

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**DANYELLE STRINGARI**

**SISTEMÁTICA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Guignardia* spp.  
E *Phyllosticta* sp. NOS ESTADOS DO PARANÁ E SÃO PAULO**

**CURITIBA**

**2009**

**DANYELLE STRINGARI**

**SISTEMÁTICA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Guignardia* spp.  
E *Phyllosticta* sp. NOS ESTADOS DO PARANÁ E SÃO PAULO**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, Área de concentração: Genética.**

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Chirlei Glienke**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho**

**CURITIBA**

**2009**

DEDICO

Aos grandes amores da minha vida...  
meus pais, Elimar e Luiz Carlos (*in memoriam*),  
meus irmãos Fernanda e Luís Carlos Jr.,  
e meu amor Alessandro.

## AGRADECIMENTOS

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

À Professora Dr<sup>a</sup>. Chirlei Glienke, pela orientação e amizade em todos estes anos de pesquisa. O meu aprendizado durante esta caminhada vai além do que é possível registrar com palavras em uma Tese. Obrigada por fazer parte de toda minha trajetória acadêmica e científica.

Ao Professor Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho, pela co-orientação, amizade, paciência e pelas sugestões sempre proveitosas.

À Professora Dr<sup>a</sup> Vanessa Kava-Cordeiro, por sua valiosa amizade, excelente convivência e por todo apoio durante esta jornada.

À Professora Dr<sup>a</sup> Lygia Vitória Galli-Terasawa, pela amizade, compreensão e convivência em todos estes anos.

Ao Professor Dr. Antônio de Goes, pelo envio de material para isolamento e pelas sugestões ao trabalho.

À Professora Dr<sup>a</sup> Ida Chapaval Pimentel, pelas sugestões e pelos conselhos sempre úteis de uma grande amiga.

À Professora Dr<sup>a</sup> Patrícia do Rocio Dalzoto, pelas valiosas sugestões, pelo exemplo de vida e pela inestimável amizade.

A todos os integrantes do grupo de pesquisa do Laboratório de Genética de Microrganismos da UFPR, Douglas H. Montenegro, Lisandra S. Ferreira, Tatiane Mariussi, Larice Armstrong, Josiele Polzin, Caroline Andrade, Josiane Gomes Figueiredo, Ângela Ikeda, Thabata, Eduardo, Andressa, Patrícia e Fabiana. Obrigada pela convivência sempre agradável no laboratório, pelo companheirismo e pela amizade.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para conclusão deste trabalho, em especial, Flávia Gama, Lucinir José Feltrin, Maysa Y. Murai, Juliana Fabris e Rosana Camargo Nishimura.

Ao Douglas Adamoski, pela amizade e incansável prestatividade.

À Renata Gomes Rodrigues, querida amiga e companheira em todos os momentos.

À Izolde Gaertner, pela amizade e incansável ajuda técnica.

À Anilda Gomes da Silva, pela amizade e auxílio técnico na SEAD.

A todos os colegas e funcionários do Departamento de Genética.

Ao corpo docente do Departamento de Genética.

Ao CNPq, FUNDECITRUS, Fundação Araucária e FAPESP pelo apoio financeiro.

Ao querido Ale, pelo amor, paciência, dedicação e pela importância imensurável em minha vida.

Aos meus queridos irmãos Luis Carlos e Fernanda, pelo amor, carinho e incentivo em todos os momentos. E por serem pessoas maravilhosas, com as quais eu tenho o privilégio de conviver.

À minha querida mãe, pelo amor e dedicação incondicional e por estar sempre presente em minha vida. Pelo apoio, educação e exemplo de vida.

Ao meu querido pai, pelo amor, educação e pelos grandes momentos de convivência. Sentirei muito a sua falta...

“A melhor maneira de prever o futuro é inventá-lo.”

*Allan Kardec*

## RESUMO

A Mancha Preta dos Citros (MPC) causada pelo fungo *Guignardia citricarpa* é uma importante doença da citricultura brasileira, que ocasiona grandes prejuízos econômicos ao País. Apesar de ser uma doença notória no Estado de São Paulo, ainda não se conhece a sua distribuição e epidemiologia no Estado do Paraná. Além disso, são desconhecidas as condições de manejo adequadas para a região do Vale do Ribeira, onde a doença afeta seriamente os pomares. Este trabalho teve como objetivo realizar um levantamento preliminar da distribuição do patógeno no Paraná, a fim de fornecer subsídios para elaboração de medidas de controle da proliferação da MPC. Além disso, o estudo objetivou validar o método morfológico de diagnóstico para *G. citricarpa* descrito por Baayen *et al.* (2002), em isolados procedentes do Brasil, e analisar a variabilidade genética e filogenética de *G. citricarpa* e *G. mangiferae*. Estes fungos são morfológicamente semelhantes e frequentemente *G. mangiferae* é isolada de folhas assintomáticas de citros e de diversos hospedeiros, não sendo associada à doença. Foram analisados 453 isolados dos gêneros *Phyllosticta* e *Guignardia* provenientes de diversos hospedeiros e localidades, sendo 251 isolados de lesões da MPC em frutos cítricos e 202 do interior de folhas de citros, manga e outros hospedeiros. Neste trabalho, foram isoladas 169 linhagens de folhas cítricas e de manga provenientes de São Paulo e Paraná, obtidas em 7 isolamentos independentes, pela metodologia de isolamento de fungos endofíticos. Os isolados foram identificados morfológicamente em meio Ágar-Aveia (BAAYEN *et al.*, 2002) e por análises moleculares (marcadores RAPD e sequenciamento das regiões ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA e  $\alpha 1$  do fator de alongação da tradução). Corroborando com outros autores, *G. mangiferae* foi encontrada colonizando os tecidos internos de diversos hospedeiros e, raramente, em lesões da MPC em frutos. Este complexo apresentou grande variabilidade genética e possivelmente compreende diferentes espécies ainda não resolvidas. Já a espécie *G. citricarpa* foi encontrada somente nos tecidos internos de plantas cítricas e em lesões da MPC, apresentando baixa variabilidade, sugerindo uma alta especificidade patógeno-hospedeiro. Uma nova espécie do gênero *Phyllosticta*, com características morfológicas semelhantes a *G. mangiferae*, foi encontrada colonizando plantas de *Mangifera indica* nos Estados de São Paulo e Paraná. Na identificação das linhagens pelos 3 métodos utilizados, o marcador morfológico mostrou-se útil na identificação de *G. citricarpa*, embora não seja seguro, podendo apresentar resultados falso-negativos. Já as regiões ITS e TEF1, bem como os marcadores RAPD, indicaram seguramente a distinção entre as espécies *G. citricarpa*, *G. mangiferae* e a nova espécie de *Phyllosticta* presente em folhas de manga. Os marcadores RAPD detectaram a baixa variabilidade existente em *G. citricarpa*, enquanto que as regiões sequenciadas não foram informativas para esta espécie. Analisando a procedência, a variedade e os sintomas dos isolados, a variabilidade encontrada sugeriu que não existe relação entre os genótipos do patógeno e as variedades cítricas, nem entre a expressão dos diferentes sintomas da MPC. Verificou-se, ainda, que o mesmo genótipo presente em São Paulo está colonizando *Citrus spp.* na região paranaense do Vale do Ribeira, sugerindo que medidas de controle empregadas naquela unidade federativa possam ser otimizadas e aplicadas no Paraná. Outro resultado relevante foi a constatação da presença do patógeno de forma latente nos pomares da mesorregião Noroeste Paranaense, onde a doença

ainda não foi oficialmente relatada, sendo imprescindível a implementação de medidas de controle da MPC.

**Palavras-chave:** *G. citricarpa*, *G. mangiferae*, *Phyllosticta* sp., *Citrus sinensis*, Mancha Preta dos Citros, RAPD, filogenia, taxonomia.



## ABSTRACT

The Citrus Black Spot (CBS), caused by the fungus *Guignardia citricarpa*, is recognized as an important disease in Brazil citrus orchard, leading to major economic losses. Its distribution and epidemiology are poorly known in the Paraná State, especially in the Vale do Ribeira region, while it is well documented in São Paulo. This study aimed the preliminary evaluation of the distribution of *G. citricarpa* in Paraná, for providing data that could improve the measures for CBS control. The morphologic method for diagnosis of *G. citricarpa* was evaluated, as described by Baayen *et al.* (2002), for Brazilian isolates. The identity and genetic diversity of *G. citricarpa* and *G. mangiferae* isolates were also investigated, once these species are often confused, due to the fact that *G. mangiferae*, which is a non-pathogenic, is commonly isolated as an endophyte from citrus fruits and from a wide range of other hosts. To determine the identity and phylogeny of *Phyllosticta* and *Guignardia* species associated with several hosts and from different geographic regions, 453 isolates were analysed (251 from CBS lesions in citrus fruits and 202 isolates from asymptomatic citrus, mango and other hosts leaves). The isolates were subjected to morphological and DNA sequence analysis of the internal transcribed spacer (ITS1, 5.8S, ITS2) region and partial *translation elongation factor 1-alpha* (TEF1) gene sequences, and also by the employment of RAPD markers. Isolates were identified morphologically using Oatmeal Medium (OM) (BAAYEN *et al.*, 2002) and its identification was confirmed through molecular assays. *G. mangiferae* isolates were found colonizing the internal tissues from several hosts and less frequently in CBS fruit lesions. This occurrence seems to be occasional, and *G. citricarpa* should be there also, causing the CBS lesions. This co-existence was also reported by other authors. The *G. mangiferae* complex showed great genetic variability and possibly there are different species among them, not resolved yet. *G. citricarpa*, however, was found only in citrus, from both asymptomatic plant tissues and from CBS lesions. These isolates presented low genetic variability, which suggests high pathogen-host specificity. A new species of *Phyllosticta*, morphologically similar to *G. mangiferae*, was found colonizing *Mangifera indica* plants from São Paulo and Paraná. The morphological marker (yellow halo in OM) was useful to identify *G. citricarpa*, however not quite informative, since false-negatives were observed when these results were compared with molecular assays. ITS and TEF1 sequences, along with RAPD markers, safely indicated a distinction among *G. citricarpa*, *G. mangiferae* and the new *Phyllosticta* species present in mango leaves. RAPD markers revealed low variability among *G. citricarpa* isolates, and the sequenced regions were not informative for this species. The isolates did not show genetic similarity correlation to the geographical or host relatedness. These results suggest that the relation between pathogen genotypes and citrus varieties does not exist, neither among different CBS symptoms expression. It was also revealed that the same genotype was present in São Paulo and in Vale do Ribeira orchards. Then, the measures for CBS control employed in that state could be optimized and applied in the Paraná state. Another relevant result was the presence of *G. citricarpa* in citrus leaves from Paraná's northwest orchards, where the disease was not officially reported.

**Keywords:** *Guignardia citricarpa*, *Guignardia mangiferae*, *Phyllosticta* sp., *Citrus sinensis*, Citrus Black Spot, RAPD, phylogeny, taxonomy.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - SINTOMAS DA MANCHA PRETA EM CITROS CAUSADOS PELO FUNGO <i>Guignardia citricarpa</i> .....	34
FIGURA 2 - ÁREA DE COLETA DAS AMOSTRAS NO ESTADO DO PARANÁ .....	84
FIGURA 3 - ÁREA DE COLETA DAS AMOSTRAS NO ESTADO DE SÃO PAULO .....	85
FIGURA 4 - REGIÃO ITS1-5,8S-ITS2 DO DNA RIBOSSOMAL .....	90
FIGURA 5 - DETALHE DO GENE QUE CODIFICA A REGIÃO $\alpha$ 1 DO FATOR DE ELONGAÇÃO.....	91
FIGURA 6 - ÁRVORE FILOGENÉTICA COLAPSADA OBTIDA COM AS SEQUÊNCIAS ITS1-5.8S-ITS2 DO rDNA E $\alpha$ 1 DO FATOR DE ELONGAÇÃO.....	106
FIGURA 7 - INTRON AUTOCATALÍTICO DO GRUPO I PRESENTE NA PORÇÃO TERMINAL DA REGIÃO 18S DO rDNA NAS LINHAGENS DE <i>Phyllosticta</i> sp. ISOLADAS DE MANGA .....	108
FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA A SUBUNIDADE MENOR DO RNA RIBOSSOMAL .....	108
FIGURA 9 - ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO ASSEXUADA DE <i>Phyllosticta</i> sp. ISOLADAS DE FOLHAS ASSINTOMÁTICAS DE MANGUEIRA .....	111
FIGURA 10 - ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO SEXUADA E ASSEXUADA DE <i>G. mangiferae</i> ISOLADAS DE FOLHAS ASSINTOMÁTICAS DE MANGUEIRA.....	112
FIGURA 11 - ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO ASSEXUADA DE <i>G. mangiferae</i> E <i>G. citricarpa</i> ISOLADAS DE FOLHA DE MANGUEIRA E EM LESÕES DA MPC EM FRUTO DE LARANJEIRA.....	113
FIGURA 12 - ÁRVORE FILOGENÉTICA COLAPSADA DAS LINHAGENS DE <i>G. citricarpa</i> OBTIDA COM A SEQUÊNCIA ITS1-5.8S-ITS2 DO rDNA....	115
FIGURA 13 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE <i>G. citricarpa</i> E <i>G. mangiferae</i> UTILIZANDO O PRIMER DE RAPD OPX11 ( <i>Operon Technologies</i> ®)	117
FIGURA 14 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE <i>G. mangiferae</i> E <i>Phyllosticta</i> sp. UTILIZANDO O PRIMER DE RAPD OPX11 ( <i>Operon Technologies</i> ®)	118
FIGURA 15 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE <i>Phyllosticta</i> sp., <i>G. mangiferae</i> E <i>G. citricarpa</i> UTILIZANDO O PRIMER DE RAPD OPX11 ( <i>Operon Technologies</i> ®) .....	119

FIGURA 16 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE <i>G. citricarpa</i> , <i>G. mangiferae</i> E <i>Phyllosticta</i> sp. UTILIZANDO O PRIMER DE RAPD OPX11 (Operon Technologies®) .....	120
FIGURA 17 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE AS LINHAGENS DE <i>G. citricarpa</i> .....	122
FIGURA 18 - IDENTIFICAÇÃO DE <i>G. citricarpa</i> , <i>G. mangiferae</i> E <i>Phyllosticta spinarum</i> PELO MARCADOR MORFOLÓGICO MEIO ÁGAR-AVEIA .	132
FIGURA 19 - ISOLADOS DE <i>G. citricarpa</i> COM RESULTADO FALSO-NEGATIVO PARA O MARCADOR MORFOLÓGICO MEIO ÁGAR-AVEIA.....	134
FIGURA 20 - ISOLADOS IDENTIFICADOS PELO MARCADOR MORFOLÓGICO MEIO ÁGAR- AVEIA E RATIFICADOS POR MARCADORES MOLECULARES .....	135
FIGURA 21 - FÓRMULA UTILIZADA PARA O CÁLCULO DO VALOR PREDITIVO PARA <i>G. citricarpa</i> E PARA <i>G. mangiferae</i> .....	136

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - LINHAGENS DE <i>Guignardia</i> spp. ISOLADAS EM FOLHAS E FRUTOS DE DIVERSOS HOSPEDEIROS E LOCALIDADES .....	70
QUADRO 2 - LINHAGENS DE <i>Guignardia</i> spp. ISOLADAS DE LESÃO EM FRUTOS CÍTRICOS NO ESTADO DE SÃO PAULO.....	72
QUADRO 3 - LINHAGENS DE <i>Guignardia</i> spp. ISOLADAS DE LESÃO EM FRUTOS CÍTRICOS NO ESTADO DO PARANÁ .....	74
QUADRO 4 - LINHAGENS DE <i>Guignardia</i> spp. ISOLADAS EM FOLHAS DE CITROS E MANGA NOS ESTADOS DE SÃO PAULO E PARANÁ.....	75
QUADRO 5 - REGIÕES GEOGRÁFICAS DE COLETA, HOSPEDEIROS E NÚMERO DE FRAGMENTOS FOLIARES DOS ISOLAMENTOS I, II, III E IV .....	82
QUADRO 6 - REGIÕES GEOGRÁFICAS DE COLETA, HOSPEDEIROS E NÚMERO DE FRAGMENTOS FOLIARES DOS ISOLAMENTOS V, VI E VII .....	83
QUADRO 7 - SEQUÊNCIAS DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO E NO SEQUENCIAMENTO DAS REGIÕES ITS1-5,8S-ITS2 DO rDNA E $\alpha 1$ DO FATOR DE ELONGAÇÃO .....	89
QUADRO 8 - SEQUÊNCIAS DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NO RAPD.....	94
QUADRO 9 - HOSPEDEIRO, PROCEDÊNCIA E SINTOMA DOS ISOLADOS OBTIDOS NO ESTADO DE SÃO PAULO.....	130

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - EXPORTAÇÕES DE SUCO CONCENTRADO DE LARANJA (FCOJ) – BRASIL SAFRA 2007/2008.....	26
TABELA 2 - PRINCIPAIS ESTADOS BRASILEIROS PRODUTORES DE LARANJA .....	27
TABELA 3 - HOSPEDEIRO, NÚMERO E FREQUÊNCIA ESTIMADA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO GÊNERO <i>Phyllosticta</i> OBTIDO NO ISOLAMENTO I .....	97
TABELA 4 - IDENTIFICAÇÃO DA PLANTA E FREQUÊNCIA DE ISOLAMENTO DE <i>Phyllosticta</i> spp. A PARTIR DE FOLHAS DE TANGERINEIRA “PONKAN” COM OU SEM SINTOMAS APARENTES DA MPC .....	98
TABELA 5 - FREQUÊNCIA DE ISOLADOS DE <i>Guignardia citricarpa</i> E <i>G. mangiferae</i> OBTIDOS DE FOLHAS DE TANGERINEIRA “PONKAN” COM E SEM SINTOMAS APARENTES DA MPC.....	99
TABELA 6 - FREQUÊNCIA DE ISOLADOS DE <i>Guignardia citricarpa</i> E <i>G. mangiferae</i> OBTIDOS DE FOLHAS DE LARANJEIRA COM E SEM SINTOMAS APARENTES DA MPC .....	100
TABELA 7 - HOSPEDEIRO, NÚMERO E FREQUÊNCIA ESTIMADA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO GÊNERO <i>Phyllosticta</i> OBTIDO NO ISOLAMENTO IV.....	101
TABELA 8 - NÚMERO E FREQUÊNCIA ESTIMADA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO GÊNERO <i>Phyllosticta</i> OBTIDO NO ISOLAMENTO V.....	102
TABELA 9 - NÚMERO E FREQUÊNCIA ESTIMADA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO GÊNERO <i>Phyllosticta</i> OBTIDO NO ISOLAMENTO VI.....	103
TABELA 10 - NÚMERO E FREQUÊNCIA ESTIMADA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO GÊNERO <i>Phyllosticta</i> OBTIDO NO ISOLAMENTO VII.....	103
TABELA 11 – FREQUÊNCIAS DE COLONIZAÇÃO DE <i>Phyllosticta</i> sp. E <i>Guignardia</i> spp. EM DIFERENTES HOSPEDEIROS E LOCALIDADES .....	104
TABELA 12 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA MOLECULAR (AMOVA) DOS MARCADORES RAPD PARA <i>G. citricarpa</i> CONSIDERANDO 7 CARACTERÍSTICAS DISTINTAS .....	127
TABELA 13 - FREQUÊNCIA DE <i>Guignardia</i> spp. E <i>Phyllosticta</i> sp. IDENTIFICADAS PELO MARCADOR MORFOLÓGICO MEIO ÁGAR-AVEIA.....	133
TABELA 14 - FREQUÊNCIA DE <i>G. citricarpa</i> , <i>G. mangiferae</i> E <i>Phyllosticta</i> sp. IDENTIFICADAS POR MARCADORES MOLECULARES.....	133

