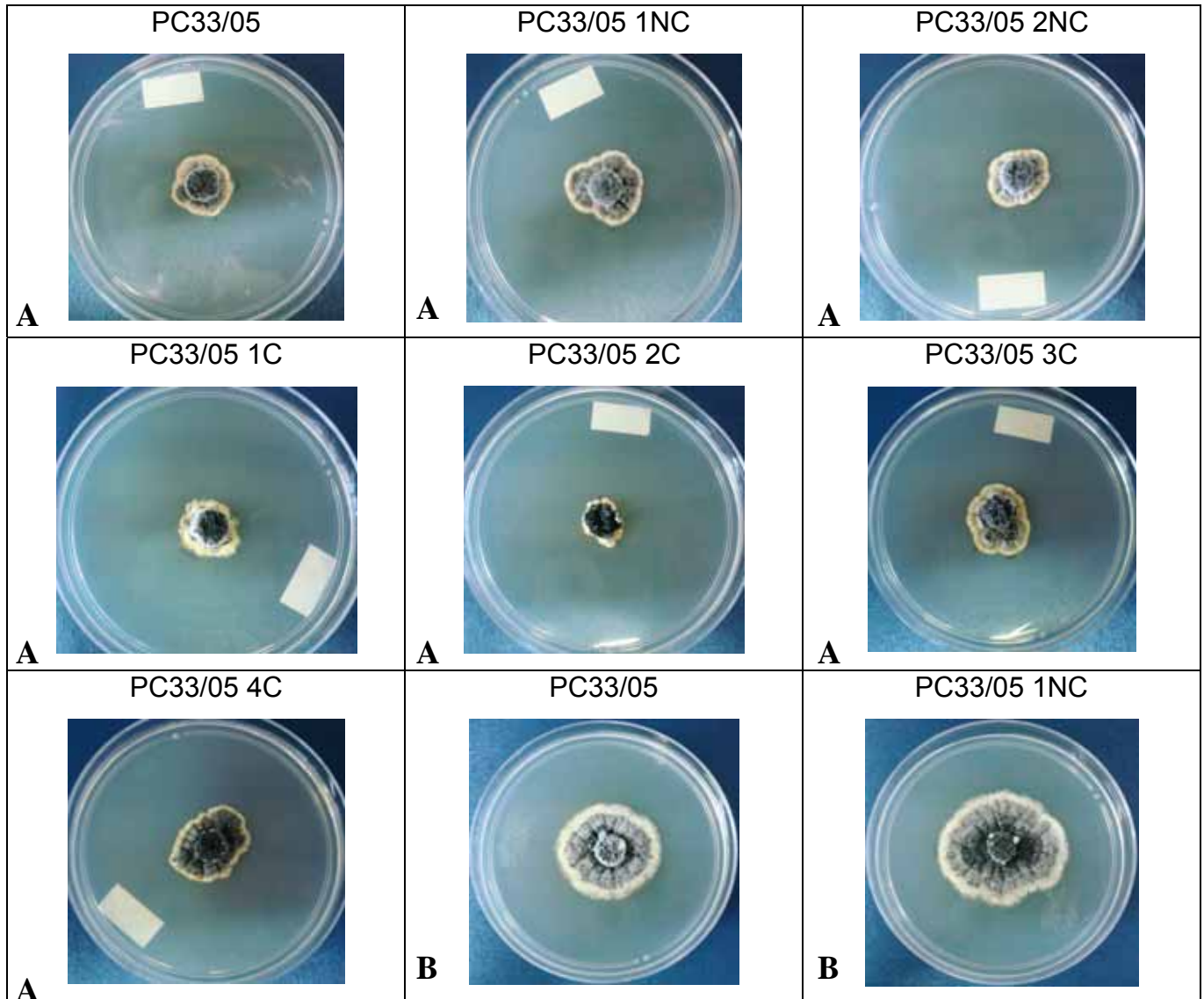
GRÁFICO 8: MÉDIA DO CRESCIMENTO RADIAL DA LINHAGEM PC33/05 E SEUS SETORES NÃO CURADOS PC33/05 1NC E PC33/05 2NC E OS SETORES CURADOS PC33/05 1C, PC33/05 2C, PC33/05 3C E PC33/05 4C APÓS 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C EM MEIO MC

Nota: As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os setores curados PC33/05 3C e PC33/05 4C não apresentaram crescimento radial estatisticamente diferente dos controles portadores de RNAdf, independente do meio de cultivo ou tempo de incubação. Uma possível explicação seria uma flutuação na titulação das moléculas de RNAdf decorrente do estresse do processo de cura para explicar os resultados encontrados para o setor não curado PC33/05 2NC (Gráficos 5 a 8). Em meio MC (10 e 20 dias) e em meio BDA (10 dias) tal setor apresentou crescimento radial estatisticamente menor que o controle com RNAdf (PC33/05). Outra hipótese é que a diminuição no crescimento radial neste setor tenha sido causada pelo estresse de temperatura moderadamente alta. A fim de verificar tais hipóteses, sugere-se extrair novamente os ácidos nucléicos totais destes setores. Por outro lado, não houve diferença estatística entre o crescimento do setor PC33/05 1NC e do controle PC33/05, após 10 e 20 dias de crescimento em meio BDA e 20 dias em meio MC. Após 10 dias de incubação em meio MC, o setor PC33/05 1NC cresceu mais do que o controle PC33/05.

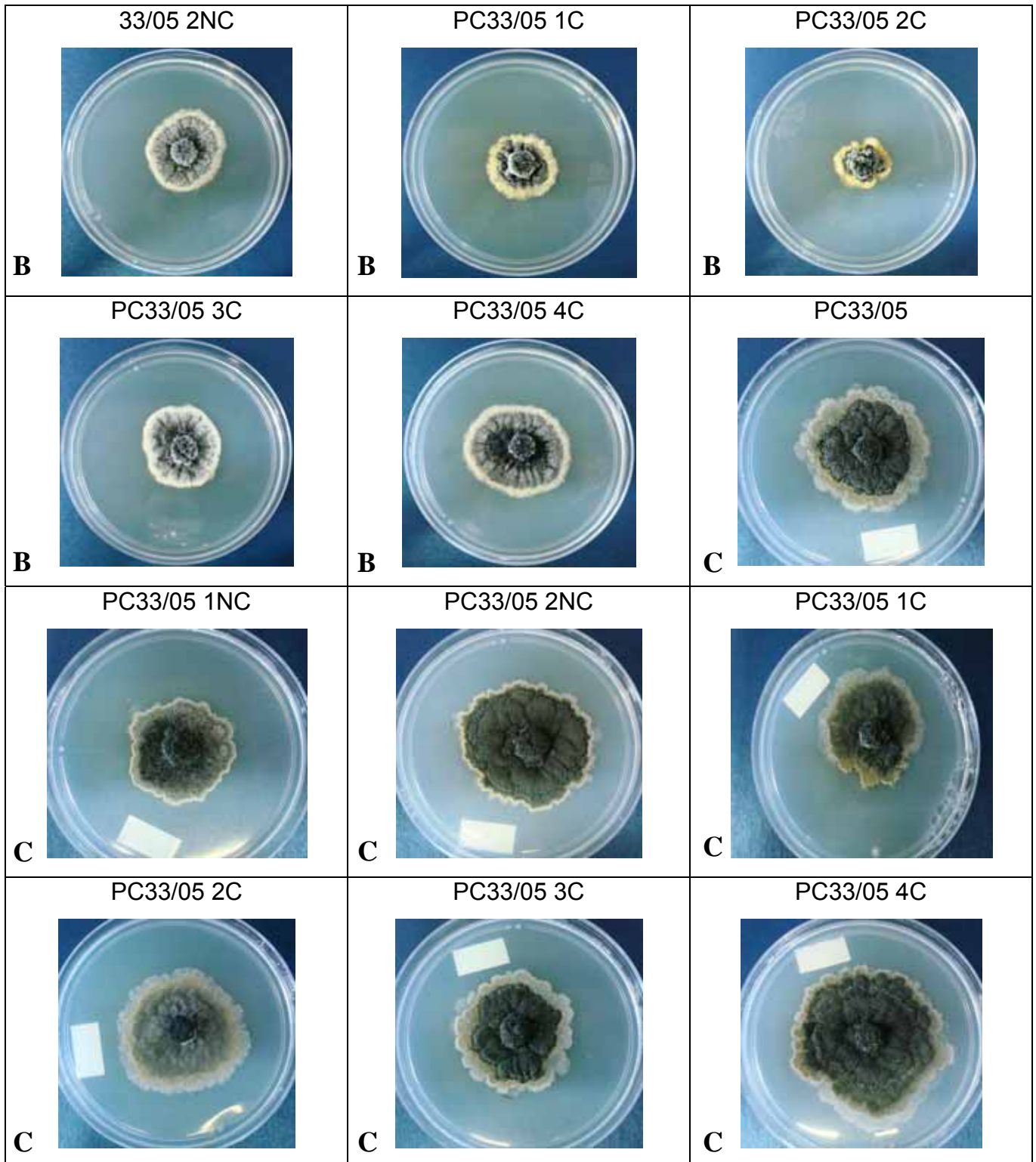
Assim, analisando os gráficos 1 a 8, verifica-se uma tendência a menor crescimento nas linhagens curadas do que nas respectivas isogênicas (com exceção da PCIAC19/02), o que pode sugerir que as moléculas de RNAdf presentes nestas

linhagens estejam contribuindo para o crescimento do fungo. Nas figuras 9 a 13 esta ilustrada a morfologia das linhagens isogênicas nas quais houve diferenças significativas no crescimento radial.



**FONTE:** O autor

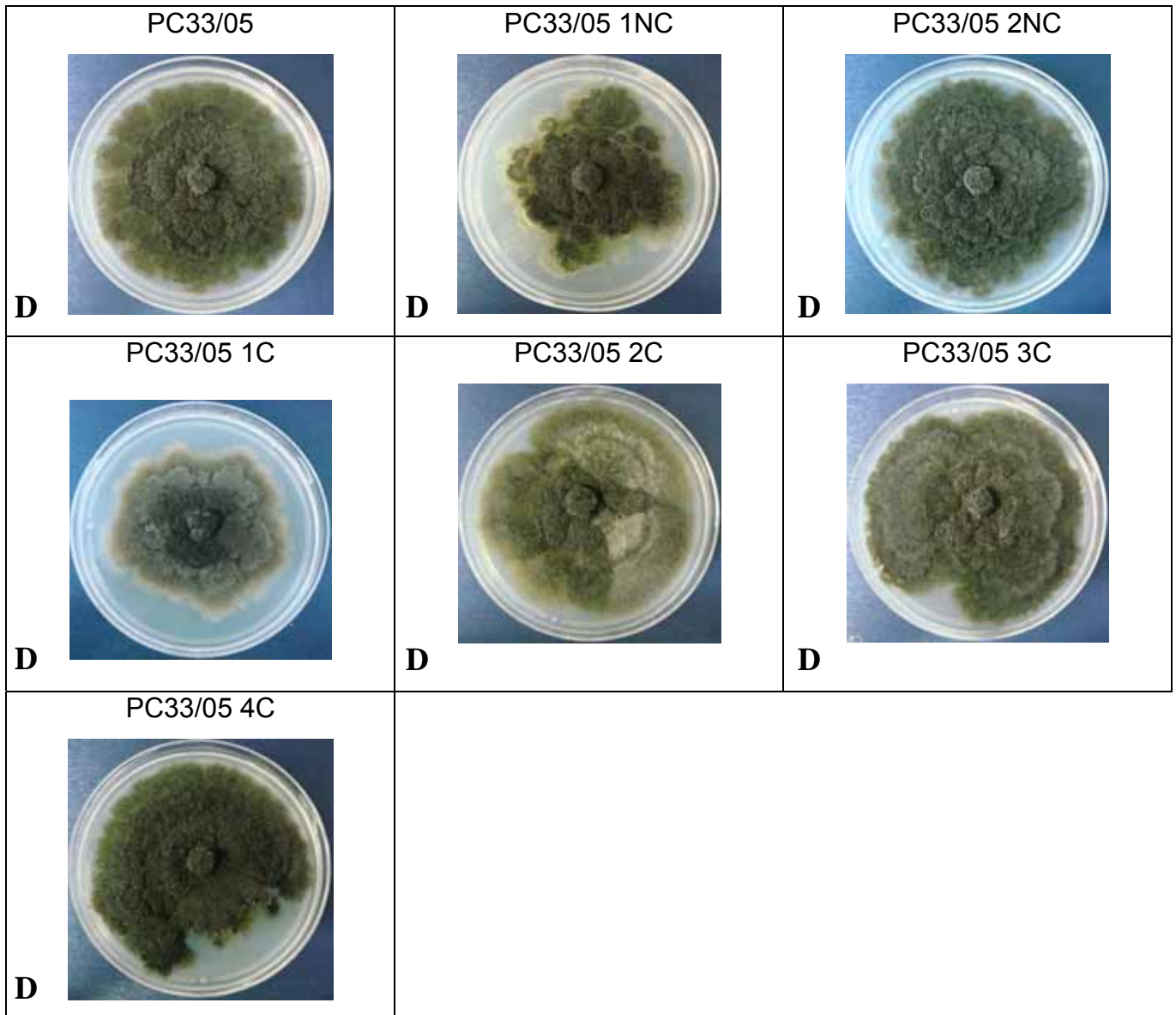
**FIGURA 13:** LINHAGENS ISOGÊNICAS PC33/05, PC33/05 1NC, PC33/05 2NC, PC33/05 1C, PC33/05 2C, PC33/05 3C E PC33/05 4C APÓS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C EM MEIO MC (A), EM 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C EM MEIO MC (B), EM 10 DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO BDA (C), E EM 20 DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO BDA (D), (CONTINUA)



**FONTE:** O autor

**FIGURA 13:** LINHAGENS ISOGÊNICAS PC33/05, PC33/05 1NC, PC33/05 2NC, PC33/05 1C, PC33/05 2C, PC33/05 3C E PC33/05 4C APÓS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C EM MEIO MC (A), EM 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C EM MEIO MC (B), EM 10 DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO BDA (C), E EM 20 DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO BDA (D), (CONTINUA)





**FONTE:** O autor

**FIGURA 13:** LINHAGENS ISOGÊNICAS PC33/05, PC33/05 1NC, PC33/05 2NC, PC33/05 1C, PC33/05 2C, PC33/05 3C E PC33/05 4C APÓS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C EM MEIO MC (A), EM 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C EM MEIO MC (B), EM 10 DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO BDA (C), E EM 20 DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO BDA (D), (CONCLUSÃO DA FIGURA)

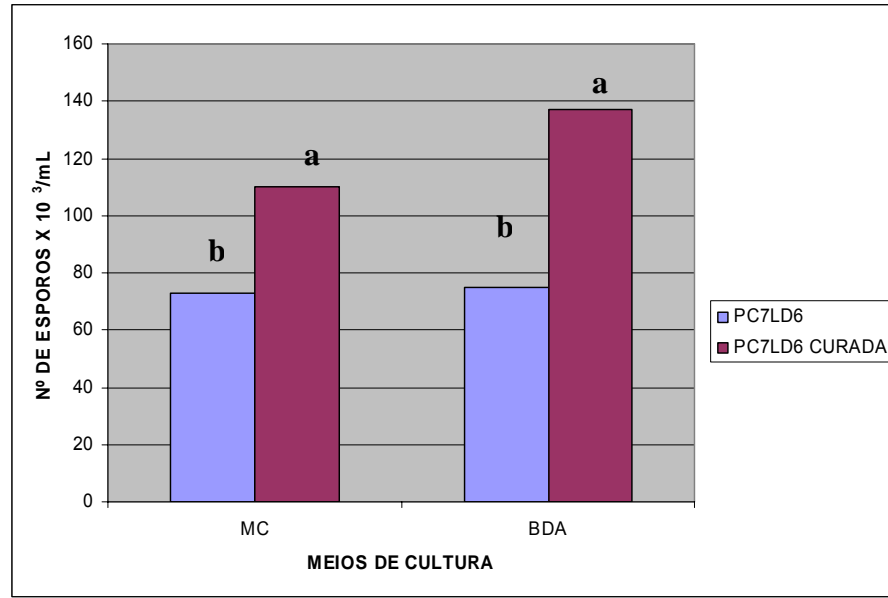
Quando se compara o crescimento radial nos dois meios de cultura analisados (MC e BDA) pode-se perceber que todas as linhagens tiveram um crescimento mais expressivo no meio BDA, tanto aos 10 dias de incubação (Anexo 21) quanto após 20 dias de incubação (Anexo 22). Isto possivelmente contribuiu para que as maiores diferenças entre as linhagens isogênicas tenham sido encontradas após crescimento em meio BDA. Igualmente, o maior tempo de crescimento facilitou esta distinção.