TABELA 15 - FREQUÊNCIA DE <i>G. citricarpa</i> , <i>G. mangiferae</i> E <i>Phyllosticta</i> sp. EM RELAÇÃO À PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE HALO .....	135
TABELA 16 - FREQUÊNCIA DE ISOLAMENTO DE <i>G. citricarpa</i> , <i>G. mangiferae</i> E <i>Phyllosticta</i> sp. DE FOLHAS ASSINTOMÁTICAS E FRUTOS COM SINTOMAS DA MPC.....	137

## LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE 1 - NATUREZA E FREQUÊNCIA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DO GÊNERO <i>Phyllosticta</i> OBTIDOS NO ISOLAMENTO II .....	167
APÊNDICE 2 - NATUREZA E FREQUÊNCIA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DO GÊNERO <i>Phyllosticta</i> OBTIDOS NO ISOLAMENTO III .....	169
APÊNDICE 3 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DETALHADA OBTIDA COM AS SEQUÊNCIAS ITS1-5.8S-ITS2 DO rDNA E $\alpha 1$ DO FATOR DE ELONGAÇÃO.....	170
APÊNDICE 4 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DETALHADA DAS LINHAGENS DE <i>G. citricarpa</i> OBTIDA COM A SEQUÊNCIA ITS1-5.8S-ITS2 DO rDNA .....	173
APÊNDICE 5 - IDENTIFICAÇÃO POR PCR <i>MULTIPLEX</i> , RAPD, MARCADOR MORFOLÓGICO (HALO), HOSPEDEIRO E ORIGEM DOS ISOLADOS DE <i>Guignardia</i> spp. E <i>Phyllosticta</i> spp.....	175
APÊNDICE 6 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA MOLECULAR (AMOVA) DOS MARCADORES RAPD PARA <i>G. citricarpa</i> CONSIDERANDO 7 CARACTERÍSTICAS DISTINTAS.....	196

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE AS LINHAGENS DE <i>Guignardia</i> spp. E <i>Phyllosticta</i> sp. ....	201
ANEXO 2 - NOMENCLATURA DOS ISOLADOS DE <i>Guignardia</i> spp. E <i>Phyllosticta</i> sp. UTILIZADA EM PUBLICAÇÕES .....	206



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>19</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
2.1 OBJETIVOS GERAIS .....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>25</b>
3.1 A CITRICULTURA NO BRASIL .....	25
3.2 MANCHA PRETA DOS CITROS .....	29
3.3 FUNGOS ENDOFÍTICOS .....	36
3.4 O GÊNERO <i>GUIGNARDIA</i> VIALA E RAVAZ (ANAMORFO: <i>PHYLLOSTICTA</i> PERS. EX DESM.) .....	39
3.5 FILOGENIA MOLECULAR .....	45
3.6 MARCADORES MOLECULARES .....	48
3.6.1 Marcadores RAPD .....	52
3.6.2 Sequenciamento das regiões ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA e $\alpha 1$ do Fator de Elongação da Tradução na identificação e filogenia molecular de fungos .....	59
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>70</b>
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO .....	70
4.2 MEIOS DE CULTURA .....	77
4.2.1 Meio Ágar-Água (AA) acrescido de 3% de MC (item 4.2.5) .....	77
4.2.2 Meio Ágar de Batata e Dextrose (BDA) .....	77
4.2.3 Meio Ágar-Aveia (OA) de Hoekstra e Aptroot (1988) .....	78
4.2.4 Meio Ágar-Citros .....	78
4.2.5 Meio Completo (MC) de Pontecorvo <i>et al.</i> (1953), modificado por Azevedo e Costa (1973) .....	79
4.2.6 Meio Ágar-Manga .....	79
4.3 SOLUÇÕES E REAGENTES .....	80
4.3.1 Fenol Saturado .....	80
4.3.2 Solução de vitaminas .....	80
4.4 ISOLAMENTO .....	81
4.5 OBTENÇÃO DE COLÔNIAS MONOSPÓRICAS .....	87
4.6 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA .....	87
4.7 CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	88
4.8 EXTRAÇÃO DE DNA .....	88
4.9 SEQUENCIAMENTO DAS REGIÕES ITS1-5,8S-ITS2 DO rDNA E $\alpha 1$ DO FATOR DE ELONGAÇÃO .....	89
4.9.1 Amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal .....	89
4.9.2 Amplificação da região $\alpha 1$ do Fator de Elongação .....	90
4.9.3 Purificação do DNA .....	91
4.9.4 Reação de Sequenciamento .....	92
4.9.5 Purificação da Reação de Sequenciamento .....	92
4.9.6 Edição e Análise das Sequências .....	93
4.9.7 Análise Filogenética .....	94
4.10 VARIABILIDADE GENÉTICA .....	94
4.10.1 RAPD .....	94
4.10.1.1 Amplificação do DNA .....	94
4.10.1.2 Análise da Variabilidade Genética .....	95

4.11 IDENTIFICAÇÃO POR MARCADOR MORFOLÓGICO .....	96
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>97</b>
5.1 ISOLAMENTO .....	97
5.2 ANÁLISE TAXONÔMICA E DE DIVERSIDADE GENÉTICA .....	105
5.2.1 Sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA e do EF- $\alpha$ 1 .....	105
5.2.2 Marcadores RAPD .....	115
5.3 IDENTIFICAÇÃO POR MARCADOR MORFOLÓGICO .....	132
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>141</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>167</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>200</b>

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O Brasil é responsável por aproximadamente um terço da produção mundial de laranja e pelo controle de 85% do mercado internacional de suco da fruta, representando uma das principais atividades do agronegócio brasileiro (CULTIVAR, 2008). O sistema agroindustrial da laranja no Brasil atende cerca de 50% da demanda e 75% das transações internacionais, trazendo anualmente mais de US\$1 bilhão em créditos de exportação para o Brasil e PIB equivalente a US\$5 bilhões de dólares (ABECITRUS, 2009).

O consumo da laranja vem aumentando gradativamente, principalmente com a abertura de novos mercados na Ásia, que demandam o aumento da produção do fruto para suco, bem como para consumo *in natura*. Em relação à comercialização de frutas cítricas frescas, o Brasil produz na entressafra europeia e possui um vasto mercado interno para ser explorado (ABECITRUS, 2002). As principais áreas produtoras estão localizadas nos Estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina, “Rio” Grande do Sul, “Rio” de Janeiro, Minas Gerais, Bahia e Sergipe (ABECITRUS, 2008). O Estado de São Paulo é o principal produtor, concentrando 81% da produção nacional de citros.

O Estado do Paraná ocupa o quinto lugar no *ranking*, destacando-se no levantamento realizado pelo IBGE-2007 (2009), após um crescimento de 23,2 % na produção de citros, em relação ao seu último registro. Em 2006 foram cultivados 28,4 mil hectares de citros, proporcionando a colheita de 619,1 mil toneladas e gerando o valor bruto da produção de R\$ 170 milhões (SEAB, 2008). Atualmente, a área plantada abrange 36 mil hectares. A citricultura paranaense alcança grande importância socioeconômica, constituindo-se na principal atividade de milhares de produtores. As regiões Norte e Noroeste do Estado, com forte subsídio financeiro, concentram-se na produção de laranjas que são exportadas para diversos estados brasileiros e para países da Comunidade Europeia. Já a região do Alto Ribeira, com predomínio do cultivo de tangerina, apresenta características bem contrastantes, com predomínio de um sistema de produção em pequenas áreas, mão de obra familiar e baixa produtividade.

Apesar da grande importância social e econômica, a citricultura resente-se de vários problemas fitossanitários, dentre os quais a Mancha Preta dos Citros

(MPC), que vem causando enormes prejuízos a produção. Os principais sintomas apresentados por essa doença são as lesões no fruto, que o depreciam para o mercado de frutas *in natura*, o amadurecimento precoce e a queda acentuada (BALDASSARI; WICKERT; GOES, 2008). Em um estudo desenvolvido pela Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, entre 1995 e 1997, sobre a incidência e distribuição da doença, foi divulgado que a área destinada à produção de citros era de 925.974,4 hectares (em torno de 247 milhões de plantas) e mais de 35% estavam infectados (em torno de 88,47 milhões de plantas) (CULTIVAR, 2007). Desta forma, o não controle da doença em áreas com alta pressão de inóculo, ocasiona prejuízos que podem chegar a 80%, devido à queda prematura dos frutos.

Apesar de ser uma doença já conhecida no Estado de São Paulo há mais de 10 anos, ainda não se conhece a sua distribuição e epidemiologia no Estado do Paraná. Nem tampouco as condições de manejo adequadas para a região do Alto Ribeira, onde a doença já foi detectada. A Mancha Preta dos Citros está afetando não apenas a produção estadual de frutos cítricos, mas comprometendo seriamente a agricultura familiar da região do Vale do Ribeira, que compreende os municípios de menor Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) do Paraná (IPARDES, 2009).

A falta de estudos também pode ser advertida para a região Norte e Noroeste, onde ainda não existem relatos de sintomas em frutos, logo, condições de manejo são especialmente importantes para evitar a disseminação da doença por todas as regiões produtoras. Outro fator relevante para esta doença quarentenária A1 é a objeção à importação de frutos *in natura* pela comunidade Européia, hoje, o nosso maior consumidor neste segmento. Como ainda não há relatos da MPC em seus países membros, são exigentes quanto à qualidade e a fitossanidade, tendo como norma legal, tolerância zero em relação a frutos com sintomas da doença oriundos de outros países, dificultando assim as exportações brasileiras (CULTIVAR, 2005).

Este mercado externo poderia ser ampliado, se as regiões do Paraná fossem consideradas áreas livres da doença. Para tanto, é necessária a realização do levantamento da presença do fungo em plantas nos pomares desta região. Tal levantamento visa gerar informações para subsidiar a criação de áreas livres, e monitorar a presença do fungo, a fim de orientar a adoção de medidas para evitar a disseminação do patógeno para áreas ainda não infectadas, uma vez que o fungo

pode estar presente nos pomares muitos anos antes dos primeiros sintomas aparecerem.

A MPC é causada por linhagens do fungo *Guignardia citricarpa* Kiely (forma anamórfica *Phyllosticta citricarpa* VAN DER AA, 1973). A identificação deste fungo se faz por técnicas convencionais de cultivo e microscopia, culminando em semanas de trabalho. Diversos autores descreveram a existência de uma espécie endofítica (*Guignardia mangiferae*), morfológicamente muito semelhante ao patógeno, convivendo no mesmo hospedeiro, dificultando a identificação de plantas e frutos livres do agente causal da doença (BLANCO, 1999; CHRISTO, 2002; BAAYEN *et al.*, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2004; STRINGARI, 2004). Desta forma, não necessariamente uma planta ou frutos infectados com um fungo morfológicamente semelhante a *G. citricarpa*, está contaminado com o agente causal da MPC. Este fato é de fundamental importância para a citricultura brasileira, principalmente no que diz respeito à exportação de frutos *in natura*, em face das barreiras fitossanitárias impostas pela Comunidade Econômica Européia (BALDASSARI; WICKERT; GOES, 2008). Várias metodologias para diferenciação entre as espécies e identificação de *G. citricarpa* já foram propostas (BAAYEN *et al.*, 2002; GLIENKE-BLANCO *et al.*, 2002; BONANTS *et al.*, 2003; VAN GENT-PELZER *et al.*, 2007). Entretanto, a maioria das técnicas descritas foi realizada com um número reduzido de amostras e não foram testadas com isolados brasileiros. Uma delas é a avaliação da cultura (teste morfológico) quanto à produção de halo amarelo ao redor das colônias de *G. citricarpa*, quando crescidas em meio Ágar-Aveia em determinadas condições. Uma vez que não existem estudos mostrando a magnitude da variabilidade genética utilizando grande número de isolados de *G. citricarpa*, provenientes de diversas regiões e países, tais métodos necessitam ser validados para as condições brasileiras.

Inúmeros estudos baseados em dados moleculares têm fornecido informações para que vários autores revisem e ajustem a classificação de espécies de *Guignardia* e *Phyllosticta* (OKANE, NAKAGIRI e ITO, 2001; GLIENKE-BLANCO *et al.*, 2002; BAAYEN *et al.*, 2002; RODRIGUES, 2004; STRINGARI, 2004). Wulandari *et al.* (2009) descreveram uma nova espécie denominada *Phyllosticta citriasiana*, causando a doença Mancha Tan em frutos de pomelo (*Citrus máxima*) provenientes da Ásia. A Mancha Tan dos Citros (*Citrus Tan Spot*) é idêntica a Mancha Preta dos Citros, mas a espécie *P. citriasiana* não foi observada, até o

momento, no Brasil. Assim, a elucidação taxonômica e filogenética, bem como o estudo da variabilidade genética deste grupo é de extrema relevância, contribuindo para um melhor entendimento da relação entre *G. citricarpa* e as plantas cítricas, visando à implementação de medidas efetivas para o controle da proliferação da MPC no Brasil e, em especial, no Estado do Paraná.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve como objetivo principal realizar um levantamento preliminar da distribuição do fungo *Guignardia citricarpa* nos pomares do Estado do Paraná, contrastando com dados obtidos no Estado de São Paulo, a fim de fornecer subsídios para elaboração de medidas de controle da proliferação da Mancha Preta dos Citros. Este estudo também objetivou validar o método morfológico de diagnóstico para *G. citricarpa*, descrito por Baayen *et al.* (2002), em isolados procedentes do Brasil e analisar a variabilidade genética e filogenética de *G. citricarpa* e *G. mangiferae*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar linhagens endofíticas de *Guignardia* spp. (*Phyllosticta*) de plantas de citros em pomares com alta e baixa incidência da Mancha Preta dos Citros no Estado do Paraná;
- Isolar linhagens endofíticas de *Guignardia* spp. (*Phyllosticta*) de plantas sadias de manga localizadas próximas aos pomares de citros nos Estados do Paraná e São Paulo;
- Validar o teste morfológico meio Ágar-Aveia descrito por Baayen *et al.* (2002), para identificação de *G. citricarpa*;
- Identificar as linhagens isoladas por meio de marcadores RAPD;

- Analisar a estrutura populacional de linhagens de *G. citricarpa* por meio de marcadores RAPD;
- Identificar e analisar filogeneticamente as linhagens de *G. citricarpa* e *G. mangiferae*, através do sequenciamento das regiões ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA e alfa 1 do fator de alongamento da tradução (TEF1).



### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 A CITRICULTURA NO BRASIL

A cultura de citros destaca-se mundialmente como sendo o maior grupo em volume de produção, correspondendo a 20,7% do total da fruticultura mundial, representando 105.431 milhões de toneladas (FAO, 2005). A cadeia de cítricos contempla as frutas *in natura*, a produção de sucos (concentrados, reconstituídos, pasteurizados e frescos), de óleos essenciais e *pellets* de polpa seca – os dois últimos voltados ao uso industrial (Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, 2008).

O expressivo papel da citricultura brasileira tem sido evidenciado pela sua posição de destaque no cenário internacional. Segundo dados da FAO (2006), o País é o maior produtor mundial de citros e laranja, com volume produzido de 20,1 e 17,8 milhões de toneladas, respectivamente, representando 29,7% da produção mundial, ou seja, quase 1/3 do volume total produzido. As exportações de suco concentrado de laranja (*Fcoj*) na safra 2007/2008 representaram um volume de produção de 1.271.634 milhões de toneladas, tendo os mercados NAFTA (EUA, Canadá e México) e União Européia como os de maiores volumes exportados (TABELA 1). Em relação às exportações de laranja *in natura*, o volume registrado da safra 2007/2008 correspondeu a 49.982 toneladas (ABECITRUS, 2009).

TABELA 1 - EXPORTAÇÕES DE SUCO CONCENTRADO DE LARANJA (FCOJ) –  
BRASIL SAFRA 2007/2008

Mês	União Européia	NAFTA	Ásia	Mercosul	Outros	Total
<b>Julho</b>	51.940	8.276	19.574	450	5.538	<b>85.778</b>
<b>Agosto</b>	84.602	21.298	4.752	894	11.188	<b>122.734</b>
<b>Setembro</b>	50.681	7.443	5.707	558	6.856	<b>71.245</b>
<b>Outubro</b>	81.431	42.101	10.092	427	14.280	<b>148.331</b>
<b>Novembro</b>	73.084	23.535	11.001	329	5.762	<b>113.711</b>
<b>Dezembro</b>	49.936	27.246	18.190	671	11.024	<b>107.067</b>
<b>Janeiro</b>	75.116	24.594	4.121	512	10.882	<b>115.225</b>
<b>Fevereiro</b>	67.395	21.423	15.835	301	8.783	<b>113.737</b>
<b>Março</b>	53.942	13.842	4.235	261	14.121	<b>86.401</b>
<b>Abril</b>	68.095	25.194	15.556	254	5.865	<b>114.964</b>
<b>Mai</b>	46.327	22.560	6.238	166	9.445	<b>84.736</b>
<b>Junho</b>	88.982	4.816	5.579	72	8.256	<b>107.705</b>
<b>Total</b>	<b>791.531</b>	<b>242.328</b>	<b>120.880</b>	<b>4.895</b>	<b>112.000</b>	<b>1.271.634</b>

Fonte: SECEX (Secretaria de Comércio Exterior), 2009.

Nota: Volume em toneladas.

Segundo o Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (2008), os principais mercados para o produto são Estados Unidos, Japão, Alemanha, Reino Unido, França e Rússia. A Europa Ocidental representa cerca de 30% do consumo mundial de sucos de frutas, com média de 24 litros por habitante/ano. A maior marca per capita é verificada na Alemanha: 41 litros/ano. No Brasil, a média anual de consumo de suco no país é de 20 litros por habitante, metade da média americana.

Regionalmente, o Estado de São Paulo é o principal produtor, representando 81% do total produzido, enquanto o Paraná corresponde ao quinto lugar (TABELA 2). A área de plantio total no país é de 828.846 ha (IBGE, 2009).

TABELA 2 - PRINCIPAIS ESTADOS BRASILEIROS PRODUTORES DE LARANJA

<b>Estados</b>	<b>Área (ha)</b>	<b>Produção (ton)</b>	<b>Rendimento (ton/ha)</b>
São Paulo	586.837	14.759.067	25,15
Bahia	50.731	923.056	18,20
Minas Gerais	43.592	698.181	16,02
Sergipe	50.422	685.326	13,59
Paraná	15.592	393.668	25,25
<b>Total Brasileiro</b>	<b>828.846</b>	<b>18.530.625</b>	<b>22,36</b>

Fonte: IBGE - Produção Agrícola Municipal (2002).

Segundo o último levantamento do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas (IBGE), a respeito da Produção Agrícola Municipal (PAM) de 2007, o Estado do Paraná cresceu 23,2% na produção de citros em relação ao seu último registro, destacando-se em crescimento dentre as demais unidades da federação. Em 2006 foram cultivados 28,4 mil hectares de citros, proporcionando a colheita de 619,1 mil toneladas e gerando o valor bruto da produção de R\$ 170 milhões (SEAB, 2008). Atualmente, os pomares do Paraná estão distribuídos em uma área de 36 mil hectares, com três indústrias que produzem suco de laranja, duas do sistema cooperativo Cocamar e Corol, e uma de capital privado, formada por citricultores, a Citri.

Para suco industrial estão destinados 30 mil hectares e área colhida de 19 mil hectares, que produziram 11,4 milhões de caixas de 40,8kg. Nesta safra 2008/09, a produção estimada é de 13,7 milhões de caixas, correspondendo a 35,8 mil toneladas de suco concentrado, destinadas a países da União Européia, Oriente Médio, Estados Unidos da América, Canadá e Austrália. A comercialização da produção regional está garantida pela unidade de recebimento de laranja para suco da Corol, de Cornélio Procópio, e da Associação de Produtores Novacitrus em Nova América da Colina, que atua no mercado de fruta fresca (SEAB, 2008).

No Estado do Paraná, a citricultura baseia-se principalmente em plantios de laranjas, tangerinas e lima ácida "Tahiti". As laranjas são produzidas principalmente nas regiões Norte e Noroeste do estado, e as tangerinas na região do Vale do

Ribeira. Nas regiões Norte e Noroeste, devido à presença das agroindústrias de produção de suco concentrado e congelado de laranja, existe um bom nível de organização, uso de tecnologias, bons índices de produtividade e maior uso de agroquímicos. Cerca de 10% da produção se destina ao mercado de frutas frescas, que atende aproximadamente 30% do comércio estadual, e também é exportada para diversos estados brasileiros e, recentemente, para países da União Européia (SEAB, 2008). Este mercado externo poderia ser ampliado, se tal região fosse considerada área livre da presença do fungo *G. citricarpa*.

Diferentemente da região Norte do Paraná, a produção de tangerinas no Vale do Ribeira tem um predomínio de um sistema de produção familiar, caracterizado por baixo nível tecnológico, baixo uso de agroquímicos, pequenas áreas plantadas e baixa produtividade. No Estado de São Paulo, que apresenta alto nível tecnológico, a Mancha Preta dos Citros (MPC), vem causando enormes prejuízos devido à necessidade de pulverizações com fungicidas para seu controle. Este processo onera a produção em cerca de US\$ 0,37 por caixa colhida, o que corresponde entre 10,5 a 13,2%. O não controle da doença, em áreas com alta pressão de inóculo, ocasiona prejuízos que podem chegar a 80%, devido à queda prematura dos frutos (AGRIANUAL, 2005). Estes valores podem ser muito superiores no Vale do Ribeira devido as características da produção nesta região.

A citricultura brasileira apresenta números expressivos que traduzem a grande importância econômica e social da atividade na economia do país, gerando, apenas no Estado de São Paulo, 400 mil empregos diretos e indiretos, sendo a atividade econômica essencial de 322 municípios paulistas e 11 mineiros, representando a maior citricultura do mundo (ABECITRUS, 2007).

Contudo, o setor enfrenta dificuldades específicas, como o agravamento de problemas fitossanitários, os baixos investimentos na reposição de plantios, a concorrência da cultura da cana-de-açúcar e a redução dos tratamentos culturais. A exemplo disto, atualmente, apenas 1% das laranjas colhidas no país são exportadas *in natura* (Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, 2008).

### 3.2 MANCHA PRETA DOS CITROS

Apesar das cifras resultantes da exportação de frutas *in natura* acercarem 23 milhões de dólares, o que demonstra sua grande importância para a economia, os problemas fitossanitários, e em especial a Mancha Preta dos Citros, acabam prejudicando o setor da citricultura. Além de depreciar os frutos para a exportação, a enfermidade pode causar queda prematura nas infecções severas (KOTZÉ, 1981).

Os primeiros relatos da doença foram registrados em 1895, em regiões próximas a Sidney, Austrália, afetando frutos de laranja “Valência” e acarretando perdas na produção e pós-colheita (ROBBS, 1990; ROBBS; BITTENCOURT, 1995; FEICHTENBERGER, 1996). Em consequência da importação de mudas, a doença foi disseminada para a África do Sul, em 1925, e sucessivamente para outras partes do mundo.

Atualmente, a MPC tem ampla distribuição geográfica, afetando a citricultura de regiões subtropicais da África, Ásia, Oceania, América Central, América do Sul e Antilhas (ROBBS; BITTENCOURT, 1995), sendo o Brasil, África do Sul, Japão e Argentina os países que apresentam as maiores perdas com a doença (GOES *et al.*, 2005).

No Brasil, os primeiros relatos da MPC datam entre os anos de 1938 e 1940 (AVERNA-SACCÁ, 1940), em frutos colhidos em uma feira livre no município de Piracicaba, no Estado de São Paulo. Por várias décadas a doença permaneceu esquecida, reaparecendo no início da década de 80, quando foi relatada no Estado do Rio de Janeiro, causando perdas consideráveis em tangerina “Rio”.

Uma década depois, Charles Robbs citado por Goes e Feichtenberger (1993), relatou a presença da MPC em frutos de laranjas “Lima”, “Seleta”, “Folha Murcha”, “Natal”, “Pera” e “Valência”. A partir do ano de 1992 a doença evoluiu geograficamente (GOES; FEICHTENBERGER, 1993), encontrando-se de forma endêmica em mais de quarenta municípios produtores do Estado de São Paulo (BALDASSARI *et al.*, 2001), podendo estar relacionada às condições ambientais favoráveis à multiplicação do fungo, permitindo a sua disseminação em pomares de áreas que não apresentavam a doença (GOES *et al.*, 2005). Em 2001 a doença foi relatada no Estado de Minas Gerais, na região de Guaxupé e, em 2002, no Estado do Espírito Santo (COSTA *et al.*, 2003).

No Estado do Paraná, a MPC foi relatada a partir de 2004, no município de Cerro Azul, Região do Vale do Ribeira, em amostras de tangerina “Montenegrina”, causando grandes prejuízos aos produtores (NUNES *et al.*, 2006). Na região Norte e Noroeste, onde as condições econômicas dos produtores são mais favoráveis, ainda não existem relatos confirmados da doença. Devido à fácil disseminação através do vento ou por meio de material de propagação vegetativa, a MPC tende, cada vez mais, atingir os municípios produtores (GOES *et al.*, 2005).

A Mancha Preta dos Citros (MPC), “pinta preta”, ou ainda *Citrus Black Spot* (CBS), é uma doença causada pelo fungo *Guignardia citricarpa* Kiely, que causa lesões em plantas e, principalmente, em frutos cítricos. Afeta todas as variedades de laranja doces (*Citrus sinensis*), limões (*Citrus limon* e *Citrus limonia*), pomelos (*Citrus maxima*) e algumas variedades de tangerina (*Citrus reticulata*), excluindo-se apenas a laranja azeda (*Citrus aurantium*) e seus híbridos (FEICHTENBERGER, 1996). A lima ácida “Tahiti” (*Citrus latifolia*) não apresenta sintomas da doença, mesmo em pomares com alta incidência. A razão dessa insensibilidade ainda é desconhecida (BALDASSARI; WICKERT; GOES, 2008).

O ciclo da doença 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 a 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 suscetíveis que se formam após as floradas. Já os ascósporos são responsáveis pela disseminação a 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 suscetíveis (ROBBS, 1990).

O aparecimento dos sintomas nos frutos é favorecido pela intensa radiação solar e pelas altas temperaturas. Por outro lado, a disseminação do patógeno também está atrelada ao manejo da cultura e ao tráfego intenso de veículos carregando frutas sem a devida desinfecção (FEICHTENBERGER, 1996). Assim, as diferentes manifestações dos sintomas, provavelmente, estão associadas à suscetibilidade do tecido no momento da infecção e às condições prevalentes durante e após a infecção (FEICHTENBERGER; SPÓSITO, 2004).

O controle da MPC inclui basicamente a eliminação de plantas e frutos afetados e a proteção de pomares sadios para supressão da doença. A erradicação dos frutos afetados (temporões ou tardios) antes da florada justifica-se, pois suprime a principal fonte de inóculo, apresentada pelos picnídios. Segundo Robbs e Bittencourt (1995), a remoção de folhas caídas que podem abrigar pseudotécios, não apresentou grandes resultados.

A utilização de fungicidas como controle da doença, além de antieconômica, não exerce eficácia. Porém, faz-se necessária quando a doença ataca de forma severa, e principalmente, quando a produção destina-se ao consumo da fruta fresca. Os fungicidas mais utilizados são os benzimidazóis e os carbamatos (SPÓSITO, 1999). O principal problema do emprego sucessivo de fungicidas é a seleção de linhagens resistentes do agente causal, como observado na África do Sul (HERBERT; GRECH, 1985).

Os frutos infectados pela MPC tornam-se comercialmente depreciados devido à presença de lesões nas cascas, prejudicando a aparência e inviabilizando a comercialização. Os prejuízos também podem ser observados com a queda prematura dos frutos, quando as lesões ocorrem próximo ao pedúnculo, limitando seriamente a citricultura em vários Estados brasileiros.

Uma característica bastante preocupante sobre a mancha preta é a demora no surgimento dos sintomas, tornando imprescindível detectar a presença do fungo no pomar o quanto antes possível. Essa necessidade ocorre, pois o pomar pode estar todo infectado e não apresentar nenhum sintoma. Quando os mesmos começarem a surgir, poderá ser tarde para se obter um resultado eficaz no combate e controle da doença. Atualmente, no Brasil, diversos produtores vêm identificando a presença dos esporos do fungo causador da MPC por meio da coleta de partículas suspensas nos pomares, as quais são sopradas em um disco e depois analisadas com o auxílio de um microscópio (CULTIVAR, 2007).

O longo período de incubação da doença, do momento em que os esporos atingem concentrações perigosas no pomar, até a manifestação dos sintomas, torna indispensável sua detecção tão logo quanto possível, permitindo ao produtor aplicar quantidades menores de fungicidas, reduzindo o custo de produção e os efeitos nocivos ao meio ambiente, pelo excesso de produtos químicos.

A MPC expressa os sintomas principalmente nos frutos maduros, e muitas vezes pós-colheita ou durante o armazenamento e transporte (FEICHTENBERGER,

1996). O não aparecimento desses sintomas pode acarretar a erros de diagnóstico, o que faz o fruto passar como assintomático no *packing house*. Caso seja detectado algum fruto com a doença na inspeção no porto de destino, todo o lote é indeferido (GOES *et al.*, 2005; BALDASSARI *et al.*, 2007; FISCHER *et al.*, 2008). Assim, é necessária a elucidação de todo o processo de latência, a fim de estabelecer medidas para o controle do patógeno, e conseqüente proteção dos frutos. As lesões nos frutos normalmente são circulares, com poucos centímetros de diâmetro, e não se estendem além do flavedo (epicarpo). Essas lesões, em particular, são encontradas apenas em frutos maduros ou podem se desenvolver na pós-colheita. Outros tipos de sintomas podem se expressar mais precocemente.

Segundo a literatura, *G. citricarpa* é responsável pelo aparecimento de quatro tipos de sintomas: mancha dura, falsa melanose, mancha sardenta e mancha virulenta (FEICHTENBERGER, 1996). No Brasil, Goes (2005) descreveu mais dois tipos de sintomas: a mancha rendilhada e a mancha trincada (FIGURA 1).

Os sintomas do tipo mancha dura (*hard spots*) são os mais comuns e típicos da doença (FIGURA 1A), aparecendo geralmente quando os frutos iniciam a maturação, antes que atinjam a cor amarela ou laranja. Quando presente em frutos maduros, um halo verde surge ao redor das lesões (FIGURA 1B), e no seu interior aparecem pequenas pontuações negras, que correspondem aos picnídios (FIGURA 1C e 1D). Os sintomas também podem aparecer após a colheita, durante o transporte, e no armazenamento dos frutos. No campo estas lesões são mais freqüentes na face da planta em que há maior incidência dos raios solares.

As lesões do tipo mancha sardenta (*freckle spots*) geralmente aparecem após a maturação dos frutos, quando estes já passaram da coloração verde para amarela ou laranja. As lesões são levemente deprimidas e de coloração avermelhada (FIGURA 1E e 1F).

Os sintomas do tipo mancha virulenta (*virulent spots*) geralmente se desenvolvem no final da safra, quando os frutos estão maduros e as temperaturas elevadas, podendo ainda manifestar-se após a colheita. As lesões podem aparecer como resultado do crescimento ou coalescência de lesões do tipo mancha dura ou mancha sardenta, originando grandes lesões (FIGURA 1G). No centro dessas lesões também aparecem pontuações escuras, que correspondem aos picnídios. A casca do fruto na área da lesão fica completamente necrosada, mas a parte interna do fruto permanece intacta, e própria para o consumo (FIGURA 1H).



A falsa melanose normalmente aparece após o fruto ter ultrapassado o período de suscetibilidade. Segundo McOnie (1964b), este período pode durar de quatro a cinco meses, nas condições da África do Sul. Estas lesões são minúsculas, numerosas e de coloração negra (FIGURA 1 I e J), assemelhando-se às produzidas pelo agente causal da melanose, o fungo *Diaporthe citri* (*Phomopsis citri*). A principal diferença é que as lesões da falsa melanose não são ásperas, como as da melanose.

A mancha rendilhada é caracterizada por lesões superficiais, de bordos bem definidos, de coloração laranja e centro amarelo-marrom, podendo tomar grandes áreas da superfície do fruto. Esse tipo de sintoma geralmente não apresenta corpos de frutificação nas lesões e pode ser expresso mesmo em frutos ainda verdes (FIGURA 1K).

A mancha trincada possui aspecto ligeiramente saliente e superficial sendo variável em tamanho (FIGURA 1L). A aparência trincada aparece com a maturação do fruto (FIGURA 1M), e essas lesões geralmente estão associadas ao ácaro da falsa ferrugem (*Phyllocoptruta oleivora*) (FIGURA 1N).

Os sintomas em folhas e em ramos são pouco freqüentes, mas quando presentes assemelham-se às lesões do tipo mancha dura, com centro deprimido e os bordos salientes escuros (FIGURA 1O).

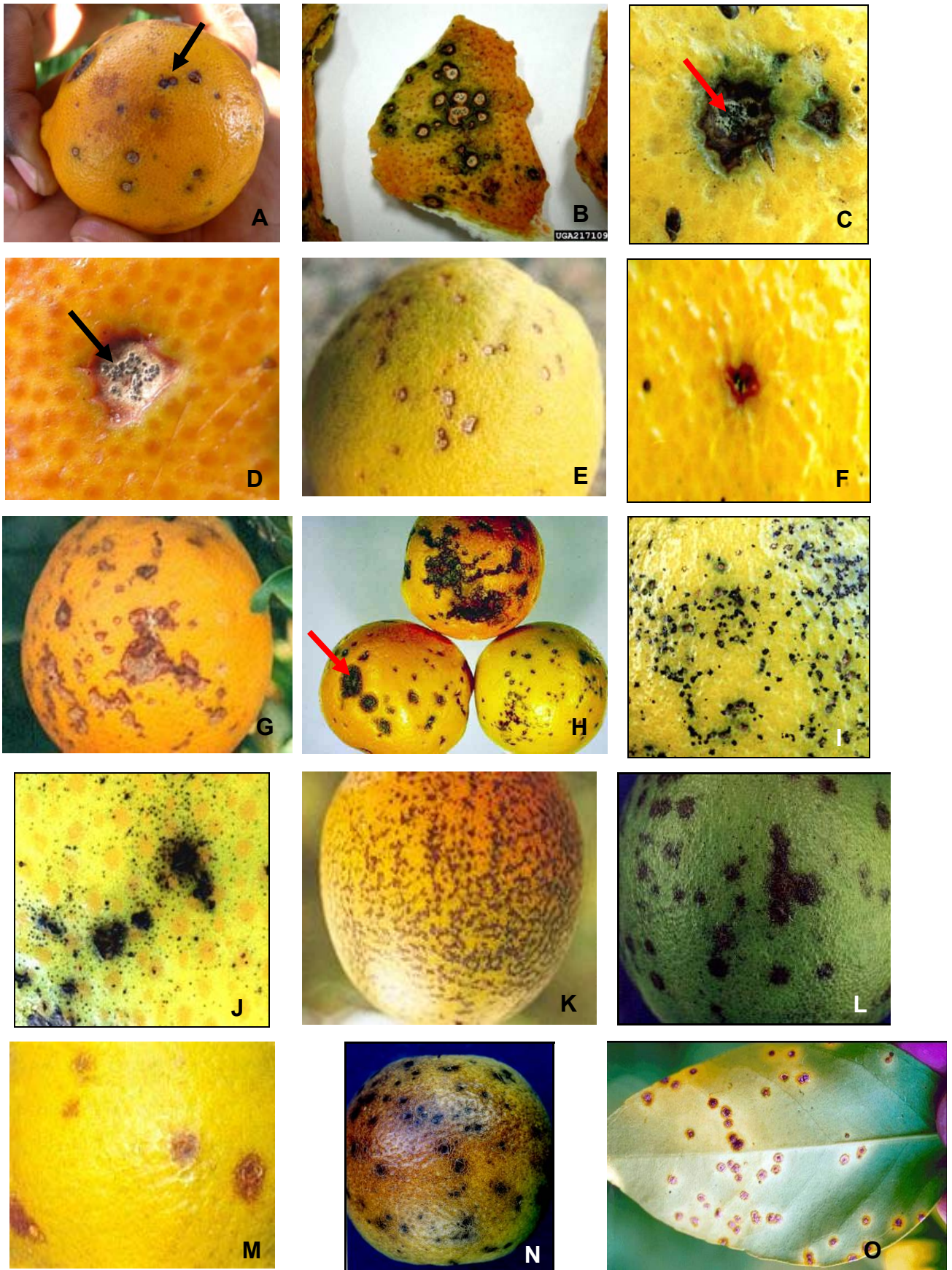


FIGURA 1 - SINTOMAS DA MANCHA PRETA EM CITROS CAUSADOS PELO FUNGO *Guignardia citricarpa*

FONTE: FUNDECITRUS (2002); Toda Fruta (2007); The British Society for Plant Pathology (2009); NSW Department of Primary Industries (2009) e Invasive (2009).