Assim, sugere-se que em futuros trabalhos com esta espécie de fungo, o crescimento micelial de linhagens isogênicas seja comparado após 20 dias de crescimento em meio de cultura BDA. O crescimento micelial pode ser quantificado também em meio BDA líquido. ZHOU e BOLAND (1999) verificaram que linhagens hipovirulentas (com RNAdf) produziram menor quantidade de massa micelial do que linhagens virulentas (livres de RNAdf) em meio BDA líquido.

#### 5.1.4.3. Esporulação

A principal forma de disseminação do fungo *G. citricarpa* no campo é por meio de esporos que aderem na superfície do fruto onde germinam formando as lesões típicas da doença Mancha Preta dos Citros. Em função disso, a produção de conídios foi utilizada na comparação das linhagens isogênicas (com e sem RNAdf). Os resultados podem ser observados nos Gráficos 9 a 14 que apresentam as médias de 5 repetições. Os resultados não são conclusivos, pois para cada linhagem a cura do RNAdf aparentemente causou diferentes efeitos, diminuindo ou aumentando a produção de esporos, ou até não apresentando qualquer efeito. O efeito também diferiu em função do meio de cultura utilizado. Novamente, observou-se grande variação na influência do RNAdf nestas linhagens, sendo que algumas linhagens contendo o RNAdf esporularam menos do que as isogênicas curadas (PC7LD6, PC3C e PCIAC19/02) e algumas esporularam mais do que as curadas (PC7LE10 e PC33/05). Os resultados estão sumarizados nos gráficos 9 a 14 e anexos 9 a 14.

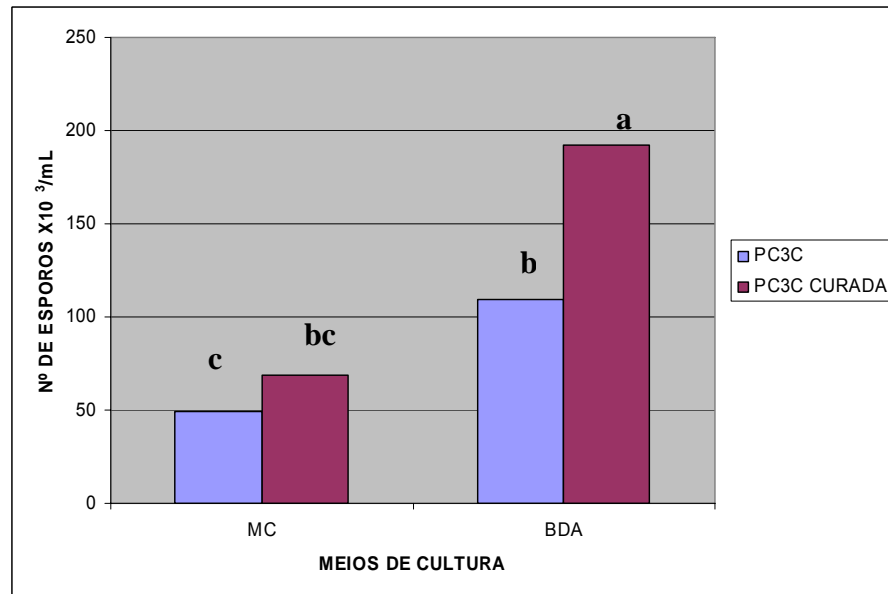
Observa-se no gráfico 9 que a linhagem PC7LD6 com RNAdf esporulou menos do que a isogênica curada em ambos meios de cultura (Anexo 10). Boland (1992) cita uma possível associação entre RNAdf e hipovirulência no fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, já que isolados virulentos não apresentaram RNAdf e a transmissão de RNAdf ocorreu associada com o fenótipo de hipovirulência para as linhagens virulentas.



**FONTE:** O autor

**GRÁFICO 9:** NÚMERO DE ESPOROS PRODUZIDOS PELAS LINHAGENS PC7LD6 E PC7LD6 CURADA APÓS 10 E 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28° C EM MEIO MC E BDA

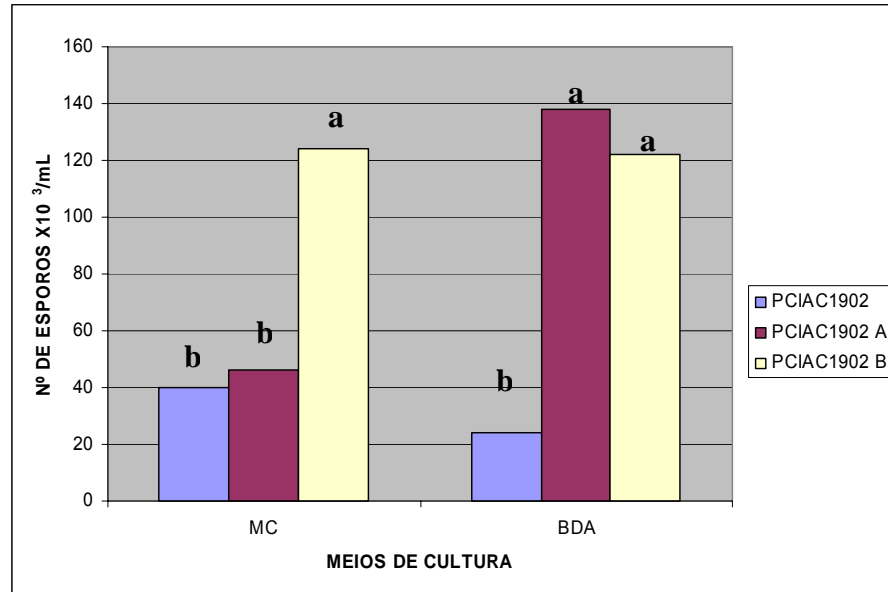
Nota: As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



**FONTE:** O autor

**GRÁFICO 10:** NÚMERO DE ESPOROS PRODUZIDOS PELAS LINHAGENS PC3C E PC3C CURADA APÓS 10 E 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28° C EM MEIO MC E BDA

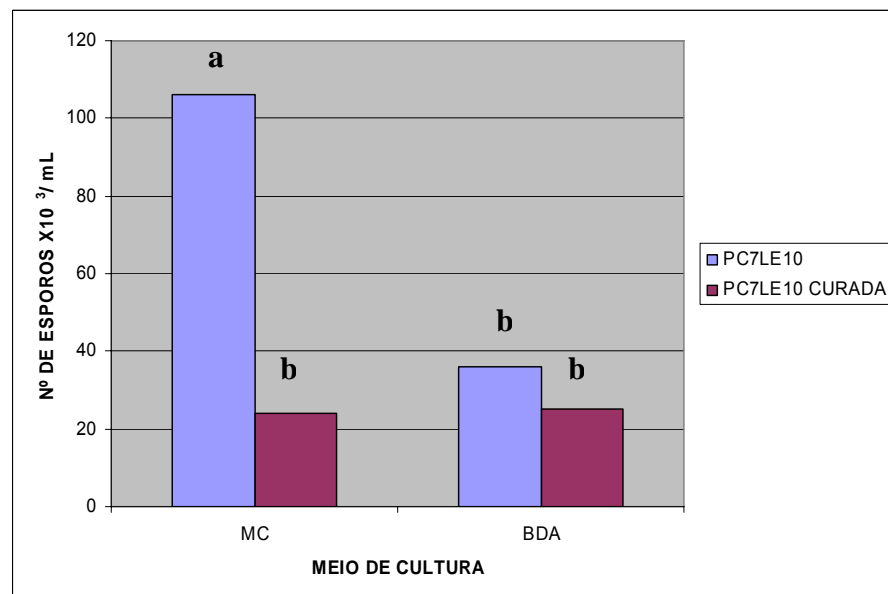
Nota: As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



**FONTE:** O autor

**GRÁFICO 11:** NÚMERO DE ESPOROS PRODUZIDOS PELA LINHAGEM PCIAC19/02 E SEUS SETORES CURADOS PCIAC19/02 A E PCIAC19/02 B APÓS 10 E 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28° C EM MEIO MC E BDA

Nota: As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



**FONTE:** O autor

**GRÁFICO 12:** NÚMERO DE ESPOROS PRODUZIDOS PELAS LINHAGENS PC7LE10 E PC7LE10 CURADA APÓS 10 E 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28° C EM MEIO MC E BDA

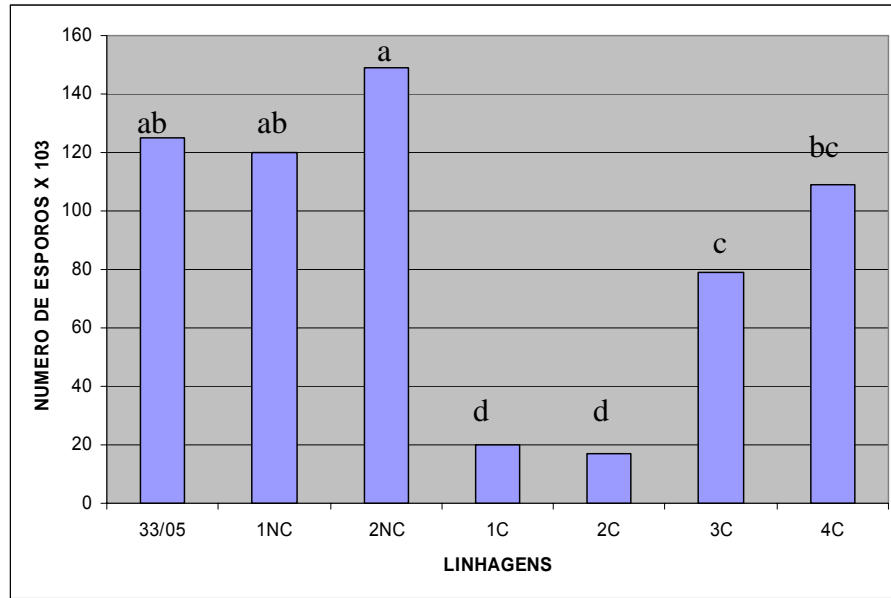
Nota: As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Em MC não houve diferença significativa entre as linhagens isogênicas PC3C e PC3C curada (Gráfico 10). Já em BDA a linhagem com RNAdf esporulou menos (Gráfico 10 e Anexo 11). Tal variação no efeito produzido pela cura do RNAdf também pode ser observado entre os setores curados em uma mesma linhagem. A linhagem PCIAC19/02 com RNAdf, esporulou menos que as linhagens isogênicas curadas PCIAC19/02 A e PCIAC19/02 B (Gráfico 11 e Anexo 12) no meio de cultura BDA. Entretanto, em meio de cultura MC apenas houve aumento da produção de esporos na linhagem curada PCIAC19/02 B, enquanto a linhagem curada PCIAC19/02 A produziu a mesma quantidade que a PCIAC19/02 contendo o RNAdf.

Entretanto, em meio MC, a linhagem PC7LE10 curada esporulou menos do que a isogênica contendo o RNAdf, no entanto quando analisadas no meio BDA a esporulação não diferiu estatisticamente embora tenha sido menor (Gráfico 12 e Anexo 9).

Resultados interessantes foram observados para a linhagem PC33/05 quando cultivadas em meio MC, onde pode-se verificar que os setores curados PC33/05 1C, PC33/05 2C e PC33/05 3C produziram menos esporos estatisticamente do que a linhagem contendo o RNAdf (Gráfico 13 e Anexo 14) Por outro lado, nos setores não curados PC33/05 1NC e PC33/05 2NC a produção de esporos não diferiu estatisticamente da linhagem PC33/05 original com RNAdf. A presença de RNAdf nesse caso parece atuar como fator de hipervirulência, já que os setores curados produziram menos esporos e os setores que passaram pelo estresse da temperatura elevada mas ainda apresentavam a partícula viral, apresentaram taxa de esporulação muito semelhante a linhagem com RNAdf.

Como o observado para o crescimento radial, a produção de esporos do setor curado PC33/05 4C não diferiu estatisticamente da produção da linhagem com RNAdf.



**FONTE:** O autor

**GRÁFICO 13:** NÚMERO DE ESPOROS PRODUZIDOS PELA LINHAGEM PC33/05, SEUS SETORES NÃO CURADOS PC33/05 1NC, PC33/05 2NC, E PELOS SETORES CURADOS PC33/05 1C, PC33/05 2C, PC33/05 3C E PC33/05 4C APÓS 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28° C EM MEIO MC

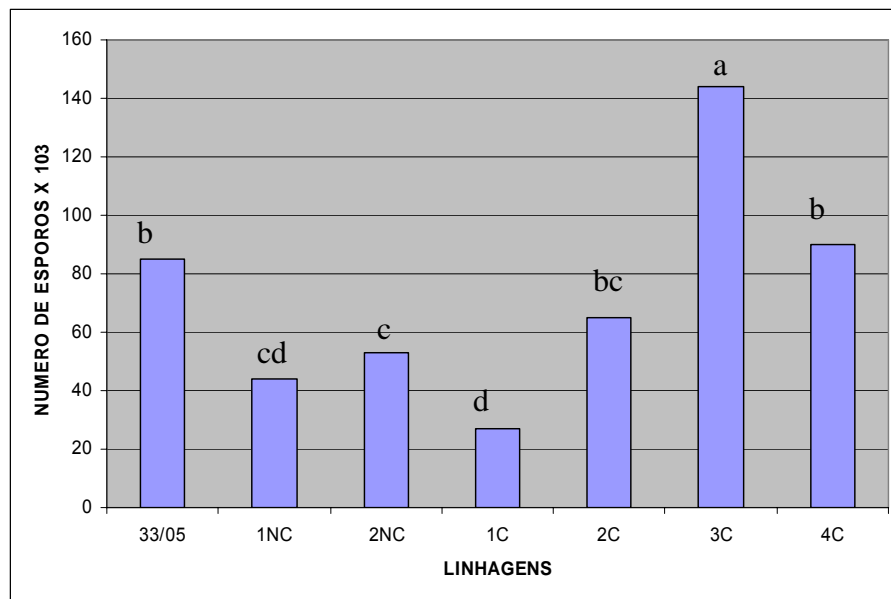
Nota: As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As letras minúsculas se referem ao meio MC, as letras maiúsculas se referem ao meio BDA.

No meio BDA, o setor curado PC33/05 1C também produziu menos esporos do que a linhagem PC33/05 controle contendo RNAdf (Gráfico 14 e Anexo 14). Entretanto, o setor PC33/05 2C não apresentou estatisticamente menor produção de esporos do que a linhagem isogênica PC33/05. Observou-se também que os setores não curados PC33/05 1NC e PC33/05 2NC produziram significativamente menos esporos que a linhagem controle contendo RNAdf. No caso do setor curado PC33/05 4C a taxa de esporulação observada não diferiu estatisticamente daquela apresentada pela linhagem PC33/05 controle e o setor PC33/05 3C produziu mais esporos que a PC33/05 com RNAdf.

Comparando linhagens de *Chalara elegans* que continham RNAdf, quanto ao crescimento, patogenicidade e sobrevivência no solo, Punja (1994) verificou que a presença de RNAdf no fungo estava associada com um aumento na esporulação, alteração da morfologia da colônia e redução no crescimento e na patogenicidade. Castro *et al.* (1999) observaram neste mesmo fungo que células infectadas com vírus

apresentaram um importante grau de degeneração celular em seu citoplasma, inclusive com o desaparecimento de organelas.

Desta forma, não foi possível atribuir qualquer efeito da cura do RNAdf na produção de esporos especialmente no meio de cultura BDA. Talvez isto se deva ao fato de ser esta uma característica difícil de ser mensurada no fungo *G. citricarpa*, que produz esporos dentro de estruturas chamadas picnídios. Sendo assim, novos experimentos foram realizados visando à avaliação da formação de picnídios em folhas de citros.



**FONTE:** O autor

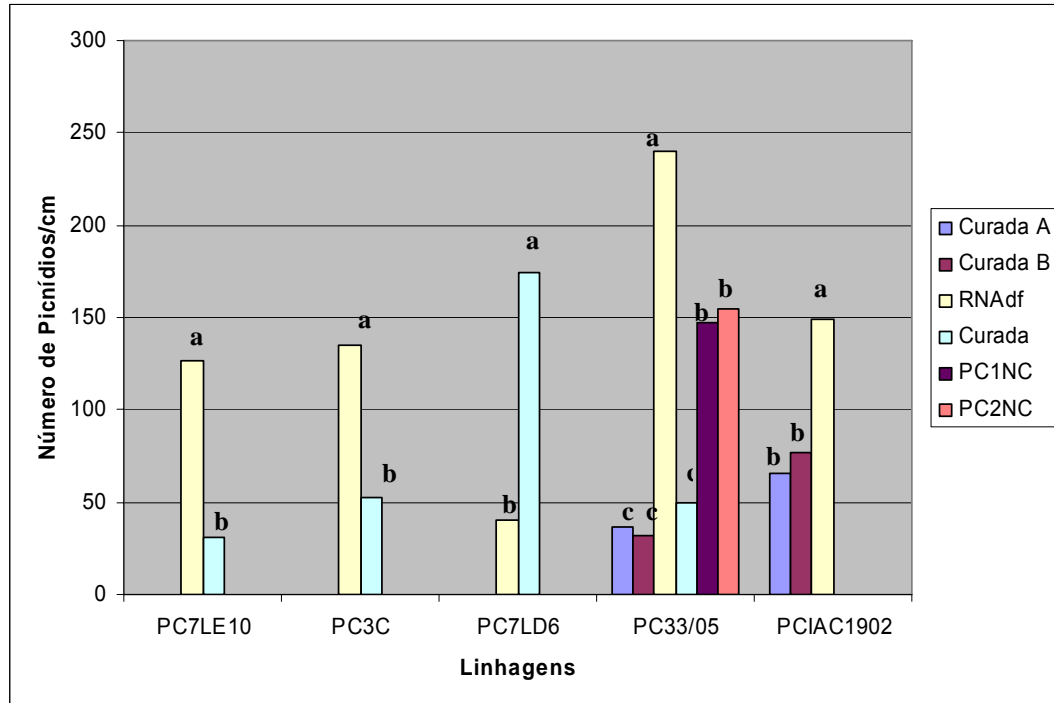
**GRÁFICO 14:** NÚMERO DE ESPOROS PRODUZIDOS PELA LINHAGEM PC33/05, SEUS SETORES NÃO CURADOS PC33/05 1NC, PC33/05 2NC, E PELOS SETORES CURADOS PC33/05 1C, PC33/05 2C, PC33/05 3C E PC33/05 4C APÓS 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28° C EM MEIO BDA

Nota: As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As letras minúsculas se referem ao meio MC, as letras maiúsculas se referem ao meio BDA.

#### 5.1.4.4. Produção de Picnídios em Folhas Cítricas

As lesões da Mancha Preta dos Citros são caracterizadas pela formação de picnídios na superfície das folhas e dos frutos cítricos. Desta forma, esta característica foi utilizada na comparação das linhagens isogênicas (com e sem RNAdf). No Gráfico 15 estão apresentadas as médias de 8 repetições.

Observa-se que para as linhagens PC7LE10, PC3C e PC1AC19/02, as comparações realizadas com as suas linhagens isogênicas, revelaram que todas as linhagens curadas produziram significativamente menos picnídios do que aquelas contendo RNAdf (Gráfico 15 e Anexos 15, 16 e 18).



**FONTE:** O autor

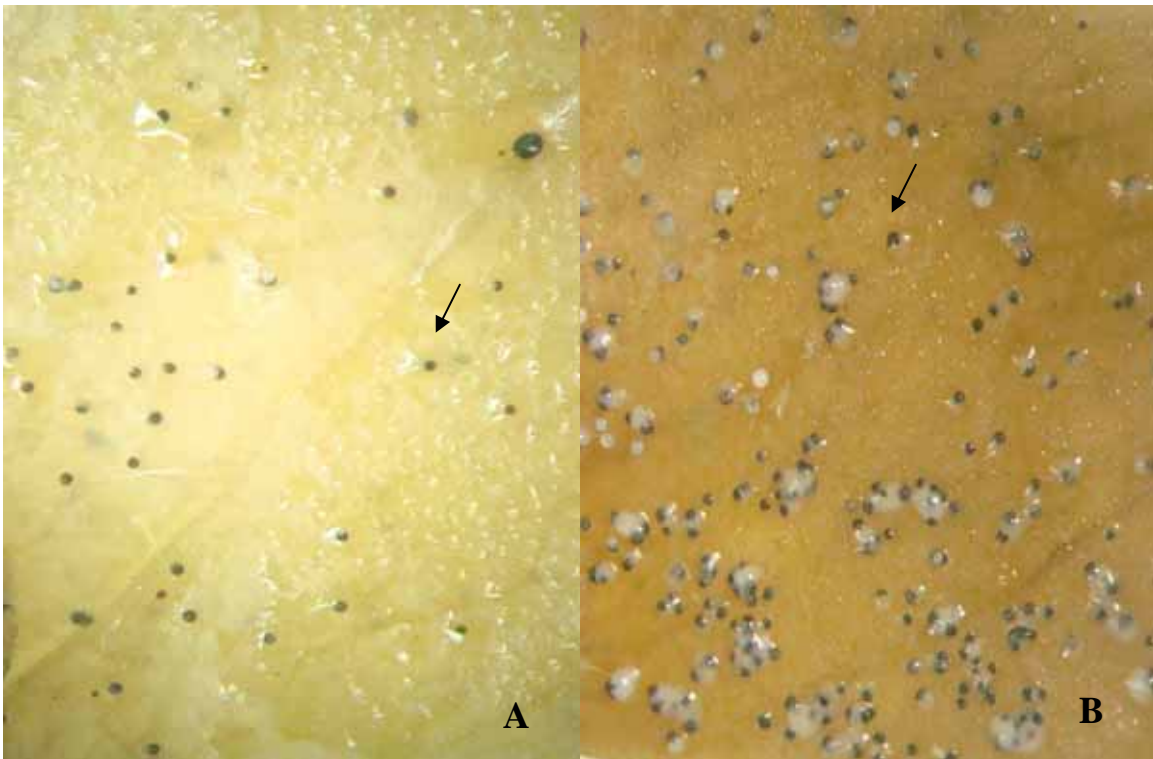
**GRÁFICO 15:** PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS PELAS LINHAGENS DE *G. citricarpa* NA SUPERFÍCIE DE FOLHAS DE CITROS AUTOCLAVADAS E INCUBADAS EM ÁGAR-ÁGUA POR 21 DIAS A 28° C

Nota: As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

No Gráfico 15 estão representados os dados de produção de picnídios das linhagens isogênicas PC33/05 (com RNAdf), PC33/05 1NC e PC33/05 2NC (2 setores que passaram pelo estresse da temperatura elevada mas não perderam o RNAdf) e as linhagens PC33/05 1C, PC33/05 2C e PC33/05 3C (curadas). O teste de médias Tukey revelou que a linhagem original com RNAdf apresentou significativamente mais picnídios do que as demais (com e sem RNAdf). Entretanto, as linhagens curadas (PC33/05 1C, PC33/05 2C e PC33/05 3C) apresentaram menor produção de picnídios do que aos setores com RNAdf (PC33/05 1NC e PC33/05 2NC) (Gráfico 15 e Anexo 15). Estes resultados sugerem que o estresse sofrido pelo tratamento com temperatura moderadamente alta pode influenciar na produção de picnídios, seja permanente



(mutações) ou temporária (fisiológica). Entretanto, a diferença encontrada na produção de picnídios entre os setores curados com os setores que ainda possuem o RNAdf, reforça os achados para as linhagens PC7LE10, PC3C e PCIAC19/02, ou seja, a perda do RNAdf pode causar redução na produção dos picnídios do fungo *G. citricarpa* em folhas cítricas. A Figura 14 apresenta a fotomicrografia de um segmento foliar após 21 dias da inoculação com as linhagens isogênicas PC33/05 1C (curada) e PC33/05 portadora do RNAdf, revelando significativa diferença na produção de picnídios.



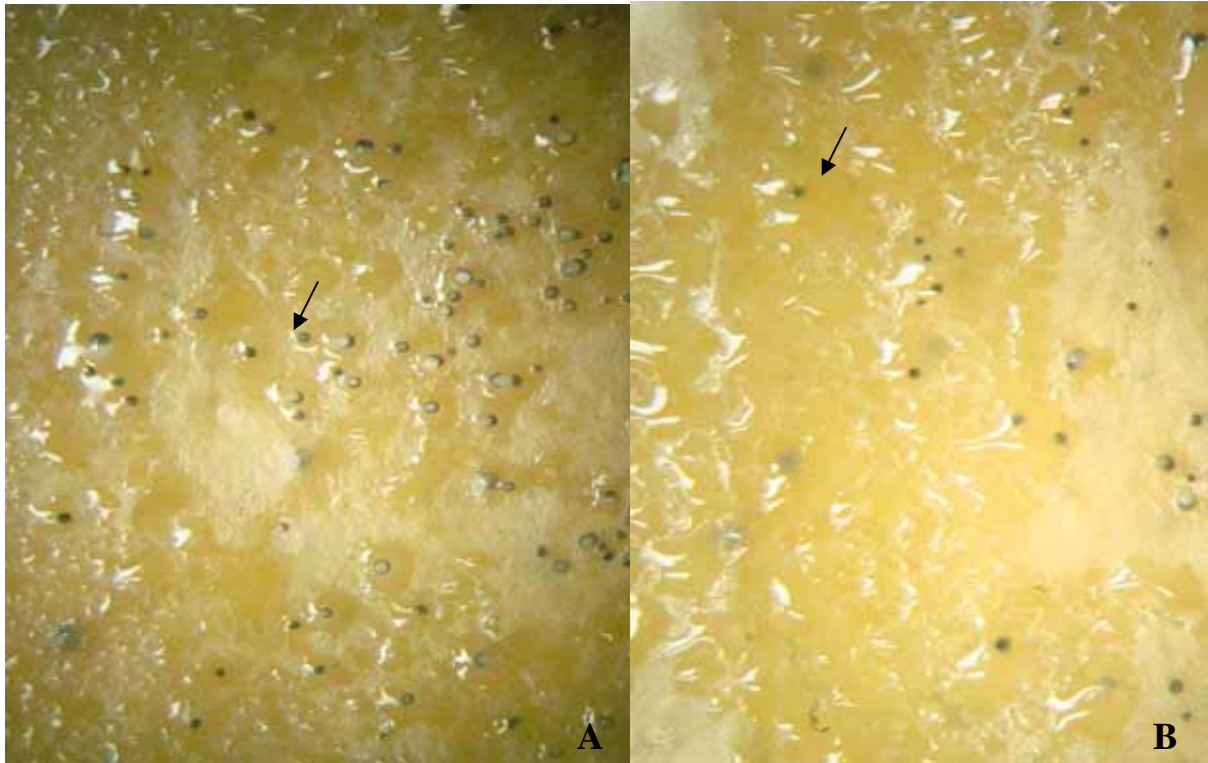
**FONTE:** O autor

**FIGURA 14:** FOTOMICROGRAFIA DA SUPERFÍCIE FOLIAR APRESENTANDO PICNÍDIOS APÓS 21 DIAS DE INOCULAÇÃO DAS LINHAGENS ISOGÊNICAS PC33/05 1C CURADA (A) E PELA LINHAGEM PC33/05 CONTENDO RNAdf (B)

**NOTA:** Setas exemplificam os picnídios. Aumento de 10 X.

Entretanto, para a linhagem PC7LD6 os resultados encontrados foram o contrário dos demais, ou seja, a linhagem PC7LD6 curada produziu mais picnídios do que a linhagem portadora do RNAdf (Figura 15). Várias hipóteses podem ser levantadas para explicar tais resultados. Uma explicação plausível seria que a partícula viral presente nesta linhagem pode ser diferente daquela encontrada nas demais linhagens, e que este vírus, por ser um regulador negativo da patogenicidade pode ser promissor em estratégias de controle biológico deste fungo fitopatogênico. Para

comprovar tal hipótese, seqüenciamento dos RNAdf devem ser realizados em trabalhos futuros. Sugere-se também a realização de eletroforese em gel de poliacrilamida, onde a discriminação de pequenas diferenças de tamanho em moléculas de DNA é mais fácil de ser detectada.



**FONTE:** O autor

**FIGURA 15:** FOTOMICROGRAFIA DA SUPERFÍCIE FOLIAR APRESENTANDO PICNÍDIOS APÓS 21 DIAS DE INOCULAÇÃO DAS LINHAGENS ISOGÊNICAS PC7LD6 CURADA (A) E PELA LINHAGEM PC7LD6 CONTENDO RNAdf (B)

**NOTA:** Setas exemplificam os picnídios. Aumento de 10 X.

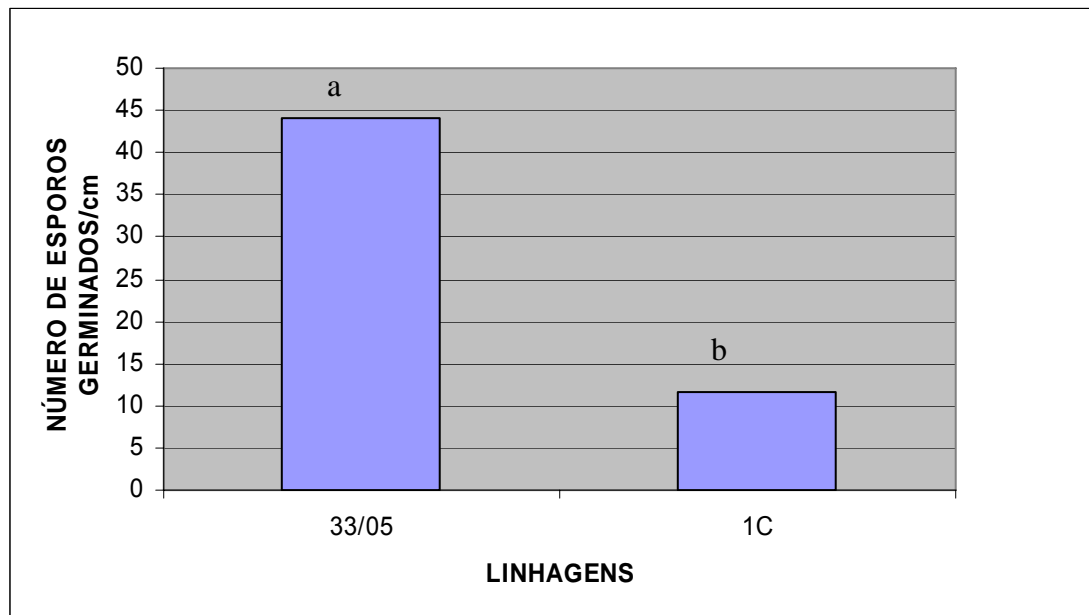
#### 5.1.4.5. Melanização de Apressório e Germinação de Esporos

Esta avaliação foi realizada com as linhagens isogênicas PC33/05 (com RNAdf) e PC33/05 1C (curada). Comparando o número de esporos germinados nestas linhagens, foi possível constatar que houve diferença significativa entre as linhagens isogênicas, sendo que na linhagem PC33/05 (com RNAdf) maior número de esporos germinados foram encontrados após 72 horas de incubação a 28°C (Gráfico 16, Figuras 15 e 16) do que na linhagem curada. Os esporos, além de estarem presentes em maior número sempre apresentavam tubo germinativo mais longo. A quantidade de

apressórios produzidos em lâminas da linhagem PC33/05 também foi maior que na linhagem PC33/05 1C (curada). Entretanto os apressórios de ambas preparações apresentaram-se sempre melanizados e septados.

Esta é uma importante observação, pois sabe-se que o sucesso da penetração na planta hospedeira pela maioria dos fungos, depende da formação de apressórios (KUBO *et al.*, 1996). A redução significativa na germinação de esporos observada após a cura do RNA*df* pode interferir na patogenicidade do fungo para a planta. Tal experimento deverá ser realizado também com as demais linhagens a fim de confirmar tais achados.