- A:** lesões típicas da mancha preta.
- B:** halo verde ao redor das lesões da mancha preta em fruto maduro.
- C:** picnídios no interior da lesão da mancha preta em fruto maduro.
- D:** detalhe dos picnídios de *G. citricarpa* em fruto.
- E:** mancha sardenta com lesões levemente deprimidas.
- F:** detalhe da mancha sardenta com coloração avermelhada.
- G:** mancha virulenta apresentando grandes lesões.
- H:** mancha virulenta com a casca necrosada na área da lesão. Seta indicando picnídios no seu interior.
- I e J:** false melanose com lesões minúsculas, numerosas e de coloração negra.
- K:** mancha rendinhada com bordos bem definidos de coloração laranja e centro amarelo-marrom.
- L:** mancha trincada em frutos verdes.
- M:** aparência trincada em frutos maduros.
- N:** mancha trincada associada ao ácaro da falsa ferrugem (*Phyllocoptruta oleivora*).
- O:** sintomas em folhas com centro deprimido e os bordos salientes escuros.

No Brasil, todos os tipos de sintomas até então descritos, ocorrem em maior ou menor intensidade, nas diversas espécies de plantas cítricas (FUNDECITRUS, 2002). Com exceção da mancha virulenta, que normalmente ocorre nas fases de pós-colheita e está condicionada à coalescência de diferentes tipos de lesões, não há na literatura, informações quanto aos fatores envolvidos na expressão dos diferentes tipos de sintomas produzidos. Embora tanto os picnidiósporos como os ascósporos possam produzir sintomas, não existem relatos se os sintomas produzidos estão relacionados à fonte de inóculo. Tampouco se sabe sobre a influência do ambiente na expressão dos diferentes tipos de sintomas. Também, não se sabe se esses diferentes tipos de sintomas estão relacionados à idade dos frutos, por ocasião da sua infecção.

Apesar dos mecanismos envolvidos na formação das infecções não estarem bem esclarecidos, sabe-se que os sintomas mais severos da doença estão associados à exposição dos frutos a maior luminosidade, à elevação da temperatura durante a maturação (20 a 24 °C), e a frutos originados de árvores estressadas, velhas e debilitadas (KOTZÉ, 1981).

Recentemente, Paul *et al.* (2005) desenvolveram um modelo climático para avaliar o risco da MPC se espalhar por regiões do mundo onde a doença não ocorre. Sabe-se que a MPC está difundida globalmente, mas encontra-se ausente em países da União Européia, a qual apresenta barreiras ao comércio da fruta de citros para restringir a possível introdução do patógeno *G. citricarpa*. O objetivo deste estudo foi avaliar a suscetibilidade do clima europeu para o estabelecimento do

patógeno e a persistência da doença. Os autores utilizaram o modelo de CLIMEX, que permite a predição da distribuição geográfica potencial de uma espécie, a partir de sua distribuição atual observada. As exigências climáticas da MPC levam a crer que a origem da distribuição seja a África do Sul e a Austrália, com posterior distribuição do patógeno para o mundo, excetuando-se as regiões da Europa. Segundo este modelo, o clima fornece uma barreira ao estabelecimento da doença nesta região. Os autores produziram, ainda, um mapa global indicando as localidades onde o clima seria favorável para o estabelecimento do patógeno. A distribuição potencial da MPC foi limitada principalmente às condições frias.

### 3.3 FUNGOS ENDOFÍTICOS

Tradicionalmente, a presença de fungos na parte aérea de plantas era associada a evidentes sintomas, seguidos pelo declínio do tecido vegetal. Nos últimos anos, entretanto, a ocorrência de fungos em folhas assintomáticas tem sido repetidamente relatada, sugerindo que estes microrganismos podem colonizar órgãos de plantas sem causar aparentes sintomas de doença. Tais microrganismos receberam a denominação de fungos endofíticos ou endófitos.

O termo endófito foi utilizado inicialmente por Bary em 1866, citado por Stone (1988), e foi aplicado à flora microbiana interna dos tecidos vegetais, em casos de infecções assintomáticas ou não, e nos casos de interações antagonísticas ou simbióticas. Entretanto, Carroll (1988) restringiu o uso do termo endofítico somente para organismos que causam colonizações assintomáticas no hospedeiro, excluindo, desta forma, os organismos patogênicos e mutualísticos. Com o aumento de investigações na área e com as descobertas de diferentes aspectos da interação dos fungos com os seus hospedeiros, Petrini (1991) propôs para o termo endófito uma maior abrangência a fim de incluir todos os microrganismos que habitam a parte aérea das plantas, sendo capazes de colonizar, em alguma fase de seu ciclo de vida, os tecidos internos dos vegetais sem causar dano aparente.

A presença dos microrganismos endofíticos no tecido vegetal pode ser evidenciada por análise microscópica ou através de isolamento em meios de cultivo. Em todas as espécies vegetais, estudadas por Petrini (1986), foram encontrados

fungos endofíticos, levando-o a sugerir que todas as plantas podem, potencialmente, ser hospedeiras destes microrganismos.

De acordo com Bernstein e Carroll (1977), a colonização interna de folhas pode ser originada pela infecção sistêmica de sementes e pecíolos; por micélios de fungos epifíticos que entram na planta por aberturas naturais como raízes, estômatos e hidatódios; ou ainda, o microrganismo pode aproveitar-se de feridas existentes no hospedeiro, como aquelas deixadas por patógenos e insetos. Outra forma de entrada no hospedeiro seria a ação ativa do endófito, ou seja, estes produziram enzimas ou estruturas que facilitariam a penetração no hospedeiro (AZEVEDO, 1998).

Os mecanismos de infecção dos fungos endofíticos ainda não estão totalmente desvendados, mas inúmeros fatores envolvidos na colonização da planta, provavelmente são similares aos que ocorrem em linhagens patogênicas. A entrada da maioria dos fungos, patogênicos ou não, na planta hospedeira, depende da diferenciação do micélio em estruturas especializadas, denominadas de 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 ação mecânica (HOWARD; FERRARI, 1989; BOURETT; HOWARD, 1990). O tratamento de conídios com inibidores de síntese de melanina, como o Triciclazol® e o Piroquilon®, resulta na produção de apressórios sem pigmento e não funcionais, tornando o fungo incapaz de penetrar na planta hospedeira (WOLOSHUK; SISLER, 1982; BELL; WHEELER, 1986; DEAN, 1997). No sistema *Rhizoctonia-Pseudotsuga*, a infecção ocorre externamente pela formação de apressório pelo fungo (SHERWOOD-PIKE; STONE; CARROLL, 1986).

Uma vez dentro do hospedeiro, ocorre a colonização da planta pelo endófito. Segundo White Jr. e Cole (1985) e Carroll (1988), em gramíneas (como no caso de *Acremonium* sp. em *Festuca* sp.) os endófitos geram uma infecção sistêmica, sendo transmitidos de uma geração para outra, geralmente por meio das sementes dos hospedeiros, não necessitando, portanto, esporular (CLAY, 1987). Tais fungos são denominados por Carroll (1988), de mutualistas obrigatórios (constitutivos). Entretanto, na maioria das plantas os endófitos mutualistas facultativos (que segundo Carroll não são transmitidos via semente), propagam-se aparentemente,

por meio de esporos, sendo dispersos principalmente pela chuva e correntes de ar, podendo também ocorrer através de propágulos vegetativos de alguns hospedeiros. Estes fungos possuem uma associação muito menor com o hospedeiro quando comparados aos mutualistas constitutivos, geralmente vivendo em tecidos senescentes ou metabolicamente inativos, tais como o córtex ou epiderme, e colonizando tecidos vitais somente quando o hospedeiro é ferido ou estressado por ataques de insetos ou patógenos (CARROLL, 1988; McCUTCHEON; CARROLL; SCHWAB, 1993).

Embora as interações entre vegetais e endófitos, na maioria dos casos ainda não sejam bem esclarecidas, já tem sido verificado que os endófitos apresentam uma relação mutualística, antagonística ou neutra com o hospedeiro. Em alguns casos foram encontradas interações que levam a um melhor desempenho das plantas (CLAY, 1987), como aumento de área foliar e maior número de ramificações (LATCH e CHRISTENSEN, 1985); maior tolerância ao ataque de insetos (CARROLL; CARROLL, 1978; CLAY, 1987; CLEMENTE *et al.*, 1990; CARROLL, 1988; AZEVEDO *et al.*, 2000); resistência a doenças e parasitas (WHITE Jr.; COLE, 1985; WHITE Jr.; COLE, 1986; CLARK; MILLER; WHITNEY, 1989; CALHOUN *et al.*, 1992); resistência a nematódeos (WILSON; CLEMENTE; KAISER, 1991); e antiherbivoria pela produção de toxinas (WHITE Jr.; COLE, 1985).

Os fungos endofíticos são considerados de grande importância para a humanidade, pois representam uma fonte potencial de novos compostos químicos e biológicos, podendo ser utilizados não somente para resolver e auxiliar problemas de saúde humana, mas também para plantas e animais (STROBEL, 2002; STROBEL, 2003). Alguns fungos endofíticos têm sido amplamente estudados devido à sua ação antimicrobiana. Segundo Ezra e Strobel (2003), o fungo *Muscodora albus* inibe e mata espécies de fungos e bactérias por emissão de compostos orgânicos voláteis. O mesmo foi relatado para o fungo *Gliocladium* sp. (STINSON *et al.*, 2003), e para diversos fungos endofíticos isolados de espécies de *Garcinia* (PHONGPAICHIT *et al.*, 2006).

### 3.4 O GÊNERO *Guignardia* VIALA E RAVAZ (ANAMORFO: *Phyllosticta* PERS. EX DESM.)

O gênero *Guignardia*, que segundo SIVANESAN (1984), foi descrito em 1892 por Viala e Ravaz, compreende as formas teleomórficas de espécies de *Phyllosticta* e de alguns outros gêneros relacionados de fungos. O gênero *Phyllosticta*, com mais de 2000 espécies, de acordo com Van Der Aa (1973), compreende os fungos que crescem em folhas, e formam no tecido hospedeiro, pequenos picnídios com conídios hialinos e unicelulares.

O gênero *Phyllosticta* é descrito sempre relacionado com alguns outros gêneros de Sphaeropsidales, que tem também *Guignardia* e *Botryosphaeria* como teleomórficos. Entretanto, estudos filogenéticos recentes de múltiplos genes, indicaram que *Phyllosticta* é o único gênero anamórfico ligado à *Guignardia* (CROUS *et al.*, 2006; DUONG *et al.*, 2007), sendo ambos monofiléticos em *Botryosphaeriaceae*, *Botryosphaeriales* (CROUS *et al.* 2006; SCHOCH *et al.*, 2006; DUONG *et al.*, 2007). A delimitação de espécies em *Phyllosticta*, porém, ainda é difícil e requer estudos futuros.

A separação de espécies em *Phyllosticta* baseia-se principalmente no hospedeiro. Segundo Van Der Aa (1973), a importância da especificidade do hospedeiro para a taxonomia de fungos em geral e para Sphaeropsidales, tem sido superestimada, pois somente uma fração de fitopatogênicos é realmente hospedeiro específico. Entretanto, experimentos com espécies de *Guignardia*, quase sempre mostram que suas espécies são parasitas específicas para uma espécie ou espécies de um gênero de planta hospedeira (BISSET; PALM, 1989; LEUCHTMANN *et al.*, 1992).

Por outro lado, Kiely (1948) e Schüepp (1961), relataram a presença de espécies de *Phyllosticta*, semelhantes morfologicamente, em plantas não aparentadas, crescendo perto de pomares de *Citrus*, onde estudaram a doença Mancha Preta dos Citros, causada por *Guignardia citricarpa*. Diversos autores, como Carroll e Carroll (1978), Petrini (1986), Leuchtmann *et al.* (1992), Glienke (1995), Rodriguez e Samuels (1999), Penna (2000), Glienke-Blanco *et al.* (2002), Souza *et al.* (2004) e Stringari (2004) isolaram espécies de *Phyllosticta* de material aparentemente sadio, descrevendo-as como endofíticas. No entanto, o maior



número de relatos cita este gênero como fitopatogênico, já tendo sido descrito em diversos hospedeiros, como tomate e abacate (BAKER, 1938), arroz (SUGHA; SINGH; SHARMA, 1986), tabaco (PATEL; PATEL; TILVA, 1988), uva (IBRAHIM; BAYCA, 1989); (JAILLOUX, 1991), cana-de-açúcar (PONS, 1990), eucalipto (CROUS *et al.*, 1993), morango (STILES; OUDEMANS, 1999) e citros (McONIE, 1964a, 1964b, HERBERT; GRECH, 1985, JOHNSTON; FULLERTON, 1988). McMILLAN Jr. (1986), com base em análises morfológicas, também descreveu a presença do fungo *Guignardia citricarpa* causando doença em folhas da manga.

Segundo Sivanesam (1984), *G. citricarpa* é um Ascomiceto, da ordem Dothideales e família Dothideacea. Este fungo possui estroma plectenquimatoso, pseudotécio globoso a subgloboso, medindo 125 a 360  $\mu\text{m}$  de diâmetro contendo um poro de 14 a 16  $\mu\text{m}$ , e paredes espessas com 20 a 22  $\mu\text{m}$ . Seu asco apresenta forma de clava, sendo arredondado e bitunicado na extremidade superior. Seu interior contém oito ascósporos unicelulares, hialinos, ligeiramente cinzentos, rombóides, contendo grânulos e um grande vacúolo central. Os ascósporos são cobertos por um quepe gelatinoso na extremidade, medindo 8 a 17  $\mu\text{m}$  x 3,3 a 8  $\mu\text{m}$ . E ainda, podem ser encontradas pseudoparáfises na extremidade de pseudotécios maduros.

De acordo com Johnston e Fullerton (1988), as formas anamórficas e teleomórficas geralmente são encontradas associadas. As estruturas de frutificação da forma assexuada (*Phyllosticta citricarpa*) são representadas pelos picnídios, que macroscopicamente são pequenos, globosos, pretos e semi-eruptivos. Em corte vertical apresentam 70 a 330  $\mu\text{m}$  de diâmetro, com parede marrom escura e células pseudoparenquimatosas.

Segundo Punithalingam (1982), a colônia cresce lentamente, atingindo diâmetro aproximado de 7 cm em 20 dias, em vários meios de cultura a 20°C. O micélio escuro é submerso, formando uma crosta plectenquimatosa. As células conidiogênicas são cilíndricas, com cerca de 4 a 8  $\mu\text{m}$  x 2 a 3,5  $\mu\text{m}$ . O conídio é unicelular, ovóide, elíptico ou subgloboso, algumas vezes clavado quando jovem, com uma base truncada, contendo gúttulas, com apêndice apical de 5 a 15  $\mu\text{m}$  de comprimento, que segundo Punithalingam (1974) é característico de espécies de *Phyllosticta* e facilmente perdido. O mesmo autor descreve uma membrana gelatinosa recobrendo os conídios, que serve de proteção contra o ressecamento durante a dispersão.



O estado de microconídio (forma espermiócia *Leptodothiorella* de *Phyllosticta*) descrito por Van Der Aa (1973), ocorre tanto em cultura *in vitro* como no hospedeiro, e frequentemente se desenvolve simultaneamente com a fase assexuada do fungo. Possui corpos de frutificação semelhantes aos produzidos na fase conidial. Os microconídios medem 5 a 8 µm por 0,5 a 1 µm e possuem forma de halteres, cilíndricos, ligeiramente curvados e são bigutulados nas extremidades entumecidas. Tanto os conídios como os microconídios podem ser formados simultaneamente na mesma cavidade picnidial, principalmente nos primeiros estágios de desenvolvimento. No entanto, o microconídio não tem qualquer função vegetativa e não germina em meio artificial.

O fungo *G. citricarpa* é pouco estudado geneticamente, sabendo-se apenas que possui, pelo menos, oito cromossomos e genoma de aproximadamente 21,5 Mb (BLANCO, 1999). Apresenta, ainda, alta instabilidade com freqüente formação de setores, e grande dificuldade na obtenção de mutantes auxotróficos, utilizando-se a luz ultravioleta como agente mutagênico (BLANCO, 1999).

Inicialmente, pensava-se que, em citros, *G. citricarpa* poderia ser encontrada na forma de infecção assintomática em plantas sadias, e como patógeno em lesões características da doença Mancha Preta dos Citros (MPC). Porém, 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. Foi constatada a existência de três populações de *G. citricarpa* 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 *primers* capaz de amplificar um fragmento de 370 pb, específico para linhagens patogênicas de *G. citricarpa*, veio a corroborar para a distinção genética entre estes grupos. Hoje se sabe que a forma endofítica pertence à outra espécie, denominada *G. mangiferae* (anamorfo *Phyllosticta capitalensis*). Essas duas formas apresentam padrões distintos quanto à taxa de desenvolvimento vegetativo em meios de cultura, à coloração de colônias e à morfologia dos conídios (BAAYEN *et al.*, 2002).