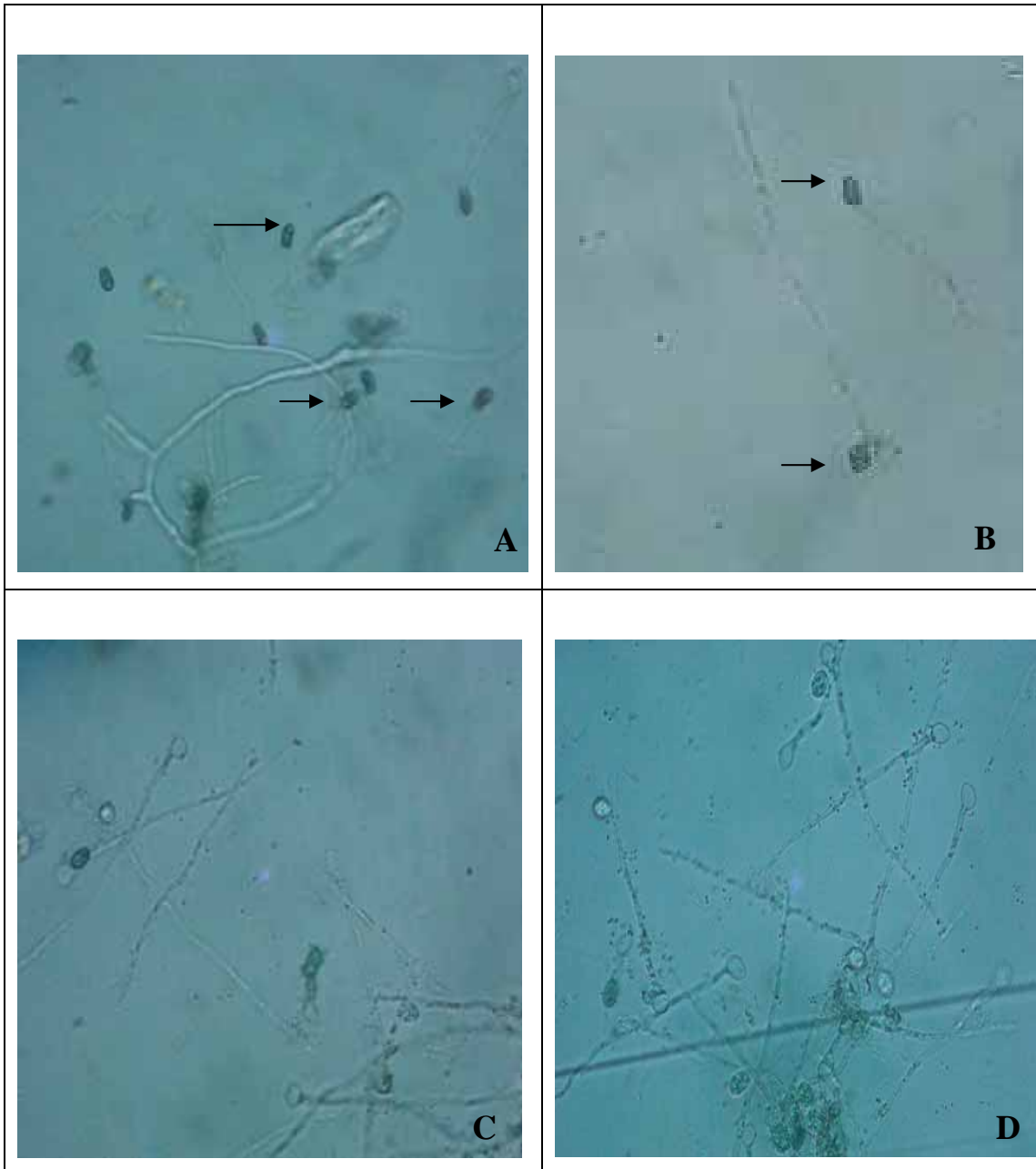
Outra característica bastante importante observada nesta análise foi a pigmentação dos apressórios, pois sabe-se que este pigmento media a formação de uma pressão hidrostática essencial para a penetração do apressório na planta (HOWARD; FERRARI, 1989; BOURETT; HOWARD, 1990).



**FONTE:** O autor

**GRÁFICO 16:** NÚMERO MÉDIO DE ESPOROS GERMINADOS POR cm EM MEMBRANA DE CELOFANE APÓS 72 HORAS DE INCUBAÇÃO A 28° C

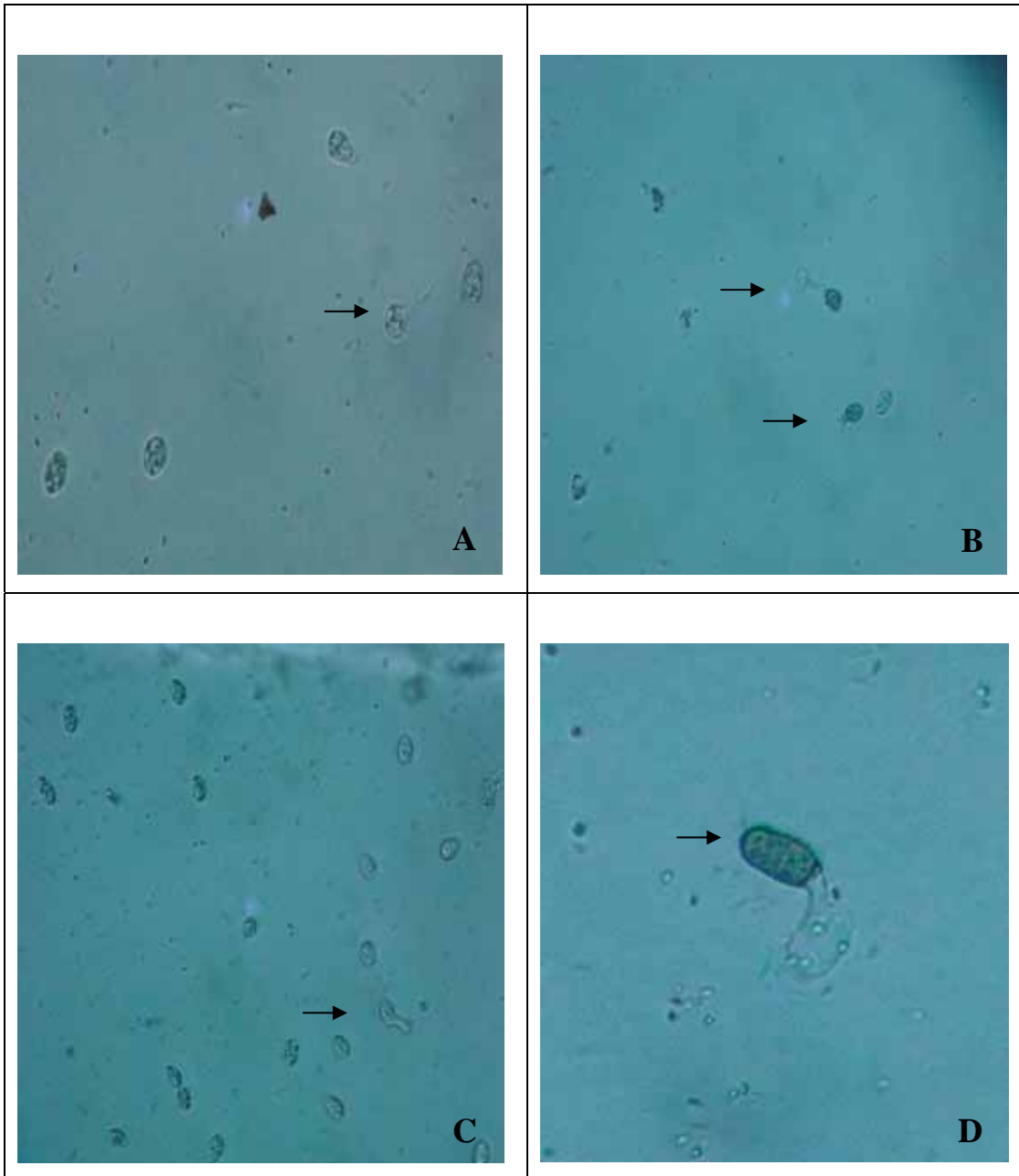
Nota: As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



**FONTE:** O autor

**FIGURA 16:** FOTOMICROGRAFIA DE ESPOROS E APRESSÓRIOS DA LINHAGEM PC33/05 APÓS 72 HORAS DE INCUBAÇÃO A 28° C

**Nota:** Aumento:400X A) as setas indicam apressórios melanizados e septados. B) as setas indicam apressórios com longos tubos germinativos. C e D) esporos germinados.



**FONTE:** O autor

**FIGURA 17:** FOTOMICROGRAFIA DE ESPOROS E APRESSÓRIOS DA LINHAGEM PC33/05 1C CURADA APÓS 72 HORAS DE INCUBAÇÃO A 28° C

**Nota:** A) a seta indica esporo no início da germinação. Aumento: 400X B) as setas indicam apressórios melanizados e curtos tubos germinativos. Aumento: 400X C) a seta indica o único esporo germinado. Aumento: 400X D) apressório (seta) e tubo germinativo. Aumento: 1000X

Analisando os resultados de forma geral foi possível perceber que a interferência causada pelo RNAdf variou muito entre as linhagens analisadas (Tabela 6). Entretanto, os dados mais pertinentes são aqueles obtidos com a linhagem PC33/05, pois esta é a única, entre as analisadas neste trabalho, que possui teste de patogenicidade. Além disso, esta linhagem formou setores que foram curados e setores em que a cura não ocorreu, permitindo assim uma comparação mais confiável, sendo os setores não curados utilizados como controles adicionais, uma vez que a temperatura moderadamente elevada e repiques de ponta de hifa poderiam por si só alterar características desta linhagem.

Os setores PC33/05 1C e PC33/05 2C apresentaram um menor crescimento radial e uma menor taxa de produção de esporos quando comparados com a linhagem original (PC33/05) contendo RNAdf, entretanto, no perfil de RAPD e seqüenciamento, verifica-se que estas linhagens são idênticas aos outros setores curados e à linhagem PC33/05 contendo RNAdf. Assim, sugere-se que as moléculas de RNAdf (provavelmente partículas virais) presentes na linhagem PC33/05 possam estar contribuindo para o aumento da produção de esporos e crescimento do fungo, e desta forma poderiam estar atuando na hipervirulência desta linhagem. A fim de corroborar tais hipóteses, testes de patogenicidade deverão ser realizados com as linhagens portadoras deste RNAdf e com os setores curados.

No caso dos setores curados PC33/05 3C e PC33/05 4C, as análises de crescimento radial e taxa de produção de esporos mostraram que estas linhagens se comportaram de maneira bastante semelhante à linhagem PC33/05 com RNAdf. Nestas linhagens, em função da freqüente formação de setores (o que reflete instabilidade mitótica), pode ter ocorrido também nestas linhagens eventos de transposição que poderiam interferir nos resultados obtidos.

TABELA 6: AVALIAÇÃO GERAL DAS LINHAGENS SUBMETIDAS À CURA EM COMPARAÇÃO AOS ISOLADOS DE *G. citricarpa*

Experimentos/ Linhagens	CRESCIMEN TO RADIAL 10 DIAS MC	CRESCIMEN TO RADIAL 20 DIAS MC	CRESCIMEN TO RADIAL 10 DIAS BDA	CRESCIMEN TO RADIAL 20 DIAS BDA	PRODUÇÃO DE ESPOROS MC	PRODUÇÃO DE ESPOROS BDA	PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS	ESPOROS GERMINADOS
PC3C CURADA	=	=	-	-	+	+	-	*
PC7LD6 CURADA	=	=	-	-	+	+	+	*
PC7LE10 CURADA	=	=	=	-	-	=	-	*
PCIAC1902 A	=	=	=	=	=	+	=	*
PCIAC1902 B	+	+	+	=	+	+	+	*
PC33/05 1NC	+	=	=	=	=	-	-	*
PC33/05 2NC	-	=	-	=	=	-	-	*
PC33/05 1C	-	-	-	-	-	-	-	-
PC33/05 2C	-	-	=	=	=	=	-	*
PC33/05 3C	=	=	=	=	-	+	-	*
PC33/05 4C	+	+	=	=	=	=	-	*

Nota: Resultados obtidos quando comparados a respectiva linhagem original com RNA<sub>df</sub>. +, significa que a linhagem curada obteve um aumento na característica. -, significa que a linhagem curada obteve uma redução na característica. =, não houve diferença significativa e \*, quando não foi analisado.

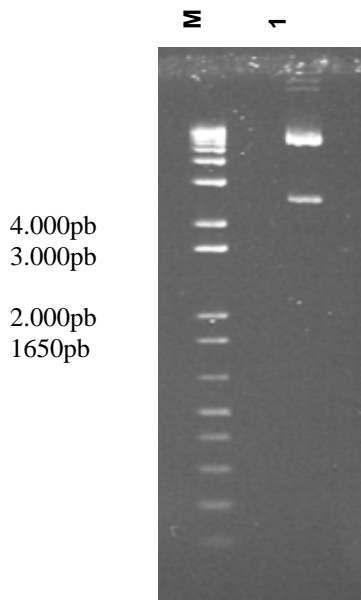
No experimento da produção de picnídios em folhas de citros, segundo Tiago (2001) a sugestão seria repetir o experimento utilizando linhagens com número de repiques diversos e tempo de crescimento diferente, caso ocorra realmente diferença na titulação viral, essa poderia ser identificada. Tiago (2001) analisou a correlação entre a presença de RNA dupla fita e produção de proteases degradadoras de cutícula, secreção de proteína total e produção de conídios em linhagens isogênicas de *Metarhizium anisopliae* variedade *acridum* (= *Metarhizium flavoviride*) e *Paecilomyces fumosoroseus*. Neste trabalho, não foi encontrada correlação entre os parâmetros analisados com a presença ou ausência de RNA dupla fita, sugerindo que a infecção deve ser latente nesses fungos. Em etapas futuras, todas as linhagens devem ser comparadas quanto à taxa de germinação de esporos.

## 5.2. ESTIMATIVA DO NÚMERO DE CROMOSSOMOS

### 5.2.1. Obtenção do Plasmídio pTEL

Após a produção de células competentes de *E. coli*, foi feita a transformação do plasmídio pTEL (LEVIS *et al*, 1997) (Anexo 19). Esse plasmídio possui o gene de resistência à ampicilina e, dessa forma, puderam ser isoladas colônias da bactéria transformada. Posteriormente, o plasmídio foi purificado e quantificado em gel de agarose 1% (Figura 18).





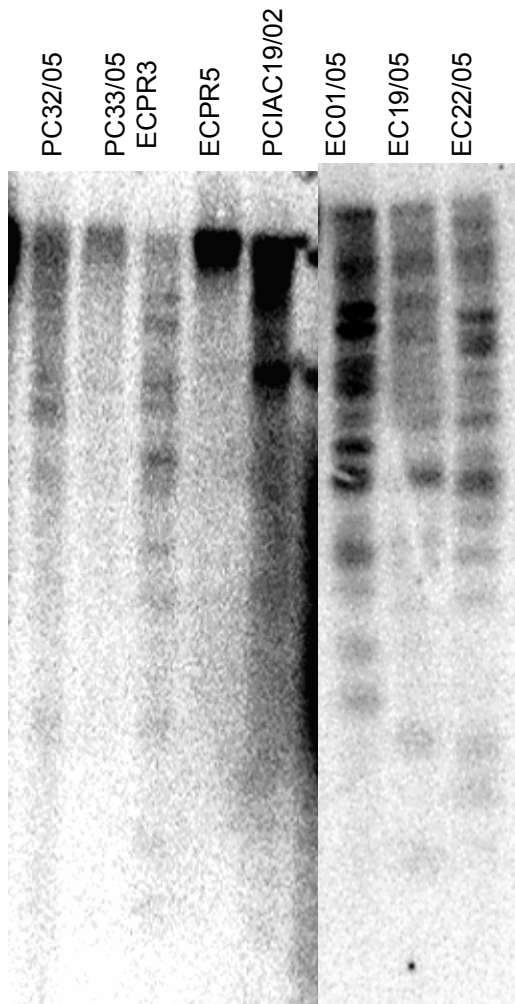
**FONTE:** O autor

**FIGURA 18:** ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DO PLASMÍDIO pTEL  
 Notas M: marcador de peso molecular DNA *Ladder* 1000pb, 1: plasmídeo pTEL.

### 5.2.2. *Southern Blotting* e Hibridização

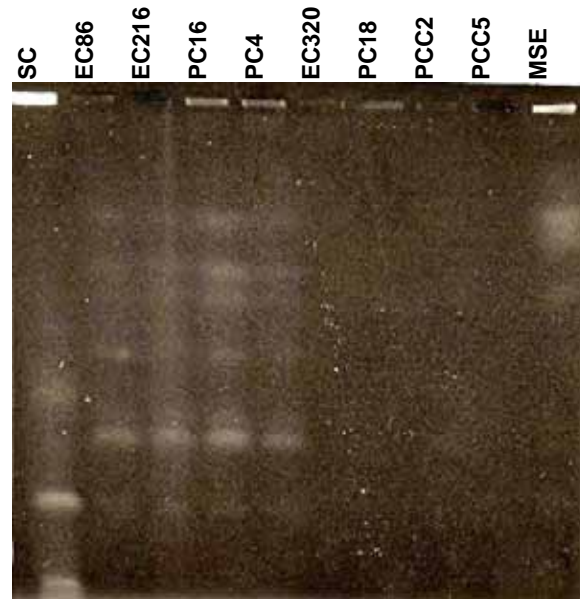
O plasmídeo pTEL foi utilizado como sonda marcada radioativamente, para hibridizar com a membrana contendo DNA genômico clivado com as enzimas *PvuII* e *BamHI* de linhagens de *G. citricarpa* (PC28/05, PC32/05, PC33/05 e PCIAC19/02), *G. mangiferae* (EC01/05, EC19/05, EC22/05) e *Phyllosticta spinarum* (ECPR3, ECPR5) para verificar o número de cromossomos de cada espécie. Foi utilizada a linhagem MSE de *Aspergillus niger* como controle. Blanco (1999), utilizando a técnica de eletroforese em campo pulsado (Figuras 20 e 21) observou 8 bandas que representam pelo menos 8 cromossomos no fungo *G. mangiferae*. A autora calculou o peso molecular de cada cromossomo do isolado EC86 de *G. mangiferae*, sendo o maior de 3,7 Mb e o menor de 1,1 Mb. Se for considerado apenas 1 cromossomo por banda, o tamanho total do genoma destes isolados de *G. mangiferae*, é de 21,5 Mb. O número de cromossomos e o tamanho do genoma encontrados nestes isolados podem ser subestimados em função da não separação de todos os cromossomos potencialmente existentes. Entretanto, não há informações na literatura sobre o número de cromossomos das espécies *G. citricarpa* e *P. spinarum*.

A hibridização da membrana com a sonda telomérica permitiu observar 16 bandas nas linhagens de *G. mangiferae*, correspondendo a pelo menos 8 cromossomos (Figura 19) como observado por Blanco (1999). Em *G. citricarpa* foi possível observar 14 bandas o que representa pelo menos 7 cromossomos e, no caso de *P. spinarum*, pelo menos 6 cromossomos uma vez que foi observado 12 bandas para estas linhagens (Figura 19). Porém a qualidade da hibridização não foi boa e novas análises deverão ser feitas para a confirmação destes dados, inclusive utilizando novas enzimas de restrição.



**FONTE:** O autor

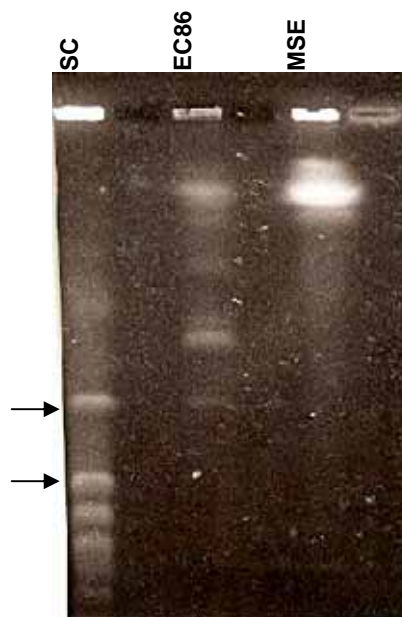
**FIGURA 19:** HIBRIDIZAÇÃO COM SONDA TELOMÉRICA pTEL. AMOSTRAS DE *G. citricarpa* (PC32/05, PC33/05, PCIAC19/02), *G. mangiferae* (EC01/05, EC19/05, EC22/05) E *Phyllosticta spinarum* (ECPR3, ECPR5), DNA CLIVADO COM ENZIMA *Bam*HI



**FONTE:** BLANCO, 1999.

**FIGURA 20:** ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO DOS ISOLADOS EC86, EC216, PC16 E PC4 DE *G. mangiferae*

Nota: SC: *Saccharomyces cerevisiae*; MSE: *Aspergillus nidulans*.



**FONTE:** BLANCO, 1999.

**FIGURA 21:** ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO DO ISOLADO EC86 DE *G. mangiferae*. SETAS INDICAM BANDAS DE MAIOR INTENSIDADE

Nota: SC: *Saccharomyces cerevisiae*; MSE: *Aspergillus nidulans*.

Como o DNA genômico das linhagens analisadas foi clivado com enzima de restrição, o número de cromossomos será sempre a metade do número de bandas vistas na membrana, isso porque utilizando sonda telomérica os dois telômeros existentes em cada cromossomo acabam se separando. No caso de eletroforese em

campo pulsado, o número de bandas observadas na membrana corresponde exatamente ao número de cromossomos, pois não ocorre clivagem do DNA anteriormente.

Levis *et al.*, (1997), também tiveram sucesso na tentativa de detectar o número de cromossomos no fungo fitopatogênico *Botrytis cinerea*, utilizando a seqüência telomérica pTEL como sonda, os autores concluíram que as bandas encontradas se referem a um número mínimo de 7 a 8 cromossomos entre as linhagens analisadas. Em 2002, utilizando a mesma seqüência como sonda, Viaud *et al.* determinaram que para 9 isolados do entomopatógeno *Beauveria bassiana*, o número de cromossomos variou entre 7 e 8, entretanto devido a intensidade de algumas bandas, os autores sugeriram que pode haver 2 cromossomos formando uma única banda.

## 6. CONCLUSÕES

- O protocolo de cura de RNAdf por repique de ponta de hifa em crescimento com temperatura moderadamente elevada é eficiente para a cura do RNAdf do fungo *G. citricarpa*.
- A isogenia das linhagens curadas e infectadas com RNAdf foi comprovada por meio de marcadores moleculares do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), e por sequenciamento da região ITS1-5,8S- ITS2 do DNA ribossomal.
- O RNAdf presente nas linhagens de *G. citricarpa* analisadas influencia características relevantes na patogenicidade do fungo como crescimento radial, esporulação e produção de picnídios.
- A utilização de sonda telomérica pTEL é eficiente na determinação do número de cromossomos nas espécies *G. citricarpa*, *G. mangiferae* e *Phyllosticta spinarum*.
- Foi possível confirmar que as linhagens de *G. mangiferae* possuem pelo menos 8 cromossomos.
- As linhagens de *G. citricarpa* utilizadas neste trabalho possuem pelo menos 7 cromossomos.
- As linhagens de *P. spinarum* utilizadas neste trabalho possuem pelo menos 6 cromossomos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASI, P. A.; MILLER, S. A.; MEULIAT, T.; HOITINK, H. A. J.; KIM, J. M. Precise detection and tracing of *Trichoderma hamatum* 382 in compost-amended potting mixes by using molecular markers. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n.12, p.5421-5426, 1999.
- AHN, I.P.; LEE, Y.H. A viral double-stranded RNA up regulates the fungal virulence of *Nectria radicola*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 14, p. 496-507, april, 2001.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed , 2004.
- ALMEIDA, C. V.; YARA, R.; ALMEIDA, M. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 5, p. 467- 470, 2005.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.25, p.3389-3402, 1997.
- ALZATE-MARIN, A. L.; BAÍA, G. S. FALEIRO, F. G. CARVALHO, G. A.; PAULA JR., T. J.; MOREIRA, M. A. BARROS, E. G. Análise da diversidade genética de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões do Brasil por marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, p.85-88, 1997.
- ANCHORENA-MATIENZO, P. **Re-identificação e caracterização genética de levedura IZ-987 utilizando marcadores moleculares**. 65f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior da Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2000.
- ARAÚJO, W. L. **Isolamento, Identificação e Caracterização Genética de Bactérias Endofíticas de Porta-Enxertos de Citros**. 111f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior da Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2000.
- ARAÚJO, J. M.; SILVA, A. C.; AZEVEDO, J. L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.) **Brazilian Archive of Biology and Technology**, Curitiba, v. 43, p. 447- 457, 2000.
- ARNOLD, E. A.; MEJÍA, C. L.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceeding of the National Academy of Science**, Washington, v. 100, p. 15649-15654, 2003.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos Endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna : EMBRAPA, 1998. p. 117-137.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI Jr., PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Microbiology**, Washington, v. 3, p. 40-65, 2000.

AZEVEDO, J.L.; COSTA, S.O.P. **Exercícios práticos de genética**. São Paulo : EDUSP, 1973. 288p.

BAAYEN, R. P.; BONANTS, P. J. M.; VERKLEY, G.; CARROL, G. C.; VAN DER AA, M.; WEERDT, M.; BROUWERSHAVEN, G. C.; SCHUTTE, G. C.; MACCHERONI JR., W.; GLIENKE-BLANCO, C; AZEVEDO, J. L. Nonpathogenic Strains of the Citrus Black Spot Fungus, *Guignardia citricarpa*, Identified as a Cosmopolitan Endophyte of Woody Plants, *Guignardia mangiferae*, (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, Lancaster, v.92, p. 464-477, 2002.

BAKER, R.E.D. Studies in the pathogenicity of tropical fungi. II. The occurrence of latent infections indeveloping fruits. **Annals of Botany**, London, v.2, p. 919-931, 1938.

BALDASSARI, R. B. **Patogenicidade, morfologia de colônias e diversidade de isolados de *Guignardia citricarpa* e *G. mangiferae* obtidos de *Citrus* spp.** 66p. Tese ( Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) . Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, 2005.

BAO, J. R.; LAZAROVITS, G. Differential colonization of tomato roots by nonpathogenic and pathogenic *Fusarium oxysporum* strains may influence *Fusarium* wilt control. **Phytopathology**, Lancaster, v.91, p.449-456, 2001.

BELL, A. A.; WHEELER, M.H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.24, p. 411-451, 1986.

BENTLEY, S.; PEGG, K. G.; DALE, L. Optimization of RAPD-PCR fingerprinting to analyse genetic variation within populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*. **Journal Phytopathology**, Berlin, v. 142, p. 64-78, 1994.

BLANCO, C.G. ***Guignardia citricarpa* Kiely: Análise Genética, Cariotípica e Interação com o Hospedeiro**. 196p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Piracicaba, 1999.

BOLAND, G.J. Hypovirulence and double-stranded RNA in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v.14, p. 10-17, 1992.

BONANTS, P.J.M.; CARROLL, G.C.; WEERDT, M.; Van BROUWERSHAVEN, I.R.; BAAYEN, R.P. Development and validation of a fast PCR-based detection method for pathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.109, p. 503513, 2003.

BOTTACIN, A. M., Levesque, C. A. ; Punja, Z. K. (1994) Characterization of dsRNA in *Chalara elegans* and effects on growth and virulence. **Phytopathology** 303-312. In Robinson, Deacon 2001.

BOURETT, T.M.; HOWARD, R.J. *In vitro* development of penetration structures in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 68, p. 329-342, 1990.

BUCK, K.W. Fungal virology – An overview. In: BUCK, K.W. ed. **Fungal virology**. Boca Raton : CRC, 1986. p. 1-84.

CALHOUN, L.A.; FINDLAY, J.A.; MILLER, J.D.; WHITNEY, N.J. Metabolites toxic to spruce budworm from balsam fir needle endophytes. **Mycological Research**, Cambridge, v.96, n.4, p.281-286, 1992.

CANO, M.I.N., CISALPINO, P.S., GALINDO, I., RAMÍREZ, R.A.M., SILVEIRA, J.F. Electrophoretic Karyotypes and Genome Sizing of the Pathogenic Fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Microbiology**, Washington, p. 742-747, 1998.

CARDOSO-FILHO, J. L.; **Efeito de extratos de albedo de laranja (*Citrus sinensis*) dos indutores de resistência ácido salicílico, acil-benzolar – S- metil e *Saccharomyces cerevisiae* no controle de *Phyllosticta citricarpa* (Teleomorfo: *Guignardia citricarpa*)** 125f. Tese (Doutorado) – Escola Superior da Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2003.

CARROLL, G.C. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualística symbiont. **Ecology**, Brooklym, v.69, p.2-9, 1988.

CARROLL, G.C.; CARROLL, F. Studies on the incidence of coniferous endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 5, p. 3034-3043, 1978.

CASTRO, M.; KRAMER, K.; VALDIVIA, L.; ORTIZ, S.; BENAVENTE, J.; CASTILLO, A. A new double-stranded RNA mycovirus from *Botrytis cinerea*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 175, p. 95-99, 1999.

CHRISTO, D. **Variabilidade genética e diferenciação molecular de isolados endofíticos e patogênicos de *Guignardia* spp e *Phyllosticta* sp.** 78p. Dissertação (Mestrado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2002.

CHU, Y.M.; JEON, J.J.; YEA, S.J.; KIM, Y.H.; YUN, S.H. LEE, Y.W.; KIM, K.H. Double-stranded RNA mycovirus from *Fusarium graminearum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 2529-2534, 2002.

CLARK, C.L.; MILLER, J.D.; WHITNEY, N.J. Toxicity of conifer needle endophytes to spruce budworm. **Mycological Research**, Cambridge, v. 93, p. 508-512, 1989.



CLAY, K. Effects of fungal endophytes on the seed and seedling biology of *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. **Oecologia (Berlin)**, v.73, p. 358-362, 1987.

CLAY, K. Fungi and the food of the goods. **Nature**, Washington, v. 427, p. 401-402, 2004.

CLEMENTE, S. L.; PIKE, K.S.; KAISER, W.J.; WILSON, A.D. Resistance of endophyte-infected plants of tall fescue and perennial ryegrass to the Russian wheat aphid (Homoptera: Aphidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, Manhattan, v.63, n.4, p.646-648, 1990.

CROUS, P.W.; WINGFIELD, M.J.; FERREIRA, F.A.; ALFENAS, A. *Mycosphaerella parkii* and *Phyllosticta eucalyptorum*, two new species from eucalyptus leaves in Brazil. **Mycological Research**, Cambridge, v.97, p. 582-584, 1993.

DALZOTO, P.R. **Parameiose e caracterização de RNAs dupla fita no deuteromiceto *Beauveria bassiana* (Vuill.)**. 164p. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2004.

DALZOTO, P.R.; GLIENKE-BLANCO, C.; KAVA-CORDEIRO, V.; RIBEIRO, J.Z.; KITAJIMA, E.W.; AZEVEDO, J.L., Horizontal transfer and hypovirulence associated with double-stranded RNA in *Beauveria bassiana*. **Mycological Research**, Cambridge, v.11, p.1475-1481, 2006.

DAY, P.R.; DODDS, J.A.; ELLISTON, J.E.; JAYNES, R.A.; ANAGNOSTAKIS, S.L. Double-stranded RNA in *Endothia parasitica*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 67, p. 1393-1396, 1997.

DEAN, R.A. Signal pathways and appressorium morphogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 211-234, 1997.

DÉLYE, C.; CORIO-COSTET, M. F. Rapid isolation of both double-stranded RNA and PCR-suitable DNA from the obligate biotrophic phytopathogenic fungus *Uncinula necator* using a commercially available reagent. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.74, p. 149-153, 1998.

DIAPENINGEN, A. D. V.; DEBETS, A. J. M.; HOEKSTRA, R. F. Dynamics of dsRNA mycoviruses in black Aspergillus populations. **Fungal Genetics and Biology**, United Kingdom, v. 43, p. 446-452, 2007.

DJAOUIDA, R.; SORBO, G. D.; REGGIO, C.; ZOINA, A.; FIRRAO, G. Polymorphisms in nuclear rDNA and mtDNA reveal the polyphyletic nature of isolates of *Phomopsis* pathogenic to sunflower and a tight monophyletic clade of defined geographic origin. **Mycologia**, Lawrence, v.108, n.4, p.393-402, 2004.

DREYFFUS, M. M.; CHAPPELLA, I. H. Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals. In: GULLO, V. P. (ed.), **The discovery of natural products with therapeutic potential**. London: Butterworth-Heinemann, 1994. p. 49-80.

ELLISTON, J.E. Hypovirulence. **Advances in Plant Pathology**, Toronto, v.1, p.1-33, 1982.

ESPOSITO, E; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul : Edusc, 2004. 510p.

FELSENTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **International Journal of Organic Evolution**, Lancaster, v.39, p.366-369, 1985.

FERNANDEZ, F. A.; HANLIN, R. T. Morphological and RAPD analyses of *Diaporthe phaseolorum* from soybean. **Mycologia**, Lawrence, v.88, n.3, p.425-440, 1996.

FERREIRA, M. E. Aplicação de Marcadores Moleculares no Mapeamento Genético de Plantas. In: CURSO DE MARCADORES MOLECULARES, 3. Brasília : EMBRAPA/CENARGEN, 1994.

FIALHO, M. B. **Efeito *in vitro* *Sacharomyces cerevicea* sobre *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros**. 60 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior da Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2004.

FIGUEIREDO, J.A.G. **Bioprospecção, caracterização morfológica e molecular de endófitos de *Maytenus ilicifolia*, com ênfase *Pestalotiopsis* spp.** Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

FRAZZON, A.P.G.; VAZ JUNIOR, I.S.; MASUDA, A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 94, p. 117-125, 2000.

FULBRIGHT, D.W. Effect of elimination dsRNA in hypovirulent *Endothia parasitica*. **Phytopathology**, St. Paul, v.74, p. 722-724, 1984.