Christo (2002), dando continuidade aos estudos de Blanco (1999), analisou a variabilidade genética de linhagens endofíticas e patogênicas do fungo *Guignardia* spp. isoladas em diversos países e hospedeiros, através de marcadores RAPD. Este trabalho também relatou a existência de pelo menos três espécies distintas de

*Guignardia*, morfologicamente muito semelhantes, co-existindo em *Citrus* spp.. O autor sugeriu, ainda, que as linhagens isoladas de lesões de MPC pertencem à espécie *G. citricarpa*, enquanto as linhagens endofíticas isoladas de *Citrus* spp. devem pertencer à espécie *G. mangiferae*.

A maioria dos trabalhos clássicos descreve *G. citricarpa* como fitopatogênica (FREAN, 1966; KELLERMAR; KOTZÉ, 1977; TSAI, 1981; ROBBS; BITTENCOURT, 1995). Entretanto, muitas linhagens obtidas de plantas assintomáticas têm sido encontradas em regiões sem o sintoma da doença. Glienke-Blanco *et al.* (2002) isolaram 407 linhagens fúngicas de folhas assintomáticas de três espécies cítricas (laranja, tangerina e tangor), resultando em uma frequência de 81% de infecção. Dos fungos isolados, 27% pertenciam ao gênero *Guignardia*, com 12 isolados identificados morfologicamente como *Guignardia citricarpa* Kiely. A maioria dos isolados produziu ascos maduros, sustentando a hipótese de que eles seriam endofíticos e não patogênicos, logo, seriam identificados como *G. mangiferae*. Os autores não observaram crescimento fúngico em sementes, indicando que este gênero provavelmente não é transmitido por esta via.

Em estudos realizados por Penna (2000), a análise da variabilidade genética de 24 linhagens de *Phyllosticta* sp. por meio de RAPD, também demonstrou a existência de três populações endofíticas distintas colonizando assintomaticamente erva-mate (*Ilex paraguariensis*). Análises morfológicas de uma linhagem de *Phyllosticta*, isolada de Ericaceae, realizadas por Okane, Nakagiri e Ito (2001), permitiram a sua inclusão no gênero *Guignardia* (Anamorfo: *Phyllosticta*). E as análises moleculares da região ITS1 - 5,8S - ITS2, mostraram total identidade com o fungo *Phyllosticta capitalensis*, sugerindo que a espécie do fungo isolada neste trabalho, seja a forma teleomórfica de *P. capitalensis*. Os autores denominaram esta nova espécie de *Guignardia endophyllicola*.

Estudos de populações de *Guignardia citricarpa* (Anamorfo: *Phyllosticta citricarpa*) e *Guignardia* spp., proveniente de diversas regiões e espécies hospedeiras, foram realizados por Baayen *et al.* (2002), através de análises de sequências ITS, marcadores AFLP e características morfológicas. As três metodologias utilizadas revelaram dois grupos principais, filogeneticamente distintos para a espécie *G. citricarpa*, descrita como patógeno de citros. O Grupo I: isolados de lesões da MPC em plantas cítricas e Grupo II: isolados de plantas assintomáticas de diversos hospedeiros. As sequências ITS identificaram o Grupo I como *G.*

*citricarpa* e o Grupo II (linhagens endofíticas), como sendo teleomorfo de *Phyllosticta capitalensis* (*G. mangiferae*) e/ou 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.

Baayen *et al.* (2002) relataram ainda que as linhagens de *G. citricarpa*, quando inoculadas em meio Ágar-Aveia, na ausência de luz e a 22° C, formam um halo amarelo ao redor da colônia, que as distingue das linhagens de *G. mangiferae*.

Recentemente, Baldassari, Wickert e Goes (2008) observaram que as espécies *G. citricarpa* e *G. mangiferae* podem ser isoladas de lesões características da MPC e também de tecidos assintomáticos de citros, dificultando ainda mais a distinção das linhagens patogênicas.

A espécie *Guignardia mangiferae* (*Phyllosticta mangiferae*) foi descrita na literatura como sendo o agente causal de necrose em folhas de manga (MENEZES; OLIVEIRA, 1993), apresentando características morfológicas extremamente semelhantes às observadas para *G. citricarpa*, dificultando a identificação de frutos e folhas livres da MPC. Phongpaichit *et al.* (2006) isolaram e identificaram, através de sequências ITS, quatro linhagens endofíticas de *G. mangiferae* de plantas de *Garcinia*, encontradas no sul da Tailândia. Os autores demonstraram ainda a atividade antimicrobiana destas linhagens contra o patógeno *Staphylococcus aureus*.

Com o objetivo de identificar possíveis fontes de inóculo do patógeno *G. citricarpa* em pomares cítricos, Fabris (2009) inspecionou 23 espécies vegetais presentes nos pomares. Foram isoladas 86 colônias de *Guignardia* de folhas de diversos hospedeiros, e estas identificadas como *G. mangiferae* ou *G. citricarpa* por meio de PCR *Multiplex* e PCR em Tempo Real. A autora não encontrou a espécie *G. citricarpa* nas plantas investigadas, constatando apenas a presença de *G. mangiferae* e outras espécies.

Comparações da variabilidade genética e morfológica entre diferentes linhagens de *Guignardia* spp. e linhagens de *G. citricarpa* obtidas de lesões da doença MPC, seriam de grande valia na elucidação taxonômica da espécie, contribuindo significativamente para a citricultura brasileira. Esta importância justifica-se uma vez que a União Européia, não possuindo a doença em seus países

membros, apresenta leis fitossanitárias específicas para fungos fitopatogênicos de citros. E, uma vez confirmada a diferenciação entre *Guignardia* spp. e o patógeno *G. citricarpa*, as exportações brasileiras seriam expressivamente beneficiadas.

Outro fator intrigante é se o hospedeiro *Mangifera indica* (mangueira) abriga a espécie *G. citricarpa*, e ainda, se este fungo pode vir a causar alguma doença ainda não descrita. O fato de McMillan Jr. (1986) ter identificado o fungo *G. citricarpa* como sendo o agente causal de doenças em folhas da manga, talvez não esteja bem fundamentado, uma vez que o autor tomou como base somente características morfológicas, e como citado anteriormente, as duas espécies de *Guignardia* apresentam morfologia extremamente semelhante.

Para elucidar este problema, Stringari (2004), utilizando características morfológicas e dados moleculares de marcadores RAPD e sequenciamento da região ITS1-5,8S-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, cafeeiro, goiabeira e mangueira). A correlação entre as medidas das estruturas de reprodução dos 87 isolados em estudo, e as medidas descritas para espécie *G. citricarpa*, não diferiram daquelas descritas para *G. mangiferae*, indicando, assim, que caracteres morfológicos, embora sejam úteis na identificação de isolados de *Guignardia* e *Phyllosticta*, são insuficientes na determinação de espécies.

A análise por marcadores RAPD permitiu a classificação ao nível de gênero e espécie, porém o sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA apresentou maior eficiência na identificação dos isolados (STRINGARI, 2004). A alta variabilidade genética entre os isolados endofíticos, descrita pela autora, sugeriu novamente que estes pertencem à espécie *G. mangiferae* (Anamorfo: *Phyllosticta capitalensis*), corroborando os estudos anteriores, em que foram utilizados marcadores RAPD (CHRISTO, 2002), sequências ITS e dados de AFLP (BAAYEN *et al.*, 2002). A mesma espécie, *G. mangiferae*, foi descrita por Okane, Nakagiri e Ito (2001), mas denominada *G. endophyllicola*.

A principal observação de Stringari (2004) é a nítida distinção entre os isolados patogênicos de *G. citricarpa* e os demais isolados, em que a similaridade genética entre esses agrupamentos foi consideravelmente baixa (5%). Estes resultados corroboram os trabalhos de Blanco (1999), Glienke-Blanco *et al.* (2002) e

Baayen *et al.* (2002), que sugerem que os isolados endofíticos não são patógenos latentes de citros, mas devem pertencer a outra espécie de *Guignardia*. Assim, é extremamente difícil admitir que os isolados endofíticos pudessem originar a doença MPC em condições de estresse do hospedeiro, uma vez que possuem apenas 5% de similaridade genética com isolados patogênicos, com base nestes marcadores de RAPD.

Desta forma, não necessariamente uma planta ou frutos infectados com um fungo morfológicamente semelhante a *G. citricarpa*, estão contaminados com o agente causal da MPC, mas, sobretudo, com outras espécies do gênero *Guignardia*. Este fato é de fundamental importância para a citricultura brasileira, principalmente no que diz respeito à exportação de frutos *in natura*, em face das barreiras fitossanitárias impostas pela Comunidade Econômica Européia.

Mediante o emprego de técnicas de biologia molecular, muitos autores estão revendo a dupla nomenclatura de diversas espécies, identificadas anteriormente por marcadores morfológicos. Shenoy, Jeewon e Hyde (2007) relataram a necessidade do uso de marcadores moleculares no desenvolvimento de um sistema de classificação baseado em relações evolutivas, para a sistemática de fungos. Os autores utilizaram os táxons *Botryosphaerales*, *Chaetosphaerales*, *Fusarium graminearum*, anamorfos de *Pestalotiopsis* e o complexo *Mycosphaerella* para exemplificar o cenário da potencial nomenclatura e a complexidade taxonômica do sistema duplo de classificação. Assim, as sequências de DNA têm sido rotineiramente utilizadas para interligar as fases anamórficas e teleomórficas e fornecer dados filogenéticos entre as espécies.

### 3.5 FILOGENIA MOLECULAR

O estudo da filogenia ou evolução é conhecido desde 1900, mesmo antes da redescoberta dos trabalhos de Mendel. Estudos imunoquímicos entre vários grupos de mamíferos mostraram que reações sorológicas cruzadas eram mais fortes em organismos mais relacionados do que em organismos mais distantes. Essas informações foram utilizadas por Nuttall (1904) para inferir relações filogenéticas entre estes grupos.

Desde os anos 50, várias técnicas têm sido desenvolvidas em biologia molecular e utilizadas para estudos filogenéticos. Os métodos mais antigos e dispendiosos, como a eletroforese de proteínas, hibridização de DNA e métodos imunológicos logo foram substituídos por sequenciamento de proteínas e principalmente de ácidos nucleicos, que se tornaram amplamente utilizados em estudos de relações filogenéticas entre populações ou espécies. A aplicação desses métodos levou ao desenvolvimento de medidas de distância genética e de montagem de árvores, que expressassem as diferenças observadas entre os organismos.

O rápido acúmulo de dados a partir da década de 1970 provocou um grande impacto na filogenia molecular. Dados de sequências de DNA foram utilizados para a montagem de árvores filogenéticas em organismos proximamente ou distantemente relacionados. Portanto, os dados moleculares têm fornecido uma poderosa ferramenta de estudo da história evolutiva, de forma a possibilitar a reconstrução da filogenia dos maiores grupos de organismos vivos.

Os dados moleculares têm sido utilizados na sistemática dos fungos desde a década de 70, com um significativo aumento nos últimos anos. Em filogenia, os dados moleculares têm sido utilizados para esclarecer linhas evolucionárias principais, delimitando grupos taxonômicos mais elevados, como por exemplo, o Reino Fungi e seus filos (BRIDGE; SPOONER; ROBERTS, 2005). Os dados moleculares são empregados em todos os níveis taxonômicos. Nos níveis mais elevados, conduziram à reclassificação de algumas ordens e famílias, e em níveis taxonômicos mais baixos auxiliaram na identificação de espécies, de populações particulares e, possivelmente, de indivíduos. Existem, entretanto, algumas limitações ao uso difundido dos dados moleculares. Algumas se relacionam à comparação e a utilização dos métodos entre grupos fúngicos diferentes, algumas se relacionam à larga diversidade dos ciclos de vida adotados por fungos, e outras são devido à escassez de marcadores evolucionários comparáveis. Segundo Bridge, Spooner e Roberts (2005), uma barreira significativa à aplicação mais ampla de dados moleculares é a escala restrita dos dados atualmente disponíveis, e as relações desta com o inquantificável número de espécies ainda não descritas. Apesar destas limitações, os dados moleculares tiveram um efeito muito significativo na compreensão da sistemática fúngica e muitos aspectos deverão ser elucidados no futuro.

Para se estudar a evolução dos organismos é necessário entender como funcionam os mecanismos genéticos e ecológicos das mudanças evolutivas. Entretanto, ao se estudar esses mecanismos, é possível apenas propor teorias que expliquem como ocorreu a evolução de certo organismo, e não como realmente a história da evolução aconteceu. Para tanto, devem-se utilizar métodos através dos quais essa história pode ser inferida (FUTUYMA, 1992).

A evolução consiste, principalmente, em duas formas de diferenciação: a anagênese, em que ocorre uma mudança direcional dentro de uma única linhagem; e a cladogênese, em que há uma ramificação da árvore filogenética através da especiação. Estritamente falando, ambas as formas de diferenciação são idênticas e a ramificação deve-se apenas à interrupção do fluxo gênico entre populações, levando à evolução por anagênese em cada uma das subpopulações geradas pela interrupção reprodutiva entre elas (FUTUYMA, 1992).

Para que se possa definir a história evolutiva de certo grupo de organismos, deve-se observar a velocidade e o padrão de alteração anagenética do máximo possível de características. Em padrões filogenéticos, dizer que uma espécie X é mais próxima a uma espécie Y do que a outra espécie Z, é o mesmo que dizer que X e Y apresentam um ancestral comum mais recente entre si do que cada uma delas com relação a Z.

Em toda linhagem evolutiva, algumas características evoluem, enquanto outras permanecem iguais. Portanto, cada uma das espécies existentes hoje é formada por um conjunto de características ancestrais – que evoluíram com pouca ou nenhuma alteração desde ancestrais mais antigos – e características derivadas – que sofreram mudanças recentes. Certa característica pode apresentar diversos estados permitindo traçar as árvores filogenéticas. Segundo Futuyma (1992), plesiomorfia diz respeito a uma característica ancestral e apomorfia está relacionada a uma ou mais características derivadas. Uma característica ancestral compartilhada por duas ou mais linhagens é denominada simplesiomórfica, enquanto uma característica derivada compartilhada por duas ou mais linhagens é chamada sinapomórfica.

Deve-se observar também, que as características evoluem em taxas diferentes e que uma característica pode sofrer uma mudança muito tempo depois de que uma linhagem tenha se separado de seu grupo irmão. Essas características

podem também não sofrer alterações e continuarem iguais em dois grupos irmãos, sendo o seu estado definido como simplesiomórfico para os grupos.

Nos estudos evolutivos, deve-se tomar cuidado com quais caracteres foram escolhidos, e ter sempre em mente que alguns deles podem surgir independentemente em linhagens evolutivas distintas (homoplasia). Além disso, pode ocorrer também uma regressão de um caráter derivado para um caráter ancestral, devido a algum fator, direcional ou não. Portanto, quando estudos evolutivos são realizados, deve-se sempre observar o maior número de características possíveis, com o objetivo de diminuir a probabilidade de se analisar uma característica evolutivamente incomum (GRAUR; LI, 1999).

### 3.6 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 (conidiação, crescimento da colônia) ou bioquímica (produção de substâncias, auxotrofias), restringindo a possibilidade de se conduzir estudos populacionais e, muitas vezes, de sistemática. As técnicas moleculares, por sua vez, fornecem ferramentas para evidenciar e entender melhor diversos aspectos relacionados diretamente ou indiretamente com o DNA. Desta forma, a análise dos ácidos nucléicos vem sendo amplamente utilizada na diferenciação de indivíduos e no esclarecimento filogenético dos organismos estudados.

Os dados moleculares, frequentemente, complementam e corroboram hipóteses baseadas em estudos morfológicos. Entretanto, algumas vezes os resultados obtidos com a análise de DNA, mostram-se conflitantes com dados obtidos de análises exclusivamente morfológicas. Esta contradição pode ser observada principalmente na classificação taxonômica de microrganismos (SAMUELS; SEIFERT, 1995).

Diversas técnicas de biologia molecular estão disponíveis para a detecção da variabilidade genética de sequências de DNA, ou seja, para a detecção de polimorfismo genético. Dentre elas, as utilizadas principalmente em fungos são:



eletroforese de isoenzimas, eletroforese em campo pulsado, análise do polimorfismo do DNA telomérico, RFLP, AFLP, RAPD, análise do DNA mitocondrial, análise do DNA ribossômico através de sequências ITS e, ainda, a análise de outras sequências como o gene do Fator de Elongação da tradução, genes da actina, beta-tubulina, entre outras.

Estas técnicas permitem a obtenção de um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares, cobrindo todo o genoma do organismo. Tais marcadores podem ser utilizados para as mais diversas aplicações, tanto no estudo da genética como na prática de melhoramento.

A eletroforese de isoenzimas é uma técnica relativamente simples e eficiente, que possibilita a detecção de alelos de genes que codificam proteínas, como amilase, esterase, álcool desidrogenase, entre outras. Os diferentes padrões de bandas observados no gel refletem as diferentes combinações de aminoácidos nas proteínas. Desta forma, a utilização de isoenzimas como marcador molecular, permite a análise de vários locos simultaneamente; a identificação de heterozigotos; bem como a detecção da variabilidade natural das populações em estudo (ALFENAS *et al.*, 1991). Entretanto, esta técnica não conduz à análise direta do DNA, sendo necessárias outras metodologias para complementar o diagnóstico. Algumas isoenzimas, podem ainda, ter sua produção alterada em virtude dos componentes do meio de cultura (StLEGER *et al.*, 1992), o que limita a análise e conseqüentemente, as interpretações.

Na década de 70, a eletroforese, antes restrita somente as proteínas, passou a ser utilizada para moléculas de DNA (ALBERTS *et al.*, 1994). Este advento possibilitou a análise direta dos ácidos nucléicos, sem sofrer influência do ambiente e variações do estado de desenvolvimento do organismo estudado, fatos que comprometiam a interpretação dos resultados (PUTERKA *et al.*, 1993).

A técnica de eletroforese em campo pulsado veio a contribuir para a elucidação dos cariótipos de fungos, uma vez que seus cromossomos são muito pequenos em comparação a outros eucariotos, o que tornava impossível a realização de cariótipos convencionais. Esta técnica 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 consequência, levam mais tempo para começar a migrar (ALBERTS *et al.*, 1994).