FUNGARO, M. H. P. PCR na Micologia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n.14, p.12-16, 2000.

FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. Aplicações da PCR em ecologia molecular. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Ecologia microbiana**. Jaguarariúna: Embrapa-CNPMA, p.205-227, 1998.

FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C.; PIZZARANI-KLEINER, A.; AZEVEDO, J. L. Diversity among soil and insect isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* detected by RAPD. **Letters in Applied Microbiology**. Oxford, v.22, p.389-392, 1996.

GIMENEZ-PECCI, M.P.; BOGO, M.R.; SANTI, L.; KRIGER-DE-MORAES, C.; CORREA, C.T.; HENNING-VAINSTEIN, M.; SCHRANK, A. Characterization of Mycoviruses and Analyses of Chitinase Secretion in the Biocontrol Fungus *Metarhizium anisopliae*. **Current Microbiology**, New York. v. 45, n. 5, p. 334-339, 2002.

GLIENKE, C. **Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa* Kiely detectada por RAPD**. 115p. Dissertação ( Mestrado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1995.

GLIENKE, C.; CHRISTO, D. ; MACCHERONI JR., W. ; AZEVEDO, J. L. High molecular diversity of the fungus *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae* and new primers for the diagnosis of the Citrus Black Spot. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, 2007. No prelo.

GLIENKE-BLANCO, C.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; VIEIRA, M. L. C.; BARROSO, P. A. V.; AZEVEDO, J. L. Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from *citrus*. **Genetic and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n.2, p.251-255, 2002.

GÓES, A; FEICHTENBERGER, E. Ocorrência da Mancha Preta causada por *Phyllosticta citricarpa* (Mc Alp) Van der Aa (*Guignardia citricarpa* Kiely) em pomares cítricos do Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.18, p. 318, 1993.

GRAJAL-MARTIN, M.J.; SIMON, C.J. ; MUEHLBAUER, F.J. Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum f.sp. pisi*. **Phytopatology**, Lancaster, v.83, p.612-14, 1993.

GRATTAPAGLIA, D. ; FERREIRA, M. E. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília : EMBRAPA, 1998. 220p.

GUIMARÃES, P.M.; JOSÉ, A.C. ; PROITE, K.; BERTIOLI, D.J.; LEAL-BERTIOLI, S.C.M. Development of molecular markers for resistance gene analogs in wild *Arachis* spp. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30 n.6, p.663-667, 2005

GUTHRIE, P. A. I.; MAGILL, C. W.; FREDERIKSEN, R. A.; ODVODY, G. N. Random amplified polymorphic DNA markers: a systems for identifying and differentiating isolates of *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, St. Paul, v.82, 832-835, 1992.

HALL, T. A. **BioEdit** 4.8. Raleigh, 1997-2001. 1 arquivo (11,5M); Disponível em <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html> BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Acesso em: Agosto de 2007.

HERBERT, J.A.; GRECH, N.M. A strain of *Guignardia citricarpa*, the citrus black spot pathogen, resistant to benomyl in South Africa. **Plant Disease**, St. Paul, v. 69, p. 1007, 1985.

HOEGGER, P.J.; HEINIGER, U.; HOLDENRIEDER, O.; RIGLING, D. Differential transfer and dissemination of hypovirus and nuclear and mitochondrial genomes of a hypovirus-infected *Cryphonectria parasitica* strain after introduction into a natural population. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 7, p. 3767-3771, 2003.

HOWARD, R.J.; FERRARI, M.A. Role of melanin in apressorium function. **Experimental Mycology**, Orlando, v.13, p. 403-418, 1989.

HOWITT, R.L.J.; BEEVER, R.E.; PEARSON, M.N.; FORSTER, R.L.S. Presence of double-stranded RNA and virus-like particles in *Botrytis cinerea*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 99, p. 1472-1478, 1995.

IBRAHIM, G.; BAYCA, B. Fungal, bacterial and nematological problems of citrus, grape and stone fruits in Arab countries. **Arab Journal of Plant Protection**, Beirut, v.7, n.2, p.190-197, 1989.

JASALAVICH, C.; OSTROFSKY, A.; JELLISON, J. Detection and identification of decay fungi in spruce wood by restriction fragment length polymorphism analysis of amplified genes encoding rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.11, p. 4725-4734, 2000.

JIN, Y.; WEINING, S.; NEVO, E. A MAPK gene from Dead Sea fungus confers stress tolerance to lithium salt and freezing–thawing: Prospects for saline agriculture. **Proceeding of the National Academy of Science**, Washington, v. 102, p. 18992-18997, 2005.

JOHNSTON, P.R.; FULLERTON, R.A. *Cryptosporiopsis citri* sp. Nov., cause of a citrus leaf spot in the Pacific Islands. **New Zealand Journal of Experimental Agriculture**, Wellington, v.16, p.159-163, 1988.

KAVA-CORDEIRO, V. **Guignardia citricarpa, G. Mangiferae e Phyllosticta spinarum: Caracterização Morfológica, Scars e RNA dupla fita**. 131p. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2004.

KUBO, Y.; TAKAMO, Y.; ENDO, N.; YASUDA, N.; TAJIMA, S.; FURUSAWA, I. Cloning and structural analysis of the melanin biosynthesis gene SCD1 encoding scytalone dehydratase in *Colletotrichum lagenarium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 12, p. 4340-4344, 1996.

KUMAR, S. ; TAMURA, K. ; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, London, v.5, p.150-163, 2004.

LEAL, S.C.M.; BERTIOLO, D.J.; BALL, B.V.; BUTT, T.M. Presense of double-stranded RNAs and virus-like particles in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, Abingdon, v.4, p. 89-94, 1994.

LEUCHTMANN, A.; PETRINI, O.; PETRINI, L.E.; CARROLL, G.C. Isozyme polymorphism in six endophytic *Phyllosticta* species. **Mycological Research**, Cambridge, v.96, n. 4, p. 287-294, 1992.

LEVIS, C. ;GIRAUD, T. ; DUTERTRE, M. ; FORTINI, D. ;BRYGOO, Y. Telomeric DNA of *Botrytis cinerea*: a useful tool for strain identification. **FEMS Microbiology Letters**, Cambridge, v.157, p267-272, 1997.

LI, J. Y.; HARPER, J. K.; GRANT, D. M.; TOMBE, B. O.; BASHYAL, B.; HESS, W. M.; STROBEL, G. A. Ambuic Acid, a Highly Functionalized Cyclohexenone with Antifungal Activity from *Pestalotiopsis* sp. and *Monochaetia* sp. **Phytochemistry**, Washington, v. 56, n.5, p. 463-468, 2001.

MADSEN, L.H. ; COLLINS, N.C.; RAKWALSKA, M.; BACKES, G.; SANDAL, N.;KRUSELL, L.; JENSEN, J.; WATERMAN, E.H.; JAHOR, A.; AYLIFFE, M.; PRYOR, A.J.; LANGRIDGE, P.; SCHULZE-LEFERT, P.; STOUGAARD, J. Barley disease resistance gene analogs of the NBS-LRR class: identification and mapping. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v.269, p.150-161, 2003.

MAITAN, V.R. **Isolamento e caracterização de actinomicetos endofíticos isolados de *Solanum lycocarpum* (lobeira)**. 122f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 1998.

MAKI, C. S. **Diversidade e Potencial Biotecnológico de Fungos Endofíticos de Cacau *Theobroma cacao* L.** Dissertação (Doutorado) – Setor de Agronomia, Genética e Melhoramento de Plantas. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2006.

MANULIS, S.; KOGAN, N.; REUVEN, M.; BEN-YEPHET, Y. Use of the RAPD technique for identification of *Fusarium oxysporum* sp. dianthi from carnation. **Phytopathology**, Lancaster, v.84, p.98-101, 1993.

MARTINS, M.K.; FURLANETO, M.C.; SOSA-GOMEZ, D.R.; FARIA, M.R.; FUNGARO, M.H. Double-stranded RNA in the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride*. **Current Genetics**, Berlin, v. 36, p. 94-7, 1999.

McCABE, P.M.; PFEIFFER, P.; VAN ALFEN, N.K. The influence of dsRNA viruses on the biology of plant pathogenic fungi. **Trends in Microbiology**, Limerick, v. 7, p. 377-381, 1999.

McMILLAN JR., R.T. *Guignardia citricarpa* a cause of black spot on mango foliage in Florida. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.117, p. 260-264, 1986.

McONIE, K.C. The latent occurrence in citrus and other hosts of a *Guignardia* easily confused with *G. citricarpa*, the citrus black spot pathogen. **Phytopathology**, St. Paul, v.54, p.40-43, 1964.

MCPHERSON, M. J.; QUIRKE, P.; TAYLOR, G. R. **PCR 1: A practical approach**. New York :IRL, 1991. 348p.

MELZER, M.S.; BOLAND, G.J. Transmissible hypovirulence in *Sclerotinia minor*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 18, p. 19-28, 1996.

MENEZES, M.; OLIVEIRA, S. M. A. **Fungos Fitopatogênicos**. Recife, p.146-149, 1993.

NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION) **BLAST**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>> Acesso em: Janeiro de 2008.

MERTENS, P. The dsRNA viruses. **Virus Research**, Shannon, v. 101, p. 3-13, 2004.

MICHELMORE, R. W.; PARAN, I.; KESSELI, R. V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceeding of the National Academy of Science**, New York, v. 88, p. 828-982, 1991.

MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the fungi**. 4.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1996. p. 501-513.

MOSTERT, L.; CROUS, P. W.; KANG, J.; PHILLIPS, A. J. L. Species of *Phomopsis* and a *Libertella* sp. occurring on grapevines with specific reference to South Africa: morphological, cultural, molecular and pathological characterization **Mycologia**, Lawrence, v.93, n. 1, p.146-167, 2001.

MULLIS, K. B. ; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, New York, v.155, p.335-350, 1987.

NAGY, R., HORNOK, L. Electrophoretic Karyotype Differences between Two Subspecies of *Fusarium acuminatum*. **Mycologia**, Lawrence, v. 86, p. 203-208, 1994.

NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION) **BLAST**. Disponível em : <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>> Acesso em: Janeiro de 2008.

NUSS, D.L.; KOLTIN, Y. Significance of dsRNA genetic elements in plant pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, p. 37-58, 1990.

OKANI, NAKAGIRI, ITO, Identity of *Guignardia* sp. inhabiting ericaceous Plants. **Canadian Journal of Botany**, Lawrence, v.79, p.101-109, 2001.

OULLET, T.; SEIFFERT, K. A. Genetic characterization of *Fusarium graminearum* strains using RAPD e PCR amplification. **Phytopathology**, Lancaster, v.83, p.1003-1007, 1993.

PAAVANEM-HUHTALA, S.; AVIKAINEM, H.; YLI-MATTILA, T. Development of strain-specific primers for a strain of *Gliocladium catenulatum* used in biological control. **European Journal Plant Pathological**, Dordrecht, v.106, n.2, p.187-198, 2000.

PANDEY, A.K.; REDDY, M.S.; SURYANARAYANAN, T.S. ITS-RFLP and ITS sequence analysis of a foliar endophytic *Phyllosticta* from different tropical trees. **Mycological Research**, Cambridge, v.107, n.4, p.439-444, 2003.

PATEL, B.N.; PATEL, R.C.; TILVA, D.G. *Phyllosticta* leaf spot: a new disease in Bidi tobacco nurse. **Tobacco Research**. Rajahmundry, v.14, p. 1176-1178, 1988.

PENNA, E.B.S. **Microrganismos endofíticos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e variabilidade genética em *Phyllosticta* sp por RAPD**. 123p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2000.

PEREIRA, J. O. **Fungos endofíticos hospedeiros tropicais *Stylosanthes guianensis* e *Musa cavendesh***. 105 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior da Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 1993.

PEREIRA, J. O; AZEVEDO, J.L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a preliminary study. **Mycologia**, Lawrence , v.85, p. 362-364, 1993.

PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: FOKKEMA, N.J.; HEUVEL, J. VAN DEN (Eds.), **Microbiology of the Phyllosphere**, Cambridge: Cambridge University, p.175-187, 1986.

PILEGGI, S. A. V. **Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss. por meio de marcadores RAPD e seu potencial farmacológico**. 141f. Tese (Doutorado) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

PIMENTEL, I. C.; GLIENKE-BLANCO, C.; GABARDO, J.; PIMENTEL, A. M.; AZEVEDO, J. L. Fungos endofíticos do Milho (*Zea mays* L.) e busca de possíveis entomopatógenos no controle de pragas agrícolas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21., 2001, Foz do Iguaçu. **Anais ...** Foz do Iguaçu, 2001a. p. 24.

PIMENTEL, I. C.; GLIENKE-BLANCO, C.; GABARDO, J.; PIMENTEL, A.M.; AZEVEDO, J. L. Fungos endofíticos da Soja (*Glycine Max* L.) e busca de possíveis entomopatógenos no controle de pragas agrícolas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21., 2001, Foz do Iguaçu. **Anais ...**Foz do Iguaçu, 2001b. p. 28.

- PIOLI, R. N.; MORANDI, E. N.; MARTÍNEZ, M. C.; LUCCA, F.; TOZZINI, BISARO, V.; HOPP, H. E. Morphologic, molecular, and pathogenic characterization of diaporthe phaseolorum variability in the core soybean – Producing Área of Argentina. **Phytopathology**, Lancaster, v. 93. n.2, p.136-146, 2003.
- PONS, N. Estudio taxonomico de especies de *Phoma* y *Phyllosticta* sobre caña de azucar (*Saccharum* sp). **Fitopatologia Venezolana**, Maracay, v. 3, p.34-43, 1990.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MaC DONALD, K.D.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, San Diego, v.5, p.141, 1953.
- PUNJA, Z.K. Influence of double-stranded RNA on growth, sporulation, pathogenicity, and survival of *Chalara elegans*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.73, p.1001-1009, 1994.
- RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.1, p.17-20, 1985.
- RIBEIRO, L. A. de **Variabilidade Genética por RAPD em fungos endófitos de Gênero *Penicillium*, provenientes de *Zea mays* L.** 90 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1995.
- ROBBS, C. F. A mancha preta dos fungos cítricos (*Phyllosticta citricarpa*): ameaça a citricultura paulista. Laranja. **Comunicado Técnico**, EMBRAPA, n.11, p.75-86, 1990.
- ROBBS, C. F.; BITTENCOURT, A. M. A mancha preta dos frutos: um dos fatores limitantes à produção citrícola do estado do Rio de Janeiro. **Comunicado Técnico**, n. 19, p.1-5, 1995.
- ROBIN, C.; HEINIGER, U. Chestnut blight in Europe: Diversity of *Cryphonectria parasítica*, hypovirulence and biocontrol. **Forest Snow and Landscape Research**, Washington, v. 76, n. 3, p. 361-367, 2001.
- ROBINSON, H.L.; DEACON, J.W. Double-stranded RNA elements in *Rhizoctonia solani* AG3. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, p. 12-22, 2001.
- RODRIGUES, K. F.; DIAS-FILHO, M. B. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *B. humidicola*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 905-909, 1996.
- RODRIGUES, K.F.; SIEBER, T.N.; GRUNIG, C. R. ; HOLDENRIEDER, O. Characterization of *Guignardia mangiferae* isolated from tropical plants based on morphology, ISSR-PCR amplifications and ITS1-5.8S-ITS2 sequences, **Mycological Research**, Cambridge, v.108, p.45-52, 2004.



RODRIGUES, M. B. C. **Controle de *Guignardia citricarpa*, agente causal da Mancha Preta dos Citros**. 67 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior da Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2006.

ROMO, M. ; LEUCHTMANN, A.; GARCÍA, B.; ZABALGOGEAZCOA, I. A totivirus infecting the mutualistic fungal endophyte *Epichlöe festucae*. **Virus Research**, United Kingdom, v 124, p. 38-43, 2007.

RUBINI, M. R.; SILVA-RIBEIRO, R. T.; POMELLA, A. W. V.; MAKI, C. S.; ARAÚJO, W. L.; SANTOS, D. R.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal Biology Science**, Cambridge, v. 1, p. 24-33, 2005.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S. J.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science (Washington)** v.230, p.1350-1354, 1985.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**. 2. ed. Cold Spring Harbor: CSH Press, 1989.

SAMUELES, G. J.; SEIFERT, K. A. The impact of molecular characters on systematics of filamentous ascomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.33, p.37-67, 1995.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA Sequencing with chain terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United states of America**, Washington, v.74, p.5463-5467, 1977.

SANTI, L.; MORAES, C.K.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. Existe diferença na infectividade entre as linhagens infectadas ou não infectadas por micovírus? In.: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 46., 2000, Águas de Lindóia. **Programas e Resumos ...** Águas de Lindóia: SBG, 2000. p. 341.