O emprego de DNA telomérico como marcador molecular, também pode ser utilizado para detecção do número de cromossomos em fungos. Nesta técnica, são usadas sondas de DNA telomérico de *Botrytis cinerea*, o qual é bastante conservado e tem sido utilizado para vários fungos filamentosos (VIAUD *et al.*, 1996). Genes importantes como os da  $\beta$ -tubulina, histona 4 e 28S rDNA, que em geral são altamente conservados, também podem ser clonados e usados como sondas (VIAUD *et al.*, 1996).

A técnica RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* ou polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição) 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.*, 1994). Dentre as inúmeras aplicações dos marcadores RFLP, pode-se citar o estudo da evolução do genoma; a identificação de genes específicos (úteis na detecção de doenças); o estudo de genética de populações; a taxonomia e obtenção de mapas genéticos (MICHELMORE; HULBERT, 1987). Entretanto, seu uso torna-se limitado, pois é necessário DNA de alta qualidade e em grande quantidade (GLIENKE, 1995).

A análise por AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* ou polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados) foi descrita primeiramente por Zabeau (1993), e é capaz de obter um grande número de marcadores moleculares em genomas de procariotos e eucariotos. A técnica combina a especificidade, resolução e poder de amostragem da digestão de enzimas de restrição, com a velocidade e praticidade de detecção dos polimorfismos via PCR. Desta forma, o ensaio AFLP, que reúne a vantagem da PCR específica com a vantagem da técnica RAPD em se explorar sequências arbitrárias, pode auxiliar significativamente na busca de polimorfismos em espécies de base genética estreita.

Dentre as inúmeras aplicações da técnica AFLP, pode-se citar a diferenciação de organismos como bactérias (PICARD *et al.*, 2008) e fungos (HYNES *et al.*, 2006), a avaliação do potencial de diferentes linhagens para controle biológico de fitopatógenos (LARRALDE-CORONA *et al.*, 2008) e a identificação e seleção de linhagens resistentes a fitopatógenos (KIM *et al.*, 2008, GALVAN *et al.*, 2008). Os marcadores AFLP também têm sido utilizados na produção de RNAm marcados, a

fim de comparar a expressão diferenciada de genes entre amostras de RNAm (PATHAN *et al.*, 2007; GHOSE *et al.*, 2008).

O uso do DNA mitocondrial como marcador molecular, também pode ser empregado na análise da variabilidade genética, pois apresenta diversas características favoráveis. Dentre elas, incluem-se: o tamanho reduzido; o grande número de cópias por célula; a ausência de metilação das bases nitrogenadas; são de fácil obtenção e apresentam um grande número de RFLP em nível intraespecífico (BRUNS; WHITE; TAYLOR, 1991; HEGEDUS; KHACHATOURIANS, 1993). Por ser muito suscetível a mutações, o DNA mitocondrial apresenta um acentuado polimorfismo, tornando-o ideal para estudos taxonômicos (HEGEDUS; KHACHATOURIANS, 1993).

Igualmente, o DNA ribossomal (rDNA) pode ser empregado na análise da variabilidade genética para uma ampla faixa de níveis taxonômicos. As sequências 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 (*Internal Transcribed Spacer*), evoluem rapidamente, apresentando alto polimorfismo, e sendo, desta forma, de grande interesse nos estudos filogenéticos de gêneros, espécies e populações (WHITE Jr.; MORROW, 1990). Na identificação de fungos fitopatogênicos, estas sequências ITS têm servido como mais uma fonte de informação relevante na classificação taxonômica de várias espécies (BAAYEN *et al.*, 2002; BONANTS *et al.*, 2003; PANDEY; REDDY; SURYNARAYANAN, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2004; STRINGARI, 2004; MIDORIKAWA *et al.*, 2008).

A tecnologia do DNA recombinante e o desenvolvimento da amplificação de segmentos de DNA via PCR (*Polymerase Chain Reaction*), abriram o caminho para uma mudança no paradigma genético clássico: da inferência do genótipo a partir do fenótipo, para a análise genética direta da variação na seqüência de DNA.

Os marcadores moleculares, baseados em PCR, podem ser utilizados no estudo da evolução molecular, na detecção de infecções microbianas através da amplificação do DNA do patógeno com *primers* ou oligonucleotídeos iniciadores específicos ao seu genoma e na medicina forense (WATSON *et al.*, 1992; ALBERTS *et al.*, 1994).

Uma das limitações da técnica PCR é a necessidade do conhecimento prévio da seqüência que flanqueia o segmento a ser amplificado (WATSON *et al.*, 1992; ALBERTS *et al.*; 1994). Para resolver este problema, desenvolveu-se uma técnica denominada mais comumente de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Esta técnica baseia-se na amplificação de segmentos de DNA, por um único *primer* de seqüência arbitrária (WILLIAMS *et al.*, 1990).

### 3.6.1 Marcadores RAPD

O grande avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR, foi descrito simultaneamente, e independentemente, em 1990, por dois grupos de pesquisadores, Welsh e McClelland (1990), e Williams *et al.*, (1990). Williams *et al.* (1990) patentearam a tecnologia com o nome mais comumente utilizado, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), descrevendo a técnica no contexto da análise Mendeliana, demonstrando a identificação de marcadores genéticos para mapeamento. Welsh e McClelland (1990), por sua vez, propuseram a denominação mais apropriada para a técnica, chamando-a de AP-PCR (*Arbitrarily Primed – Polymerase Chain Reaction*), uma vez que os *primers* possuem seqüências arbitrárias, mas a amplificação tecnicamente não ocorre ao acaso e, sim, em lugares específicos do genoma. O experimento deste grupo foi a geração de *fingerprints* genômicos simples e reproduzíveis para a identificação de linhagens, utilizando géis de eletroforese em poliacrilamida de maior poder de resolução, juntamente com *primers* um pouco mais longos.

A técnica é baseada na amplificação de segmentos do DNA, utilizando 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 um único *primer*, com uma seqüência arbitrária de 10 a 15 bases. A amplificação somente ocorre se este *primer* arbitrário for complementar a um sítio em uma das fitas, e complementar a um mesmo sítio (com orientação invertida) na outra fita de DNA (WILLIAMS *et al.*, 1990).

Segundo Williams *et al.* (1993), o tamanho ideal do *primer* para a amplificação em 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 *primers* não devem conter sequências palindrômicas a fim de evitar o autopareamento. As concentrações de *primer*, magnésio e DNA, também podem alterar tanto o número como a intensidade das bandas.

A técnica RAPD permite caracterizar e avaliar o grau de similaridade genética entre genótipos nos níveis inter e intra-específicos, sendo altamente sensível a diferenças de até um único nucleotídeo entre o *primer* e o DNA molde. Permite ainda a obtenção de *fingerprints* genômicos de indivíduos, variedades e populações; a análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais, populações de melhoramento e bancos de germoplasma; a construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica, a localização de genes de interesse econômico, e ainda a obtenção de novos marcadores para diagnósticos por meio de PCR (FUNGARO; VIEIRA, 1998; FUNGARO, 2000).

Os marcadores RAPD oferecem ainda a possibilidade de amostrar regiões do DNA repetitivo, uma vez que os *primers* utilizados para detecção da variação são arbitrários, ao contrário das sondas RFLP, que são pré-selecionadas para regiões de cópia única (WILLIAMS *et al.*, 1993; WANG *et al.*, 1993).

Desta forma, a técnica RAPD reúne a simplicidade dos marcadores isoenzimáticos, com o poder de resolução dos marcadores de DNA. O uso desta técnica não requer experiência profunda em biologia molecular e nem tampouco instalações sofisticadas de laboratório. A técnica RAPD é uma das ferramentas disponíveis que permitem a análise genética detalhada para um grande número de marcadores (MEGNEGNEAU; DEBETS; HOCKSTRA, 1993).

A técnica de RAPD não requer o desenvolvimento prévio de uma biblioteca de sondas específicas para o organismo de interesse. Um conjunto único de *primers* arbitrários pode ser utilizado para qualquer organismo. Por não utilizar sonda, é eliminada a necessidade de isótopos radioativos ou marcações não radioativas (MICHELMORE; PARAN; KESSELI, 1991). Outra vantagem é a quantidade mínima de DNA necessária para a análise genotípica de um indivíduo (MANULIS *et al.*, 1993), enquanto que para RFLP são necessárias dezenas de microgramas de DNA, para RAPD são necessárias apenas dezenas de nanogramas.

Além disso, oferece a possibilidade de automatização. O fato de o polimorfismo RAPD possuir natureza binária (presença ou ausência de banda), se por um lado não permite a distinção de heterozigotos, é uma característica mais

adequada, hoje, para automatização do processo de aquisição de dados, dentro da sistemática binária de ambientes computacionais.

Análises por marcadores RAPD permitiram a Lappalainen e Yli-Mattila (1999) estudarem a variabilidade do fungo endofítico *Gnomonia setacea* em dois locais da Finlândia. Neste estudo foram utilizados dois *primers* de RAPD para comparar 40 linhagens de *G. setacea*, mostrando alta divergência genética entre as linhagens.

Araújo *et al.* (2001) isolaram fungos e bactérias endofíticas em folhas de diferentes variedades cítricas. *Pantoea agglomerans* e *Bacillus pumilus* foram as espécies bacterianas mais frequentemente isoladas, enquanto que *Guignardia citricarpa*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Cladosporium* sp. foram as espécies mais abundantes de fungos. A variabilidade bacteriana foi analisada por RAPD, mostrando que não há correlação entre os grupos obtidos e as plantas hospedeiras das quais foram isoladas. Os autores analisaram, ainda, a interação *in vitro* entre *G. citricarpa* e as bactérias mais isoladas no estudo. Metabólitos secretados por *G. citricarpa* apresentaram um efeito inibitório sobre o crescimento de algumas espécies de *Bacillus* e um efeito estimulatório sobre o crescimento de *P. agglomerans*.

Glienke-Blanco *et al.* (2002), utilizando sete *primers* de RAPD e 143 bandas polimórficas, encontraram alta variabilidade intra-específica em 12 linhagens endofíticas de *Guignardia*, isoladas de folhas assintomáticas de laranja, tangerina e tangor. Os autores não encontraram associação entre a similaridade genética das linhagens e as variedades de citros aos quais foram isoladas.

Feau *et al.* (2005) caracterizaram a variabilidade genética do patógeno *Mycosphaerella populorum*, em sete populações norte-americanas isoladas de plantas do gênero *Populus* (p.ex. álamo). Neste estudo foram analisados 352 isolados com seis *primers* e 21 marcadores polimórficos de RAPD. Os resultados mostraram altos níveis de diversidade interpopulacional. Os autores encontraram ainda, uma elevada e significativa correlação entre os agrupamentos obtidos e a distância geográfica das populações, sugerindo o isolamento das populações amostradas por distância.

Tejesvi *et al.* (2007) avaliaram a diversidade genética de 32 linhagens endofíticas de *Pestalotiopsis* isoladas de quatro plantas medicinais. Os autores utilizaram 23 *primers* e 241 bandas polimórficas, separando as linhagens em quatro grupos distintos. Os resultados indicaram que o RAPD pode ser empregado na

detecção de diversidade genética desta espécie, e ainda auxiliar na pré-seleção de isolados com provável atividade antagonista.

Gopal *et al.* (2008) utilizaram a técnica RAPD para estimar a variabilidade genética entre 17 isolados de *Trichoderma* sp.. Diversas espécies deste gênero têm sido identificadas como potenciais antagonistas de *Fusarium solani*, causador da podridão radicular seca em citros. Com 16 *primers* e 145 marcadores os autores observaram 91,8% de polimorfismo. Os isolados foram separados em 2 grupos distintos, com 22,6% de similaridade entre eles, mostrando a diversidade dentro deste gênero.

Sharma, Mishra e Misra (2009) utilizaram os marcadores RAPD para avaliar a variabilidade genética entre 8 isolados de *Trichoderma harzianum* e investigar a correlação com a capacidade destas linhagens em antagonizar *Sclerotium rolfsii*, em ensaios de cultura pareada. Utilizando 8 *primers* e 86 marcadores, os autores encontraram alta variabilidade entre os isolados de *T. harzianum* (coeficiente de similaridade de 30%). Embora o RAPD tenha sido eficiente na detecção da elevada variabilidade intra-específica, os autores não encontraram nenhuma relação do polimorfismo existente com o antagonismo ou com a origem dos isolados.

A técnica RAPD também é utilizada como um método eficiente na diferenciação de microrganismos patogênicos e não patogênicos. Blanco (1999) utilizando seis *primers* de RAPD confirmou a existência de três populações distintas de *Guignardia* coexistindo em citros, sendo duas endofíticas e uma patogênica, responsável pelas lesões da MPC. Os mesmos resultados foram obtidos por Chisto (2002) e Stringari (2004).

Santoro *et al.* (2008) comparou isolados de *Beauveria bassiana*, possíveis controladores biológicos de *Alphitobius diaperinus*, pela técnica de RAPD. Os isolados que apresentaram alta virulência mostraram um padrão de bandas mais homogêneo do que os outros não tão virulentos, mostrando que a técnica de RAPD pode ser útil para a seleção de isolados de *B. bassiana* com elevada virulência contra *A. diaperinus*.

Das, Fakrudin e Arora (2008) analisaram 20 linhagens de *Macrophomina phaseolina* isoladas de sorgo em diversos locais na Índia. Este fungo é o agente causal da mancha-carvão em sorgo, gerando grandes prejuízos na região. Com 14 *primers*, as linhagens foram separadas em 7 grupos principais, com alto nível de polimorfismo (98,1%) entre os isolados. Os autores encontraram uma correlação

entre os agrupamentos obtidos e região geográfica na qual os isolados foram coletados.

Na análise da variabilidade genética de organismos relacionados, diversos autores confrontam resultados obtidos de análises morfológicas, com dados obtidos a partir de marcadores moleculares. Penna (2000) estudou a variabilidade genética de *Phyllosticta* spp. isolados de erva-mate (*Ilex paraguariensis*). A análise por RAPD de 24 linhagens resultou num agrupamento com três populações distintas, coincidindo com o agrupamento obtido pela análise das características morfológicas das linhagens. Riveros *et al.* (2001), encontraram falta de consistência entre análises morfológicas e análises moleculares no estudo de 18 linhagens do fungo *Fusarium*, isoladas de melão (*Cucumis melo* L.).

Através de marcadores RAPD, polimorfismo entre locos de microssatélite (ISSR - *Inter Single Sequence Repeats*) e sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2, Batista *et al.* (2008) caracterizaram geneticamente 26 linhagens de *Aspergillus flavus* e outras espécies de *Aspergillus*. Este gênero de fungos filamentosos apresenta ampla dispersão no ambiente, com grande importância econômica (micotoxinas), aplicações biotecnológicas e espécies associadas a doenças. A identificação é realizada por técnicas tradicionais associadas a marcadores moleculares, resultando em uma maior eficiência na caracterização do isolado. As análises de ISSR e de RAPD realizadas pelos autores revelaram uma grande diversidade genética, sendo possível a distinção das espécies pelo perfil obtido com um dos *primers* de ISSR utilizado. Os resultados indicaram que algumas linhagens identificadas como *A. flavus* eram na verdade *A. oryzae*, *A. parasiticus* e *A. tamarii*. E uma linhagem que havia sido identificada como *A. parasiticus* provavelmente é *A. flavus*. Todas as linhagens foram retestadas pelos métodos tradicionais e a nova identificação foi confirmada. Os resultados, segundo os autores, confirmam a necessidade do uso de marcadores moleculares como uma ferramenta auxiliar para a diferenciação de espécies e linhagens fúngicas.

Através das técnicas RAPD e AFLP, Narváez *et al.* (2000) compararam a diversidade genética de 50 cultivares de uva. Utilizando 18 *primers* de RAPD, foram identificadas 103 bandas, correspondendo a 29,9% de polimorfismo. Com apenas 4 *primers* de AFLP e 86 marcadores a mesma variabilidade foi encontrada, sugerindo a superioridade dos marcadores AFLP para o grupo em estudo.



As duas técnicas, RAPD e AFLP, também foram comparadas por Becerra *et al.* (2007) em isolados de *Puccinia striiformis*, coletados em campos de várias regiões do Chile. Esta espécie causa a ferrugem amarela do trigo, uma das principais doenças fúngicas que ocasiona grandes perdas na produtividade em trigo. A partir de cinco populações locais, 29 isolados de *P. striiformis* foram analisados com 64 *primers* de RAPD e 6 combinações de *primers* AFLP. Os coeficientes de similaridade (53% para RAPD e 14% para AFLP) indicaram que as populações existentes no Chile são muito diferentes, em contraste com estudos semelhantes realizados em outros países. Em virtude da reprodutibilidade e do elevado nível de polimorfismo, os autores também relataram a superioridade da técnica AFLP para a análise da diversidade genética de *P. striiformis*, em comparação com o RAPD.

Diversos trabalhos utilizam marcadores RAPD para o desenvolvimento de SCARs (*Sequence Characterized Amplification Region*), com o objetivo de se obter *primers* para ampliações de identificação de espécies, variedades ou mesmo de uma única linhagem (SOUBABÈRE *et al.*, 2001; RIGOTTI *et al.*, 2002; SCHENA, SIALER; GALLITELLI, 2002; DAUCH, WATSON; JABAJI-HARE, 2003; SINGH-MONIKA; CHAUDHARY; BOORA, 2006).

Li *et al.* (2008) analisaram 23 linhagens de *Lentinula edodes* (cogumelo shiitake) cultivadas na China. Atualmente, mais de 100 linhagens desta espécie são cultivadas em escala comercial, sendo importante o desenvolvimento de um método confiável e eficaz para distinguir estirpes comercialmente superiores. Foram selecionados três marcadores informativos de RAPD e desenvolvidos três SCARs. Através da PCR *Multiplex*, os autores identificaram três fenótipos distintos para as linhagens analisadas, sendo um deles capaz de diferenciar uma linhagem comercialmente superior das demais.

Midorikawa *et al.* (2008) avaliaram a variabilidade genética de populações de *Aspergillus flavus* provenientes de nozes e castanhas no Brasil. Por cromatografia 75% dos 48 isolados apresentaram resultado negativo para aflatoxina. Com 11 *primers* e 141 marcadores RAPD, os isolados foram diferenciados de acordo com o hospedeiro e a origem geográfica, não apresentando relação com a produção de aflatoxina. Os autores desenvolveram, ainda, um método de detecção para *A. flavus* com *primers* desenhados a partir da região ITS1 e ITS2 do rDNA, uma vez que os marcadores RAPD não foram informativos na distinção da espécie. Os *primers* desenvolvidos apresentaram alta especificidade para *A. flavus*, mesmo quando

testados com outras espécies de *Aspergillus* e com outros fungos, podendo ser utilizados em PCR *Multiplex*, na detecção de cepas produtoras de micotoxinas.