SHAW, B.D.; KUO, K.; HOCH, H.C. Germination and apressorium development of *Phyllosticta ampellicida* pycnidiospores. **Mycologia**, Lawrence, v.90, n.2, p. 258-268, 1998.

SHAW, B.D.; KOZLOVA, O.; READ, N.D.; GILLIAN TURGEON, B.; HOCH, H.C. Expression of Recombinant Aequorin as an Intracellular Calcium Reporter in the Phytopathogenic Fungus *Phyllosticta ampellicida*. **Journal of Biotechnology**. Berlin, v. 53, p.273-289, 2002.

SHELBOURN, S.L.; DAY, P.R.; BUCK, K.W. Relationships and functions of virus double-stranded RNA in a P4 Killer Strain of *Ustilago maydis*. **Journal of General Virology**, Reading, v. 69, p. 975-982, 1988.

SILVA, F. de A. S. ; AZEVEDO, C. A. V. de. A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4., 2006, Orlando. **Anais ...** Orlando: American Society of Agricultural Engineers, 2006. p. 393-396.

SILVA, F. de A. S. ; AZEVEDO, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.4,n.1, p.71-78, 2002.

SILVA, F.de A.S. The ASSISTAT Software: statistical assistance. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 6., Cancun, 1996. **Anais ...** Cancun: American Society of Agricultural Engineers, 1996. p.294-298.

SILVA-HANLIN, D. M. W.; HANLIN, R. T. Small subunit ribosomal RNA gene phylogeny of several loculoascomycetes and its taxonomic implications. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, p.153-160, 1999.

SIVANESAM, A. **The bitunicate Ascomycetes and their anamorphus**. Berlin: J. Cramer, 701p, 1984.

SKINNER, D.Z.; BUDDE, A. D.; LEONG, S. A. Molecular karyotype analysis of fungi. In: BENNETT, J. W.; LASURE, L. L. (Eds). **More gene manipulations in fungi**. San Diego: Academic Press, 1991.

SOUTHERN E. M: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, London, V.98, p.503-517, 1975.

SOUZA, A. O. **Bactérias endofíticas do milho (*Zea mays* L.) e sua variabilidade genética analisada por RAPD**. 85f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior da Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 1996.

SOUZA, L. P.; ASTOLFI F. S.; PEREIRA, J.O. Diversidade bacteriana endofítica de diferentes plantas tropicais. In: SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 7., 2001, Manaus. **Resumos da Reunião Especial da SBPC**. Manaus, 2001.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; SPARTACO, A. F.; PINHEIRO, M. L. B.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens bentham*. **Acta Amazonica**, Manaus, v.34, n.2, p.185-195, 2004.

SPÓSITO, M.B.; AMORIM, L.; BASSANEZI, R.B; BERGAMIN FILHO, A.; HAU, B. Spatial pattern of black spot incidence within citrus trees related to disease severity and pathogen dispersal. **Plant Pathology**, New York, p. 103–108, 2008.

STEENKAMP, E.T.; WINGFIELD, B.D.; SWART, W.J.; WINGFIELD, M.J. Double-stranded RNA and associated virulence in South African isolates of *Sphaeropsis sapinea*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.76, p.1412-1417, 1998.

STONE, J.K. Fine structure of latent infections by *Rhabdocline parkeri* on Douglas-fir, with observations on uninfected epidermal cells. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.66, p.45-54, 1998.

STRINGARI, D. **Estudo da Variabilidade Genética de *Guignardia* ssp. Por meio de Marcadores RAPD e seqüências ITS**. 101f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2004.

STRINGARI, D.; GLIENKE, C.; FIGURA, G. Variabilidade genética e morfológica de isolados do fungo *Guignardia* spp. procedentes de diversas regiões e hospedeiros. In: REUNIÃO DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 24., 2004, Gramada. **Anais ...**, Gramado, 2004. p. 218

STROBEL, G. A.; LI, J. Y. ; WORAPONG, J. ; BAIRD, G.; HESS, W. M. *Pestalotiopsis jesterri*, sp. Nov. an endophyte from *Fraea bodenii* from the Southern Highlands of Papua New Guinea. **Microbiology**, Washington, v. 76, p. 257-266, 2000.

STROBEL, G. A.; METZ, A. M.; HADDAD, A.; WORAPONG J.; LONG, D.M.; FORD, E. J.; HESS, W. M. Induction of the sexual stage of *Pestalotiopsis microspora*, a taxol-producing fungus. **Microbiology**, Washington, v 146, p. 2079-2089, 2001.

STRYER, L. Characterization of dsRNA in *Chalara elegans* and effects on growth and virulence. **Biochemistry**, v.4, p.65-68, New York, 1998.

SUGHA, S.K.; SINGH, B.M.; SHARMA, B.M. Studies on *Phyllosticta glumarum* causing glume blight of rice (*Oryza sativa* L.) **Himachal Journal of Agricultural Research**, Palampur, v.12, n.1, p. 11-14, 1986.

TIAGO, P.V. **Estudo de proteases degradadoras de cutícula produzidas por *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e *Paecilomyces fumosoroseus***. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2001.

VAN DER AA, H.A. Studies in *Phyllosticta* I. **Studies in Mycology**, Oxford, n.5, 1973.

VARGA, J.; RINYU, E.; KEVEI, E.; TOTH, B.; KOZAKIEWICZ, Z. Double-stranded RNA mycoviruses in species of *Aspergillus* sections Circumdati and Fumigati. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.44, p.569-574, 1998.

VASCONCELOS, M. J. V. *et al.* Differentiation of *Colletotrichum truncatum* isolates by random amplified polymorphic DNA. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, p.520-523, 1994.

- VIAUD, M.; COUTEAUDIER, Y.; LEVIS, C.; RIBA, G. Genome Organization in *Beauveria bassiana*: Electrophoretic Karyotype, Gene Mapping, and Telomeric Fingerprint. **Fungal Genetics and Biology**, Versailles, p.175-183, v.20, 1996.
- VILARINHOS, A. D.; PAULA JR, T. J. ; BARROS, E. G.; MOUREIRA, M. A. Characterization of races of *Colletotrichum lindemutianum* by the random amplified polymorphic DNA technique. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, p.194-198, 1995.
- WALKER, M. R. ; RAPLEY, R. **Guia de rotas na tecnologia do gene**. São Paulo: Atheneu, 1999. 334p.
- WATSON, J. D.; GILMAN, M.; WITKOSWSKI, J.; ZOLLER, M. **Recombinant DNA**. 2. ed. New York : Freeman, 1992.
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v.18, p.7213-7218, 1990.
- WHITE Jr., J. F.; MORGAN-JONES, G.; MORROW, A.C. Taxonomy, life cycle, reproduction and detection of *Acremonium* endophytes. **Agriculture Ecosystem & Environment**, Orlando, v. 44, p.13-37, 1993.
- WHITE Jr., J. F.; MORROW, A. C. Endophyte-host associations in forage grasses. XII. A fungal endophyte of *Trichachne insularis* belonging to *Pseudocercospora*. **Mycologia**, Lawrence, v.82, p.218-226, 1990.
- WHITE Jr., J.F.; COLE, G.T. Endophyte-host associations in forage grasses. V. Occurrence of fungal endophytes in certain species of *Bromus* and *Poa*. **Mycology**, Lawrence, v. 78, n.5, p.846-850, 1986.
- WHITE Jr., J.F.; COLE, G.T. Endophyte-host associations in forage grasses. I. Distribution of fungal endophytes in some species of *Lolium* and *Festuca*. **Mycologia**, Lawrence, v.77, p. 323-327, 1985.
- WILLIAMS, J.G.K.; HANAFEY, M. K.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzymology**. New York, v. 218, p. 704-740, 1993.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGER, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.
- WOLOSHUK, C.P.; SISLER, H.D. Tricyclazole, pyroquilon, tetrachlorophthalide, PCBA, coumarine and related compounds inhibit melanization and epidermal penetration by *Pyricularia oryzae*. **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v.7, p.161-166, 1982.

WOO, S. L., A.; ZOINA, G.; DEL SORBO, M.; LORITO, B.; NANNI, F. S.; Noviello, C. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by pathogenic races, VCGs, RFLPs, and RAPD. **Phytopathology**, Lancaster, v.86, p.966–973, 1996.

WOUDT, L.P.; NEUVEL, A.; SIKKEMA, A.; GRINSVEN, MQJ.; MILLIANO, W. A. J.; CAMPBELL, C. L.; LESLIE, J. F. Genetic variation in *Fusarium oxysporum* from cyclamen. **Phytopathology**, Lancaster, v.85, p.1348–1355, 1995.

WRIGHT, K. G. F.; GUEST, D. I.; WIMALAJEEWA, D. L. S.; HEESWIJK, R. Characterisation of *Fusarium oxysporum* isolated from carnation in Australia based on pathogenicity, vegetative compatibility and random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. **Journal Plant Pathology**, New York, n.102, p.451–457, 1996.

ZABALGOGEAZCOA, I.; BENITO, E.P.; CIUDAD, A.G.; CRIADO, B.G.; ESLAVA, A.P.; Double-stranded RNA and virus-like particles in the grass endophyte *Epichloe festucae*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, p. 914-918, 1998.

ZHOU, T.; BOLAND, G.J. Mycelial growth and production of oxalic acid by virulent and hypovirulent isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 21, p. 93-99, 1999.

ZOU, W. X.; TAN, R. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **NPR**, Cambridge, v.18, p. 448-459, 2001.

**ANEXOS**

ANEXO 1 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS PC7LE10 E PC7LE10 CURADA QUANTO AO CRESCIMENTO MICELIAL EM MC E BDA APÓS 10 E 20 DIAS DE CRESCIMENTO.

## EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## ANOVA

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	7	102.57800	14.65400	108.0230 **
RESÍDUO	32	4.34100	0.13566	
Total	39	106.91900		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

## TESTE DAS MÉDIAS

MC 10 DIAS	2.22000	d
CURADA MC 10 DIAS	1.86000	d
BDA 10 DIAS	3.93000	c
CURADA BDA 10 DIAS	3.23000	c
MC 20 DIAS	3.59000	c
CURADA MC 20 DIAS	3.37000	c
BDA 20 DIAS	7.03000	a
CURADA BDA 20 DIAS	5.61000	b

DMS = 0.75440, MG = 3.85500, CV% = 9.55423

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 2 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS PC7LD6 E PC7LD6 CURADA QUANTO AO CRESCIMENTO MICELIAL EM MC E BDA APÓS 10 E 20 DIAS DE CRESCIMENTO.

## EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## ANOVA

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	7	145.82775	20.83254	1073.4962 **
RESÍDUO	32	0.62100	0.01941	
Total	39	146.44875		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

## TESTE DAS MÉDIAS

MC 10 DIAS	1.90000	f
CURADA MC 10 DIAS	2.02000	f
BDA 10 DIAS	4.27000	c
CURADA BDA 10 DIAS	3.70000	d
MC 20 DIAS	3.25000	e
CURADA MC 20 DIAS	3.37000	e
BDA 20 DIAS	7.65000	a
CURADA BDA 20 DIAS	6.54000	b
DMS = 0.28533, MG = 4.08750, CV% = 3.40811		

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 3 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS PC3C E PC3C CURADA QUANTO AO CRESCIMENTO MICELIAL EM MC E BDA APÓS 10 E 20 DIAS DE CRESCIMENTO.

## EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## ANOVA

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	7	87.41694	12.48813	31.3920 **
RESÍDUO	32	12.73000	0.39781	
Total	39	100.14694		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

## TESTE DAS MÉDIAS

MC 10 DIAS	1.99000	d
CURADA MC 10 DIAS	2.08000	cd
BDA 10 DIAS	4.24000	b
CURADA BDA 10 DIAS	2.04000	cd
MC 20 DIAS	3.38000	b
CURADA MC 20 DIAS	3.33000	bc
BDA 20 DIAS	6.58000	a
CURADA BDA 20 DIAS	4.49000	b
DMS = 1.29187, MG = 3.51625, CV% = 17.93740		

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 4 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS PCIAC19/02, PCIAC19/02 A E PCIAC19/02 B, SENDO A E B SETORES CURADOS, QUANTO AO CRESCIMENTO MICELIAL EM MC E BDA APÓS 10 E 20 DIAS DE CRESCIMENTO.

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO  
ANOVA

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	11	196.56346	17.86941	274.1232 **
RESÍDUO	48	3.12900	0.06519	
Total	59	199.69246		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

TESTE DAS MÉDIAS

MC 10 DIAS	2.23000	f
MC SETOR A 10 DIAS	2.13000	f
MC SETOR B 10 DIAS	2.80000	e
BDA 10 DIAS	3.95000	cd
BDA SETOR A 10 DIAS	4.09000	cd
BDA SETOR B 10 DIAS	5.16000	b
MC 20 DIAS	3.66000	d
MC SETOR A 20 DIAS	3.60000	d
MC SETOR B 20 DIAS	4.36000	c
BDA 20 DIAS	7.12000	a
BDA SETOR A 20 DIAS	7.20000	a
BDA SETOR B 20 DIAS	7.51000	a

DMS = 0.55435, MG = 4.48417, CV% = 5.69378

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 5 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS 33/05, 33/05 1NC, 33/05 2NC (SETORES CURADOS), 33/05 1C, 33/05 2C E 33/05 3C E 33/05 4C (SETORES NÃO CURADOS), QUANTO AO CRESCIMENTO MICELIAL EM BDA APÓS 10 DIAS DE CRESCIMENTO.

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO  
ANOVA

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	6	10.89443	1.81574	7.4810 **
RESÍDUO	28	6.79600	0.24271	
Total	34	17.69043		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )



## TESTE DAS MÉDIAS

33/05	5.31000	ab
33/05 1NC	5.46000	ab
33/05 2NC	4.24000	c
33/05 1C	4.30000	c
33/05 2C	4.84000	abc
33/05 3C	4.48000	bc
33/05 4C	5.75000	a

DMS = 0.79743, MG = 4.38800, CV% = 7.54019

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 6– ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS 33/05, 33/05 1NC, 33/05 2NC (SETORES CURADOS), 33/05 1C, 33/05 2C E 33/05 3C E 33/05 4C (SETORES NÃO CURADOS), QUANTO AO CRESCIMENTO MICELIAL EM BDA APÓS 20 DIAS DE CRESCIMENTO.

## EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## ANOVA

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	6	4.90147	0.81691	6.3279 **
RESÍDUO	28	3.61472	0.12910	
Total	34	8.51619		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

## TESTE DAS MÉDIAS

33/05	7.66000	a
33/05 1NC	7.24400	a
33/05 2NC	7.36000	a
33/05 1C	6.44000	b
33/05 2C	7.10000	ab
33/05 3C	7.21000	a
33/05 4C	7.60000	a

DMS = 0.72032, MG = 7.23057, CV% = 4.96919

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 7 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS 33/05, 33/05 1NC, 33/05 2NC (SETORES CURADOS), 33/05 1C, 33/05 2C E 33/05 3C E 33/05 4C (SETORES NÃO CURADOS), QUANTO AO CRESCIMENTO MICELIAL EM MC APÓS 10 DIAS DE CRESCIMENTO.

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

ANOVA				
F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	6	3.61486	0.60248	25.7941 **
RESÍDUO	28	0.65400	0.02336	
Total	34	4.26886		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

TESTE DAS MÉDIAS

33/05	2.08000	b
33/05 1NC	2.40000	a
33/05 2NC	1.76000	c
33/05 1C	1.74000	c
33/05 2C	1.59000	c
33/05 3C	2.33000	ab
33/05 4C	2.41000	a

DMS = 0.30639, MG = 2.04429, CV% = 7.47598

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 8 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS 33/05, 33/05 1NC, 33/05 2NC (SETORES CURADOS), 33/05 1C, 33/05 2C E 33/05 3C E 33/05 4C (SETORES NÃO CURADOS), QUANTO AO CRESCIMENTO MICELIAL EM MC APÓS 20 DIAS DE CRESCIMENTO.

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

ANOVA				
F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	6	10.94786	1.82464	42.7174 **
RESÍDUO	28	1.19600	0.04271	
Total	34	12.14386		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

## TESTE DAS MÉDIAS

33/05	3.54000	bc
33/05 1NC	3.88000	ab
33/05 2NC	3.41000	c
33/05 1C	2.67000	d
33/05 2C	2.40000	d
33/05 3C	3.68000	abc
33/05 4C	3.98000	a

DMS = 0.41434, MG = 3.36571, CV% = 6.14058

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 9 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS PC7LE10 E PC7LE10 CURADA QUANTO A PRODUÇÃO DE ESPOROS APÓS INCUBAÇÃO EM MC E BDA DURANTE 20 DIAS A 28 °C.