Blanco (1999), estudando a variabilidade genética em linhagens patogênicas e endofíticas de *Guignardia* spp., através de marcadores RAPD, desenvolveu um par de *primers* (GCP1/GCP2) capaz de amplificar um fragmento em torno de 300 pb, específico para identificação de linhagens patogênicas de *G. citricarpa*. Como a identificação de plantas contaminadas com o patógeno é crucial para o controle e combate da doença em pomares brasileiros, foram identificados e clonados novos marcadores RAPD exclusivos de patógenos (CHRISTO, 2002). Estes marcadores foram seqüenciados, desenhados *primers* e obtido SCARs para diagnóstico destas linhagens via PCR (KAVA-CORDEIRO, 2004). Na amplificação conjunta *in vitro* com os *primers* GMF1/GMR2 e GCP1/GCP2 (utilizando DNA extraído de fungos), foi possível diferenciar *G. citricarpa* (banda de aproximadamente 300pb) de *G. mangiferae* (banda de aproximadamente 700 pb) e *Phyllosticta spinarum* (aproximadamente 350 pb) (Relatório Técnico, 2005).

Van Gent-Pelzer *et al.* (2007) descreveram o diagnóstico de *G. citricarpa*, isolada em lesões de frutos de laranja, por meio de PCR em Tempo Real. Os autores relataram a elevada sensibilidade da técnica em relação à PCR convencional. Porém, tais testes não foram validados para as condições brasileiras.

Através da PCR *Multiplex* e PCR em Tempo Real, Fabris (2009) utilizou os marcadores desenvolvidos por Blanco (1999) e Kava-Cordeiro (2004) para otimizar uma metodologia rápida e precisa na identificação de *G. citricarpa* e *G. mangiferae*, provenientes do Brasil. A autora analisou 413 linhagens das 453 descritas no presente trabalho (QUADROS 1 a 4 - vide Materiais e Métodos). A utilização de linhagens referência das duas espécies, anteriormente submetidas a testes de patogenicidade por Baldassari *et al.* (2008), permitiu validar o diagnóstico por PCR *Multiplex*, na identificação das linhagens de *G. citricarpa* e *G. mangiferae*. O teste demonstrou-se sensível em concentrações de até 2,5% em amostras diluídas do DNA fúngico, em relação ao DNA vegetal. Entre as linhagens isoladas de lesão da MPC, 192 foram identificadas como *G. citricarpa* e 3 como *G. mangiferae*. Entre as linhagens isoladas de folhas assintomáticas de citros, 32 foram identificadas como *G. citricarpa* e 75 como *G. mangiferae*. E, em folhas assintomáticas de manga, 22 linhagens foram identificadas como *G. mangiferae* e 18 como *Phyllosticta* sp., pois não apresentaram amplificação no PCR *multiplex*. Estes resultados foram

corroborados com o PCR em Tempo Real, em que o teste positivo para *G. citricarpa* apresentou ct de aproximadamente 20 e o teste negativo, ct acima de 28. Segundo a autora, embora os resultados obtidos por PCR em Tempo Real possibilitem um diagnóstico mais rápido, a metodologia da PCR *multiplex* mostrou-se mais eficiente na identificação de *G. citricarpa* e *G. mangiferae*, apresentando 100% de acerto de *G. citricarpa*.

### 3.6.2 Sequenciamento das regiões ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA e $\alpha 1$ do Fator de Elongação da Tradução na identificação e filogenia molecular de fungos

O DNA ribossômico (rDNA) tem sido objeto de um grande número de estudos, com diversas aplicações na genética, evolução e melhoramento, podendo ser utilizado para uma ampla faixa de níveis taxonômicos. Tal interesse está diretamente relacionado à estrutura desta região, que se encontra em locais específicos do genoma, repetida em seqüência inúmeras vezes e sob evolução em concerto.

A função do rDNA, ao contrário de outras seqüências repetitivas, que aparentemente não tem função conhecida no genoma, é a de codificar as diferentes moléculas do RNA ribossômico, representando extrema importância no processo de tradução de proteínas.

Em geral, as regiões 28S, 18S e 5,8S das unidades de repetição, não apresentam variações de seqüência, enquanto que as regiões internas que são transcritas, conhecidas como ITS (*Internal Transcribed Spacer*), variam enormemente. Desta forma, 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 (ITS), evoluem rapidamente, apresentando alto polimorfismo, e sendo assim, de grande interesse nos estudos filogenéticos nos níveis de gêneros, espécies e populações (WHITE; MORROW, 1990).

Esta característica permite ainda, a sua utilização na obtenção de polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) nos locos de

rDNA, onde o número de cópias e variações de nucleotídeos de uma determinada sequência de rDNA podem ser avaliados (FERREIRA, 1994).

Pipe *et al.* (1995) analisaram o rDNA de diferentes espécies e linhagens do fungo *Metarhizium*, através da técnica RFLP. As variedades *anisopliae* e *majus* da espécie *M. anisopliae*, a espécie *M. album*, e a espécie *M. flavoviride*, foram diferenciadas pela presença ou ausência de sítios para enzimas de restrição, nas unidades de repetição do rDNA. A análise dos RFLPs pelo *software* NTSYS com o coeficiente de similaridade de Jaccard, e o agrupamento pelo método UPGMA, permitiram ainda, a diferenciação quanto à origem geográfica das linhagens de *M. anisopliae*.

Gomes *et al.* (2002), também utilizando a técnica RFLP, detectaram o polimorfismo da região ITS do rDNA. Estes autores identificaram variações inter e intra-específicas entre 26 linhagens de fungos ectomicorrízicos, pertencentes a 8 gêneros e 19 espécies. O produto da amplificação da região ITS com *primers* específicos resultou em um fragmento de 560 a 750 pb para todas as linhagens analisadas, não permitindo a separação taxonômica das mesmas. Entretanto, quando os fragmentos amplificados foram clivados com as enzimas de restrição, *AluI*, *HaeIII*, *HinfI* e *HpaI*, as linhagens revelaram extenso polimorfismo, uma vez que os oito gêneros e a maioria das espécies apresentaram padrões específicos de restrição.

Gao *et al.* (2005) analisaram morfológica e molecularmente, por meio de marcadores RFLP e sequências ITS do rDNA, a microbiota de *Heterosmilax japonica* Kunth, presente na primavera e no verão de regiões da China. Esta espécie é amplamente reconhecida na China por seus efeitos diuréticos, mas pouco se sabe sobre seus fungos endofíticos. Os autores encontraram uma ampla variedade fúngica colonizando endofiticamente a planta, sendo mais expressiva na primavera, onde incluem os gêneros *Mycosphaerella*, *Phomopsis*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Glomerella*, *Botryosphaeria* e *Guignardia*. Através da análise filogenética, os autores relataram que diversas sequências do rDNA determinadas neste estudo não são especificamente aparentadas com as sequências de fungos depositadas atualmente no *Genbank*. E várias sequências são significativamente similares a amostras ambientais não cultivadas.

Jasalavich, Ostrofsky e Jellison (2000) utilizaram os *primers* ITS1F (universal para fungos superiores) e ITS4B (específico para Basidiomicetos) na identificação de

microrganismos. A amplificação da região ITS1-5,8S- ITS2 detectou a presença de Basidiomicetos em diferentes amostras. Testes complementares foram realizados no produto da amplificação, através da técnica RFLP, permitindo a identificação de espécie.

As regiões ITS do rDNA também têm sido amplamente utilizadas para o diagnóstico de microrganismos patogênicos. A análise da região codificadora da subunidade 16S, de bactérias metilotróficas do gênero *Methylobacterium*, foi realizada por Nishio, Yoshikura e Itoh (1997), possibilitando o desenvolvimento de *primers* capazes de identificar e diferenciar espécies deste gênero. As bactérias metilotróficas, algumas provavelmente patogênicas, são capazes de utilizar fontes de carbono mais reduzidas que o dióxido de carbono.

Moukhamedov *et al.* (1994) estudaram o fungo patógeno de batata, *Verticillium tricorpus*, e o compararam com as espécies *V. dahliae* e *V. albo-atrum*, também patogênicas, mas já com métodos de diagnóstico. A região intragênica 18-28S do rDNA foi obtida por amplificação do DNA genômico do fungo. A análise da região 5,8S do rDNA revelou sequências altamente conservadas entre as três espécies de *Verticillium*, enquanto que as sequências das regiões ITS de *V. tricorpus* mostraram-se claramente divergentes. Estas sequências divergentes foram então utilizadas para sintetizar um *primer* específico para o diagnóstico do fungo *V. tricorpus*, contribuindo para a investigação e monitoramento da doença.

Tooley *et al.* (1997) investigaram regiões ITS2 do fungo patogênico *Phytophthora*, responsável pela doença foliar em batata conhecida como requeima. A análise possibilitou o desenvolvimento de *primers* para o diagnóstico em folhas e tubérculos infectados. Três espécies patogênicas do fungo foram identificadas: *P. infestans* (com um produto de amplificação de 456pb); *P. erythroseptica* (com um fragmento de 136pb), e *P. nicotianae* (com um fragmento de 455pb).

Além de regiões ITS, outras sequências são utilizadas no estudo de filogenias. Appel e Gordon (1996) analisaram linhagens patogênicas e não patogênicas de *Fusarium oxysporum*, através de sequenciamento parcial das regiões IGS. O alinhamento das sequências obtidas evidenciou um agrupamento diferencial entre as duas linhagens, reforçando a importância da análise destas regiões para elucidação taxonômica.

He, Xu e Hughes (2005), através de região 18S do rDNA, analisaram a microbiota fúngica do solo da floresta natural da Austrália subtropical e de uma

plantação de *hoop pine* (família Araucariaceae), da mesma região. Os estudos filogenéticos revelaram que todas as sequências obtidas estavam relacionadas ao Reino Fungi, incluindo os filos Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota. Os autores sugeriram que a extração do DNA da microbiota, seguida de PCR, clonagem, seleção de SSCP de clones, sequenciamento dos clones selecionados e as análises filogenéticas, poderiam ser uma ótima estratégia na investigação da comunidade e da diversidade fúngica do solo.

Larena *et al.* (1999), analisando sequências depositadas no *Genbank*, desenvolveram um *primer*, chamado de ITS4A, com alta especificidade para Ascomicetos. Utilizando-se este *primer* e o *primer* universal para fungos superiores (ITS1F), foi possível amplificar a região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal, em amostras apenas de fungos Ascomicetos, resultando em um fragmento de 600 a 800pb. Este trabalho demonstra uma estratégia rápida e confiável na discriminação de Ascomicetos dos demais grupos taxonômicos.

Azevedo *et al.* (2000) utilizaram marcadores RAPD e sequências ITS na identificação de 5 isolados, morfologicamente atípicos, de *Paecilomyces*, isolados do Estado do Paraná. A amplificação com os *primers* ITS4 e ITS5 resultou em um fragmento de 700 pb para todas as linhagens investigadas, dando origem a padrões de restrição idênticos às linhagens de *P. fumosoroseus*, utilizadas como referência. A similaridade genética entre as linhagens atípicas e as linhagens-referência de *P. fumosoroseus*, observada através da técnica RAPD, foi maior do que a similaridade observada entre as linhagens-referência desta espécie, permitindo concluir que estas linhagens pertencem à espécie *P. fumosoroseus*.

Mehta (2001), através de técnicas de RAPD e regiões ITS, analisou a espécie *Stemphylium solani*, causadora de manchas foliares em tomateiro, a fim de verificar a variabilidade entre linhagens obtidas de algodoeiro e sua relação com linhagens obtidas de tomateiro. Foram analisadas 33 linhagens de *Stemphylium solani* (28 de algodoeiro e 5 de tomateiro), e uma linhagem de *Alternaria macrospora* de algodoeiro. A análise através de marcadores RAPD, demonstrou a presença de polimorfismo entre os gêneros e entre indivíduos de mesma espécie. A PCR, utilizando os *primers* ITS4 e ITS5, resultou em um fragmento de aproximadamente 600pb, e a análise RFLP destes fragmentos apresentou padrões idênticos para todas as linhagens. Desta forma, ao contrário do que foi observado com marcadores

RAPD, a análise da região ITS por RFLP não revelou diferença intergenérica ou intra-específica.

Nos estudos que envolvem DNA vegetal, a presença de microrganismos endofíticos constitui um grave problema de contaminação, pois a grande parte das técnicas utilizadas para extração de DNA, não discrimina o DNA vegetal do DNA dos possíveis endófitos. Para tanto, Saar *et al.* (2001) utilizaram os *primers* ITS3 e ITS4 (WHITE; MORROW, 1990), para amplificar a região ITS2 de diferentes espécies de *Dahlia*, obtendo fragmentos de aproximadamente 450pb. Entretanto, após amplificação, algumas amostras apresentaram uma banda secundária de 355 a 426pb. O produto foi então sequenciado, revelando que as bandas secundárias eram provenientes de Ascomicetos e Basidiomicetos endofíticos da planta.

Silva-Hanlin e Hanlin (1999) seqüenciaram a região codificante da subunidade 18S do rDNA, possibilitando a investigação filogenética de 8 espécies de Loculoascomicetos. A análise demonstrou que os gêneros *Guignardia* e *Botryosphaeria* estão intimamente relacionados.

Estudos de populações endofíticas de *Phyllosticta*, em diferentes espécies da família Ericaceae, foram realizados por Okane, Nakagiri e Ito (2001), através de análises de sequências ITS, e características morfológicas. Neste trabalho foram comparadas várias espécies, previamente descritas como *Guignardia* (Anamorfo: *Phyllosticta*), com a nova espécie isolada e denominada pelos autores de *Guignardia endophyllicola*. Análises morfológicas envolvendo aspectos da colônia e mensurações de ascósporos, ascos e conídios, mostraram claramente a distinção das espécies *Guignardia philoprina* (Berk.; Curt.) Van Der Aa (Anamorfo: *Phyllosticta concentrica* Sacc.), *Guignardia rhodora* (Cooke) B. H. Davis (Anamorfo: *Phyllosticta maxima* Ell.; Ev.), *Guignardia vaccinii* Shear (Anamorfo: *Phyllosticta elongata* G. J. Weidemann), e *Phyllosticta pyrolae* Ellis; Everh, da espécie *G. endophyllicola*. Entretanto, comparações entre as espécies controle de *Phyllosticta capitalensis*, isoladas de lesões em orquídeas, mostraram total correlação com o fungo endofítico isolado de Ericaceae no presente trabalho, denominado de *G. endophyllicola*. Estes dados morfológicos foram fortemente suportados pela análise das regiões ITS1–5,8S-ITS2 de *P. capitalensis* e *G. endophyllicola*. A ausência de divergências nestas regiões sugere que esta espécie é teleomorfo de *P. capitalensis*.

Com o objetivo de investigar a gama de hospedeiros de *G. endophyllicola* (Anamorfo: *Phyllosticta capitalensis*), Okane, Lumyong e Nakagiri (2003), isolaram

espécies endofíticas de *Guignardia* de folhas sadias de 94 plantas (91 espécies e 3 variedades) de 69 gêneros e 42 famílias, e sequenciaram a região ITS do rDNA. Os autores encontraram as espécies de *Guignardia* e *Phyllosticta* em 67 plantas (66 espécies e 1 variedade) pertencentes a 54 gêneros e 38 famílias. Dentre estes, 53 isolados de diferentes plantas, pertencentes a 43 gêneros e 36 famílias, apresentaram-se morfologicamente semelhantes, e com homologia à espécie *G. endophyllicola*. Desta forma, os autores sugerem que este fungo endofítico pode habitar várias plantas vasculares como angiospermas, gimnospermas e pteridófitas.

Baayen *et al.* (2002), utilizando-se de dados morfológicos, marcadores AFLP e sequências ITS, realizaram estudos paralelos comparando dezenas de linhagens patogênicas e endofíticas de *Guignardia* spp. e de *G. citricarpa*, isoladas de diferentes espécies vegetais, em diversas regiões de Ásia, África, Austrália e América. Os dados morfológicos obtidos estão de acordo com os descritos por McOnie (1964a), em que linhagens patogênicas apresentam crescimento lento em comparação com linhagens endofíticas, que apresentam crescimento mais rápido e fácil produção de pseudotécio e ascósporos, em meio de cultura. Os dados moleculares de sequências ITS permitiram o agrupamento das diversas linhagens em quatro classes. O Grupo I (38 linhagens) está representado por linhagens isoladas de lesões de citros (mancha preta), as quais apresentaram crescimento lento, e apresentaram identidade com o fungo *G. citricarpa*. As linhagens do Grupo II (43), provenientes de citros e de outras plantas assintomáticas, apresentaram uma enorme identidade com o fungo *Phyllosticta capitalensis*, sendo provavelmente a sua forma teleomórfica (*G. mangiferae*). Esta espécie apresenta uma ampla faixa de hospedeiros, o que provavelmente possibilitou o seu isolamento em diferentes espécies de plantas, e a repetida classificação com nomenclaturas diversas. Os Grupos III e IV estão representados por apenas uma linhagem cada, apresentando identidade com as espécies *Phyllosticta telopeae* e *P. spinarum*, respectivamente. Desta forma, os autores sugerem que as linhagens isoladas de lesões de MPC pertencem à espécie *G. citricarpa*, enquanto as linhagens endofíticas isoladas de *Citrus* spp. devem pertencer à espécie *G. mangiferae* (Anamorfo: *Phyllosticta capitalensis*), e/ou a outras descrições sinônimas, como *G. endophyllicola* (Anamorfo: *Phyllosticta capitalensis*), *Guignardia* sp. (Anamorfo: *Phyllosticta 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. Outro dado relevante, obtido com a alta similaridade genética entre as linhagens endofíticas de citros, as linhagens referência de *G. mangiferae*, e *Phyllosticta* sp., foi a constatação de que uma mesma espécie de fungo pode colonizar diferentes espécies hospedeiras. E a alta similaridade genética da linhagem de *G. psidii*, patógeno de goiaba, com as linhagens de *G. mangiferae*, sugeriram que o mesmo microrganismo pode ser encontrado atuando como endófito em alguns vegetais e como patógeno em outros hospedeiros (CHRISTO, 2002).