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO  
ANOVA

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	3	23063.75000	7687.91667	81.4614 **
RESÍDUO	16	1510.00000	94.37500	
Total	19	24573.75000		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

## TESTE DAS MÉDIAS

MC	106.00000	a
CURADA MC	24.00000	b
BDA	36.00000	b
CURADA BDA	25.00000	b

DMS = 17.59538, MG = 47.75000, CV% = 20.34488

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 10 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS PC7LD6 E PC7LED6 CURADA QUANTO A PRODUÇÃO DE ESPOROS APÓS INCUBAÇÃO EM MC E BDA DURANTE 20 DIAS A 28°C.

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO  
ANOVA

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	3	14083.75000	4694.58333	13.5096 **
RESÍDUO	16	5560.00000	347.50000	
Total	19	19643.75000		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

TESTE DAS MÉDIAS

MC	73.00000	b
CURADA MC	110.00000	a
BDA	75.00000	b
CURADA BDA	137.00000	a
DMS = 33.76350, MG = 98.75000, CV% = 18.87732		

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 11 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS PC3C E PC3C CURADA QUANTO A PRODUÇÃO DE ESPOROS APÓS INCUBAÇÃO EM MC E BDA DURANTE 20 DIAS A 28°C.

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO  
ANOVA

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	3	60083.75000	20027.91667	27.4120 **
RESÍDUO	16	11690.00000	730.62500	
Total	19	71773.75000		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

TESTE DAS MÉDIAS

MC	49.00000	c
CURADA MC	69.00000	bc
BDA	109.00000	b
CURADA BDA	192.00000	a
DMS = 48.95728, MG = 104.75000, CV% = 25.80437		

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 12 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS PCIAC19/02, PCIAC19/02 A E PCIAC19/02 B (SETORES CURADOS) QUANTO A PRODUÇÃO DE ESPOROS APÓS INCUBAÇÃO EM MC E BDA DURANTE 20 DIAS A 28 °C.

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO  
ANOVA

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	5	64616.66667	12923.33333	65.7119 **
RESÍDUO	24	4720.00000	196.66667	
Total	29	69336.66667		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

TESTE DAS MÉDIAS

PCIAC19/02 MC	40.00000	b
SETOR A MC	46.00000	b
SETOR B MC	124.00000	a
PCIAC19/02 BDA	24.00000	b
SETOR A BDA	138.00000	a
SETOR B BDA	122.00000	a

DMS = 27.40702, MG = 82.33333, CV% = 17.03294

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 13 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS PC33/05, 33/05 1NC, 33/05 2NC (SETORES NÃO CURADOS), 33/05 1C, 33/05 2C, 33/05 3C E 33/05 4C (SETORES CURADOS) QUANTO A PRODUÇÃO DE ESPOROS APÓS INCUBAÇÃO EM BDA DURANTE 20 DIAS A 28 °C.

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

ANOVA

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	6	44468.57143	7411.42857	44.6280 **
RESÍDUO	28	4650.00000	166.07143	
Total	34	49118.57143		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

## TESTE DAS MÉDIAS

33/05	85.00000	b
33/05 1NC	44.00000	cd
33/05 2NC	53.00000	c
33/05 1C	27.00000	d
33/05 2C	65.00000	bc
33/05 3C	144.00000	a
33/05 4C	90.00000	b
DMS = 25.83553, MG = 72.57143, CV% = 17.75750		

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 14– ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS PC33/05, 33/05 1NC, 33/05 2NC (SETORES NÃO CURADOS), 33/05 1C, 33/05 2C, 33/05 3C E 33/05 4C (SETORES CURADOS) QUANTO A PRODUÇÃO DE ESPOROS APÓS INCUBAÇÃO EM MC DURANTE 20 DIAS A 28 °C.

## EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## ANOVA

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	6	81498.57143	13583.09524	44.5347**
RESÍDUO	28	8540.00000	305.00000	
Total	34	90038.57143		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

## TESTE DAS MÉDIAS

33/05	125.00000	ab
33/05 1NC	120.00000	ab
33/05 2NC	149.00000	a
33/05 1C	20.00000	d
33/05 2C	17.00000	d
33/05 3C	79.00000	c
33/05 4C	109.00000	bc
DMS = 35.01223, MG = 88.42857, CV% = 19.74955		

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 15– ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS PC7LE10 E PC7LE10 CURADA QUANTO A PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS EM FOLHA DE CITROS AUTOCLAVADA EM ÁGAR-ÁGUA COM 3% DE MC APÓS 21 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28 °C.

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO  
ANOVA

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	1	18145.12500	18145.12500	36.9586 **
RESÍDUO	6	2945.75000	490.95833	
Total	7	21090.87500		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

TESTE DAS MÉDIAS

PC7LE10	126.50000	a
PC7LE10 CURADA	31.25000	b
DMS = 38.33261, MG = 78.87500, CV% = 28.09202		

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 16 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS PC3C E PC3C CURADA QUANTO A PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS EM FOLHA DE CITROS AUTOCLAVADA EM ÁGAR-ÁGUA COM 3% DE MC APÓS 21 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28 °C.

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

ANOVA

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	1	13612.50000	13612.50000	168.2286 **
RESÍDUO	6	485.50000	80.91667	
Total	7	14098.00000		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

TESTE DAS MÉDIAS

PC3C	135.25000	a
PC3C CURADA	52.75000	b
DMS = 15.56199, MG = 94.00000, CV% = 9.56954		

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 17 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS PC7LD6 E PC7LD6 CURADA QUANTO A PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS EM FOLHA DE CITROS AUTOCLAVADA EM ÁGAR-ÁGUA COM 3% DE MC APÓS 21 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28C.

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

ANOVA				
F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	1	35912.00000	35912.00000	172.3776 **
RESÍDUO	6	1250.00000	208.33333	
Total	7	37162.00000		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

TESTE DAS MÉDIAS

PC7LD6 40.50000 b

PC7LD6 CURADA 174.50000 a

DMS = 24.97040, MG = 107.50000, CV% = 13.42675

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 18– ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS PCIAC1902, PCIAC1902 A E PCIAC1902 B (SETORES CURADOS) QUANTO A PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS EM FOLHA DE CITROS AUTOCLAVADA EM ÁGAR-ÁGUA COM 3% DE MC APÓS 21 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28 °C.

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

ANOVA				
F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	2	16384.66667	8192.33333	17.2581 **
RESÍDUO	9	4272.25000	474.69444	
Total	11	20656.91667		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

TESTE DAS MÉDIAS

PCIAC1902 148.75000 a

SETOR A 65.25000 b

SETOR B 76.75000 b

DMS = 43.03028, MG = 96.91667, CV% = 22.48064

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



ANEXO 19 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS 33/05, 1A, 1B (SETORES CURADOS), 2A, 2B E 3D (SETORES NÃO CURADOS) E 33/05 CURADA QUANTO A PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS EM FOLHA DE CITROS AUTOCLAVADA EM ÁGUA COM 3% DE MC APÓS 21 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28 °C.

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

ANOVA

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	6	157301.85714	26216.97619	50.7379 **
RESÍDUO	21	10851.00000	516.71429	
Total	27	168152.85714		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

TESTE DAS MÉDIAS

33/05	240.25000	a
33/05 1NC	147.50000	b
33/05 2NC	154.25000	b
33/05 1C	36.50000	c
33/05 2C	32.25000	c
33/05 3C	42.25000	c
33/05 4C	50.00000	c
DMS = 52.24963, MG = 100.42857, CV% = 22.63435		

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 20 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DAS LINHAGENS 33/05 E 2 A QUANTO AO NÚMERO DE ESPOROS GERMINADOS APÓS 72 HORAS DE INCUBAÇÃO A 28 °C.

EXPERIMENTO EM BLOCOS CASUALIZADOS

ANOVA				
F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
BLOCOS	3	10.50000	3.50000	1.2353 ns
TRATAMENTOS	1	2112.50000	2112.50000	745.5882 **
RESÍDUO	3	8.50000	2.83333	
Total	7	2131.50000		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

TESTE DAS MÉDIAS

Médias de bloco

BLOCO 1	29.00000	a
BLOCO 2	28.50000	a
BLOCO 3	26.00000	a
BLOCO 4	27.50000	a

DMSB = 8.12933

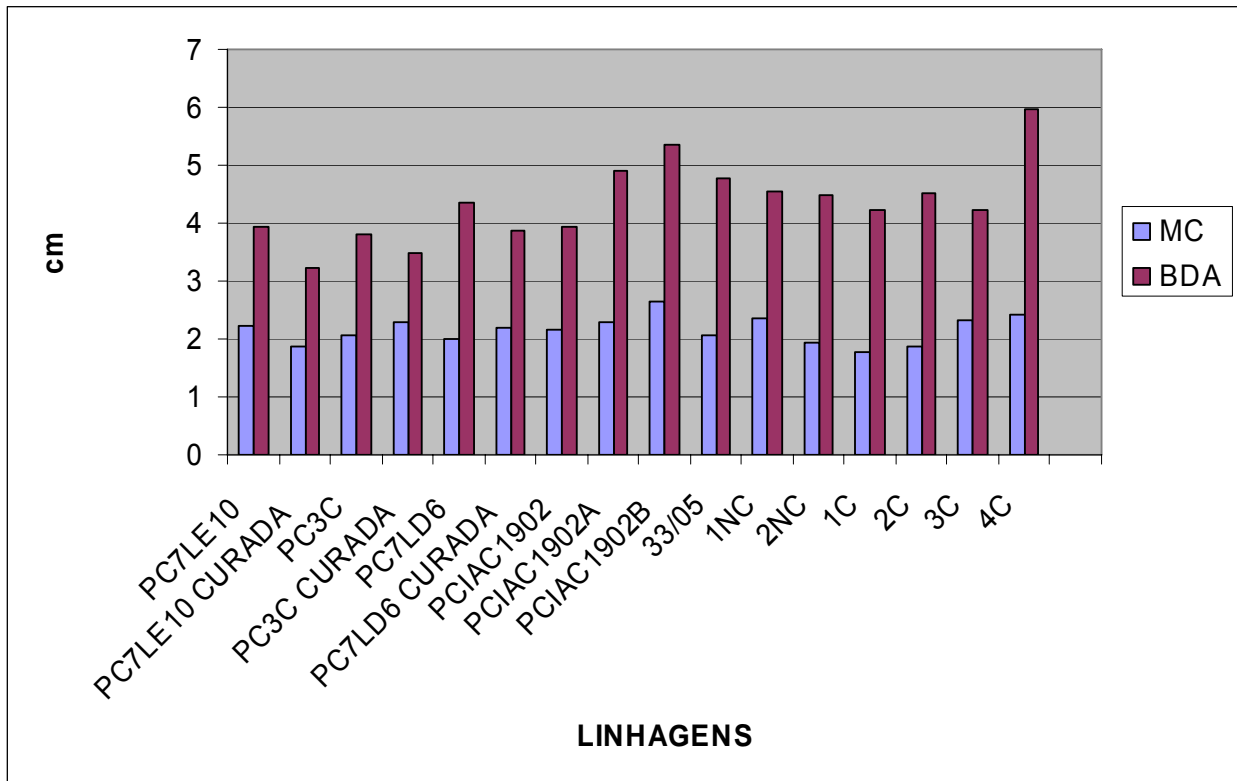
Médias de tratamento

33/05	44.00000	a
2A	11.50000	b

DMS = 3.78731, MG = 27.75000, CV% = 6.06577

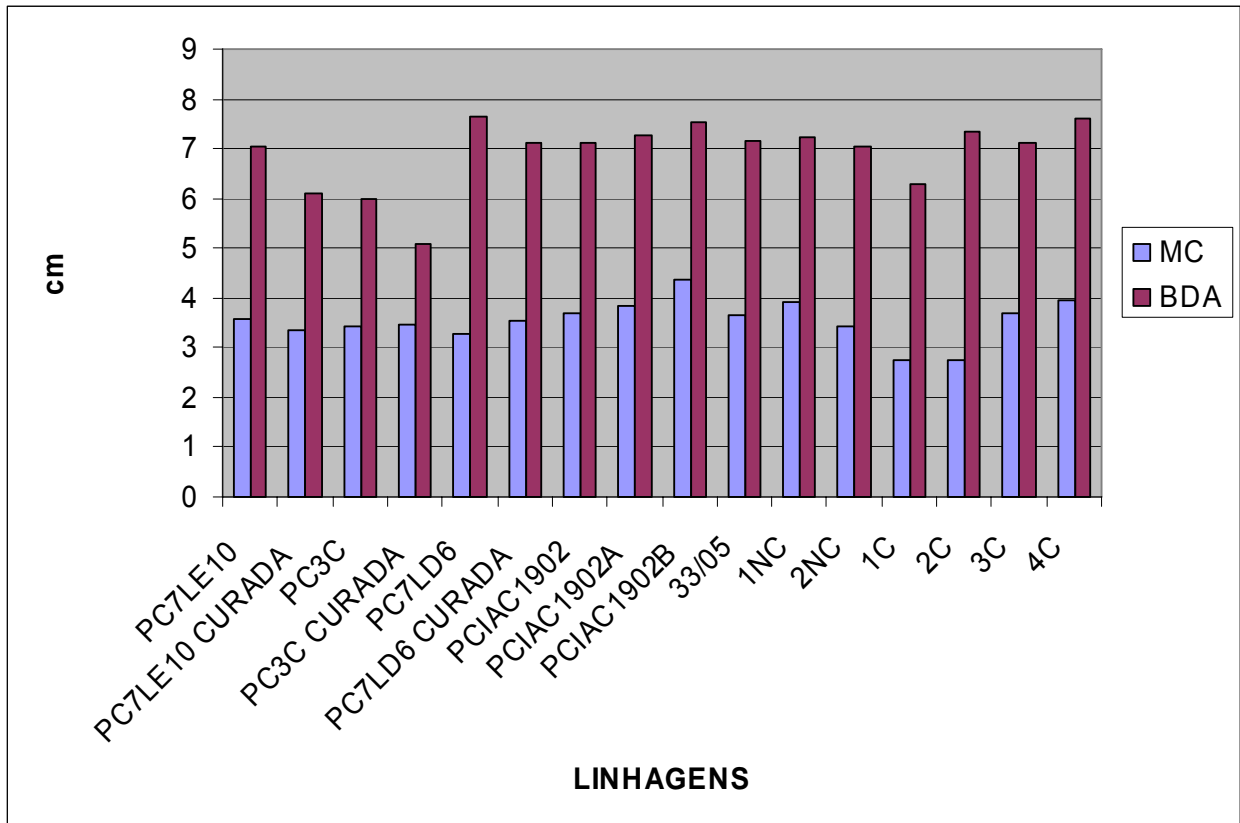
As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 21- CRESCIMENTO RADIAL DAS LINHAGENS DE *G. citricarpa* APÓS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C NOS MEIOS DE CULTURA MC E BDA.



FONTE: O autor

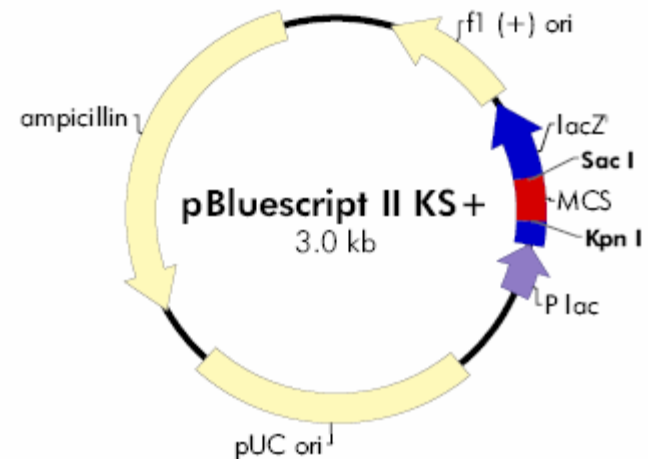
ANEXO 22- CRESCIMENTO RADIAL DAS LINHAGENS DE *G. citricarpa* APÓS 20 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C NOS MEIOS DE CULTURA MC E BDA.



FONTE: O autor

## ANEXO 23- MAPA DO PLASMÍDIO p Bluescript II KS+

**f1 (+) origin** 135–441  
 **$\beta$ -galactosidase  $\alpha$ -fragment** 460–816  
**multiple cloning site** 653–760  
***lac* promoter** 817–938  
**pUC origin** 1158–1825  
**ampicillin resistance (*bla*) ORF** 1976–2833



### pBluescript II KS (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 598–826)