Como citado anteriormente, por meio de marcadores RAPD e sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA, Stringari (2004) confirma a denominação de *G. citricarpa* para isolados patogênicos de citros e de *G. mangiferae* para isolados endofíticos de citros, sugeridas por Christo (2002). Também confirma a identificação de outras linhagens endofíticas de citros como pertencentes à espécie *Phyllosticta spinarum*.

Pandey, Reddy e Suryanarayanan (2003) estudaram a variabilidade genética de espécies foliares endofíticas de *Phyllosticta*, isoladas de diferentes árvores tropicais na Índia. Dados obtidos com ITS-RFLP não detectaram nenhuma variação entre as linhagens, sugerindo que estas pertencem a uma mesma espécie. O sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal das linhagens, demonstrou identidade com o fungo *Phyllosticta capitalensis*. Este resultado veio a corroborar os dados obtidos por Baayen *et al.* (2002), constatando que *P. capitalensis* (anamorfo: *Guignardia mangiferae*) é uma espécie endofítica que pode estar presente em hospedeiros de diferentes famílias e habitats.

Rodrigues *et al.* (2004) caracterizaram linhagens de *Guignardia mangiferae* através de características morfológicas, dados de sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA, e de ISSR-PCR (*Inter Single Sequence Repeat Anchored Polymerase Chain Reaction*). Os autores tentaram estabelecer uma comparação destes dados com o local de isolamento e com o hospedeiro do qual foram isoladas as linhagens. A variabilidade encontrada não pôde ser associada com a localização geográfica nem com o hospedeiro, quando foram comparados com dados morfológicos e de ISSR-PCR. Algumas linhagens de *Phyllosticta* e *Guignardia* isoladas de hospedeiros não relacionados eram mais semelhantes que linhagens isoladas de hospedeiros extremamente relacionados. Os resultados obtidos pelos

autores reforçam a necessidade da utilização de outros dados, além do hospedeiro, para se estudar a classificação destes fungos.

A distinção morfológica entre *G. mangiferae* (ou *G. endophyllicola*) e *G. citricarpa* é notoriamente difícil, sendo de extrema importância a análise molecular. O uso de sequências específicas para identificação das relações filogenéticas tem representado um grande avanço no estudo de fungos.

Dados da sequência de ITS1-5,8S- ITS2 do rDNA foram utilizados para inferir as relações filogenéticas entre 52 isolados de 16 espécies de *Botryosphaeria* e fungos anamórficos relacionados (ZHOU e STANOSZ, 2001). Com o uso de 6 grupos externos, relacionados a famílias ou ordens, foram obtidas as árvores de distância, parcimônia e máxima verossimilhança. Os resultados indicaram que o gênero *Botryosphaeria* não é monofilético, com *B. vaccinii* e *Phyllosticta vaccinii* não sendo estreitamente relacionados com fungos deste gênero. O principal grupo de espécies de *Botryosphaeria* e fungos anamórficos relacionados apresentou-se dividido em dois clados distintos, aos quais foram propostas duas seções pelos autores. Também foram encontradas algumas divergências de nomenclatura, onde um mesmo nome pode ter sido aplicado em mais de uma espécie, bem como, nomes diferentes podem, efetivamente, ser da mesma espécie. Os autores apontaram para a necessidade de uma revisão taxonômica do gênero *Botryosphaeria*.

Recentemente, várias espécies de *Botryosphaeria* foram identificadas como importantes patógenos em videiras no mundo. Até então, somente a espécie *B. rhodina* tinha sido associada à doença do cancro em *Vitis vinifera*, na Califórnia (ÚRBEZ-TORRES *et al.*, 2006). Os autores utilizaram dados morfológicos e o sequenciamento das regiões ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA e parte do gene da  $\beta$ -tubulina para investigar a presença de *Botryosphaeria* spp. em 1735 amostras de 166 vinhedos do Estado da Califórnia. A análise filogenética revelou pelo menos 7 espécies de *Botryosphaeria* colonizando as videiras, sugerindo que a relação destes fungos com o hospedeiro precisa ser considerada.

Estudos filogenéticos de múltiplos genes indicaram que *Phyllosticta* é o único gênero anamórfico ligado à *Guignardia* (CROUS *et al.*, 2006; DUONG *et al.*, 2007), sendo ambos monofiléticos em *Botryosphaeriaceae*, *Botryosphaeriales* (CROUS *et al.* 2006; SCHOCH *et al.*, 2006; DUONG *et al.*, 2007). A delimitação de espécies em *Phyllosticta*, porém, ainda é difícil e requer estudos futuros.

A filogenia de *Botryosphaeriaceae* realizada com as sequências ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA, parte do gene da  $\beta$ -tubulina e da actina, revelaram padrões de associação de três gêneros anamórficos deste grupo com os hospedeiros dos quais foram isolados (DE WET *et al.*, 2008). *Diplodia*, *Lasiodiplodia* e *Dothiorella* são gêneros de patógenos bem conhecidos, especialmente em espécies de pinheiros e citros, normalmente com conídios escuros, ovóides, com paredes grossas e de difícil distinção entre eles. Para resolver as relações filogenéticas de *Botryosphaeriaceae*, os autores fizeram a genealogia de múltiplos genes, o que separou os 3 gêneros e revelou tendências nos padrões de associação com os hospedeiros. Os resultados indicaram que espécies de *Diplodia* ocorrem principalmente em gimnospermas. *Lasiodiplodia* ocorrem em gimnospermas e angiospermas, e *Dothiorella* são restritas a angiospermas. Através da reconstrução do estado ancestral, os autores sugeriram que o antepassado de *Botryosphaeriaceae* mais provável, evoluiu das angiospermas.

Espécies de *Botryosphaeria* e *Neofusicoccum* são bem conhecidas como patógenos de plantas lenhosas. Lazzizzera *et al.* (2008) estudaram a variabilidade destas espécies, isoladas de lesões em oliveiras nas principais regiões produtoras de azeitona e azeite de oliva, no sul da Itália. As espécies foram identificadas pela morfologia e filogeneticamente, através das sequências ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA e  $\alpha 1$  do fator de alongação da tradução. *Botryosphaeria* e *Neofusicoccum* foram os gêneros mais isolados (60%), sugerindo que estes são os principais contribuintes para a doença. As espécies mais encontradas foram: *B. dothidea* (34%), *N. australe* (16%) e *N. vitifusiforme* (12%). E as menos frequentes foram *N. parvum* e *N. mediterraneum* (1%). Testes de patogenicidade revelaram que as cinco espécies são patogênicas para os dois cultivares testados, sendo *N. vitifusiforme*, *N. australe* e *B. dothidea* as espécies mais agressivas.

Kroon *et al.* (2004) analisaram duas regiões do DNA mitocondrial (citocromo c oxidase e NADH desidrogenase) e duas sequências de genes nucleares ( $\beta$ -tubulina e  $\alpha 1$  do fator de alongação da tradução) de 113 isolados do gênero *Phytophthora*, incluindo 48 espécies. Este gênero é descrito como um importante fitopatógeno, causando um grande impacto na agricultura. Os autores confirmaram a monofilia do gênero e relataram que o agrupamento taxonômico clássico, descrito por Waterhouse (1963), não reflete a relação filogenética verdadeira encontrada. As

espécies foram redistribuídas em 8 clados, representando uma relação mais acurada dentro de *Phytophthora*.

O gênero cosmopolita *Phoma* abrange principalmente fungos fitopatogênicos, parasitas oportunistas e espécies saprófitas. A classificação atual baseia-se somente em caracteres morfológicos. Irinyi, Kövics e Erzsébet (2007) analisaram a região  $\alpha 1$  do fator de alongação da tradução para seis táxons de *Phoma* (*P. exigua* var. *linicola*, *P. pinodella*, *P. eupyrena*, *P. herbarum*, *P. foveata*, e *P. destructiva*). Estas foram comparadas a duas espécies estreitamente relacionadas do gênero *Ascochyta*, dividindo os isolados em dois clados. A árvore filogenética obtida com o EF não suportou a tradicional seção de *Phoma*, criada a partir de caracteres morfológicos.

A seca-da-mangueira é uma grave doença em *Mangifera indica* causada pelo fitopatógeno *Ceratocystis fimbriata* em diversas partes do mundo. AL-SUBHI *et al.* (2006) analisaram *Ceratocystis* spp. isoladas na localidade de Oman (Sultão) e encontraram semelhanças morfológicas com o fungo *Ceratocystis moniliformis*. Entretanto, a filogenia obtida com as sequências ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA,  $\alpha 1$  do fator de alongação da tradução e parte do gene da  $\beta$ -tubulina, revelaram que os isolados que estão causando lesões em manga nesta região pertencem à outra espécie ainda não descrita, denominada pelos autores de *Ceratocystis omanensis* sp. nov..

Kamgan *et al.* (2008), estudaram importantes fitopatógenos dos gêneros *Ceratocystis* e *Ophiostoma*, que estão normalmente associados a insetos. Entretanto, existem poucos relatos da existência desses fungos e a sua importância no continente Africano. Os autores investigaram as sequências ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA,  $\alpha 1$  do fator de alongação da tradução e parte do gene da  $\beta$ -tubulina de linhagens isoladas de feridas, em espécies arbóreas nativas da África do Sul. A análise filogenética revelou duas novas espécies para *Ceratocystis* (*C. savannae* sp. nov. e *C. tsitsikammensis* sp. nov.) e uma para *Ophiostoma* (*O. longiconidiatum* sp. nov.). Testes de patogenicidade da espécie nova, *C. tsitsikammensis*, resultaram em lesões significativas em plantas de *Rapanea melanophloeos*, enquanto que, para *C. savannae* sp. nov., lesões muito pequenas foram observadas em plantas de *Acacia nigrescens* e *Sclerocarya birrea*.

*Lasiodiplodia theobromae* é um patógeno comum que ocorre em um grande número de hospedeiros em regiões tropicais e subtropicais. Alves *et al.* (2008)

analisaram isolados, previamente identificados como *L. theobromae*, através das sequências ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA e  $\alpha 1$  do fator de alongamento da tradução. A análise filogenética identificou três clados bem suportados, um correspondente a *L. theobromae* e os dois outros como potenciais espécies crípticas. A posição filogenética distinta dos dois clados foi corroborada pelas diferenças morfológicas, sendo denominada pelos autores como *Lasiodiplodia pseudotheobromae* sp. nov. e *Lasiodiplodia parva* sp. nov..

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Foram utilizados 453 isolados dos gêneros *Phyllosticta* e seu teleomorfo *Guignardia* (QUADROS 1 a 4), sendo: 34 depositados na coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos (LabGeM) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) (QUADRO 1), 52 cedidos gentilmente pelo Prof. Dr. Antonio de Goes da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) (QUADRO 2), 198 isolados por FABRIS (2009) (QUADRO 3) e 169 isolados pelo autor (QUADRO 4). Todos os isolados encontram-se depositados na coleção do LabGeM.

Do total de isolados analisados no presente trabalho, 251 foram obtidos de lesões da Mancha Preta dos Citros (MPC) em frutos cítricos (QUADROS 1, 2 e 3) e 202 isolados do interior de folhas de citros, manga e outros hospedeiros (QUADROS 1 e 4), pela metodologia de isolamento de fungos endofíticos. Como controle, foram utilizados 3 isolados de *G. mangiferae* e 3 de *G. citricarpa*, com resultados respectivamente, negativo e positivo, em testes de patogenicidade para Mancha Preta dos Citros (BALDASSARI *et al.*, 2008) (QUADRO 1). Como grupo externo foram utilizados 5 isolados de *Phyllosticta spinarum* descritos no QUADRO 1.

LINHAGEM	HOSPEDEIRO	TECIDO	ORIGEM
EC1C	Pittosporaceae	Folha	EUA
EC2C	Zamiaceae	Folha	África do Sul
PC3C, PC6C, PC8C, PC9C, PC10C	<i>Citrus</i> sp.	Folha	África do Sul

QUADRO 1 - LINHAGENS DE *Guignardia* spp. ISOLADAS EM FOLHAS E FRUTOS DE DIVERSOS HOSPEDEIROS E LOCALIDADES (Continua)

LINHAGEM	HOSPEDEIRO	TECIDO	ORIGEM
EC4C	Zamiaceae	Folha	EUA
EC5C	Moraceae	Folha	Tailândia
PC7C	<i>Citrus</i> sp.	Folha	EUA
EC11C	Sapotaceae	Folha	EUA
PC12C	<i>Citrus</i> sp.	Folha	Brasil
EC13C	Lauraceae	Folha	África do Sul
EC14C	Araliaceae	Folha	África do Sul
PC15C	<i>Citrus</i> sp.	Folha	Japão
EC16C	Laranjinha Kinkan	Folha	EUA
EC17C	<i>Citrus</i> sp.	Folha	EUA
PC18C	<i>Citrus</i> sp.	Folha	México
EC19C	Araliaceae	Folha	Costa Rica
EC20C	Rubiaceae	Folha	EUA
EC21C	<i>Camellia japonica</i>	Folha	EUA
B1515	Goiaba	Folha	Distrito Federal
ECLaP <sup>1</sup>	Laranja	Folha	Paranavaí - PR
ECPR3 <sup>2</sup> , ECPR5 <sup>2</sup> , ECPR6 <sup>2</sup> , ECPR8 <sup>2</sup> , ECPR10 <sup>2</sup>	Limão ( <i>Citrus</i> sp.)	Folha	“Rio” Negro - PR
19/05 <sup>3</sup> , 28/05 <sup>4</sup>	Lima Ácida “Tahiti”	Folha	Conchal - SP
01/05 <sup>3</sup> , 22/05 <sup>3</sup> , 32/05 <sup>4</sup>	Lima Ácida “Tahiti”	Fruto	Conchal – SP
33/05 <sup>4</sup>	Laranja “Pera Rio”	Fruto	Conchal - SP

QUADRO 1 - LINHAGENS DE *Guignardia* spp. ISOLADAS EM FOLHAS E FRUTOS DE DIVERSOS HOSPEDEIROS E LOCALIDADES (Conclusão)

NOTA: Linhagens depositadas na coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos (LabGeM) da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Laranjinha Kinkan (*Fortunela margarita*). Goiaba (*Psidium guajava*). Laranja (*Citrus sinensis*). Lima Ácida “Tahiti” (*Citrus latifolia*).

<sup>1</sup>Linhagem isolada por Silvano (2008).

<sup>2</sup>Linhagens de *Phyllosticta spinarum* utilizadas como grupo externo.

<sup>3</sup>Linhagens de *G. mangiferae* com resultado negativo em teste de patogenicidade para MPC (BALDASSARI *et al.* 2008).

<sup>4</sup>Linhagens de *G. citricarpa* com resultado positivo em teste de patogenicidade para MPC (BALDASSARI *et al.* 2008).

LINHAGEM	HOSPEDEIRO	ORIGEM	SINTOMA
IP-5, IP-18.1, IP -23.2, IP -22.2	Laranja “Pera”	Conchal	Mancha Preta
IV-10, IV-26, IV-27, IV-28	Laranja “Valência”	Conchal	Mancha Sardenta
NC-2, NC-5, NC-8, NC-25, NC-30	Laranja “Natal”	Conchal	Mancha Preta
6	Laranja “Pera”	Conchal	Mancha Sardenta
14	Laranja “Natal”	Conchal	Falsa Melanose
IE-8, IE-15, IE-19, IE-24, IE-25	Laranja “Folha Murcha”	Estiva Gerbi	Mancha Preta
IE-4, IE-32	Laranja “Folha Murcha”	Estiva Gerbi	Mancha Sardenta
1	Laranja “Valência”	Rincão	Mancha Trincada
5	Limão “Cravo”	Rincão	Falsa Melanose
62	Laranja “Valência”	Rincão	Mancha Preta
72	Laranja Lima	Rincão	Falsa Melanose
8	Laranja “Natal”	Descalvado	Falsa Melanose
42, 87, 111	Laranja “Natal”	Descalvado	Mancha Sardenta
49, 82	Limão “Cravo”	A.Brasiliense	Mancha Preta
52	Laranja “Valência”	A.Brasiliense	Mancha Trincada

QUADRO 2 - LINHAGENS DE *Guignardia* spp. ISOLADAS DE LESÃO EM FRUTOS CÍTRICOS NO ESTADO DE SÃO PAULO (Continua)



LINHAGEM	HOSPEDEIRO	ORIGEM	SINTOMA
60	Laranja "Hamlim"	A.Brasiliense	Macha Preta
91	Limão "Cravo"	A.Brasiliense	Mancha Trincada
37, 96	Laranja "Natal"	Itápolis	Mancha Oleosa
126	Laranja "Natal"	Itápolis	Mancha Preta
47	Laranja "Natal"	José Bonifácio	Mancha Virulenta,
61	Laranja "Natal"	José Bonifácio	Mancha Preta
123	Laranja "Natal"	José Bonifácio	Falsa Melanose
71	Laranja "Pera"	Ibirá	Falsa Melanose
83	Laranja "Pera"	Ibirá	Mancha Virulenta
18	Laranja "Valência"	Bebedouro	Mancha Preta
19	Laranja "Natal"	Olímpia	Mancha Preta
48, 99	Laranja "Natal"	Holambra	Mancha Trincada
50	Limão "Siciliano"	Porto Ferreira	Mancha Preta
59	Laranja "Natal"	"Rio" Claro	Mancha Preta
84	Laranja "Pera-Rio"	Piratininga	Falsa Melanose
94	Laranja "Natal"	Tambaú	Mancha Sardenta
105	Tangerina "Cravo"	Campinas	Mancha Sardenta

QUADRO 2 - LINHAGENS DE *Guignardia* spp. ISOLADAS DE LESÃO EM FRUTOS CÍTRICOS NO ESTADO DE SÃO PAULO (Conclusão)

NOTA: Linhagens gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Antonio de Goes da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP). Laranja "Pera", "Valência", "Folha Murcha", "Natal", "Hamlim" e Lima (*Citrus sinensis*). Limão "Cravo" (*Citrus limonia*). Limão "Siciliano" (*Citrus limon*). Tangerina "Cravo" (*Citrus reticulata*).

LINHAGEM	HOSPEDEIRO	ORIGEM
FTCA 1, FTCA 3, FTCA 4, FTCA 6, FTCA 8, FTCA 10, FTCA 11	Tangerina "Mexerica"	Cerro Azul - PR
FTMO1.1, FTMO1.2, FTMO1.3, FTMO2.2, FTMO2.3, FTMO3.1, FTMO3.2, FTMO 4.1, FTMO5.1, FTMO5.2, FTMO5.3, FTMO5.4	Tangerina "Montenegrina"	Cerro Azul - PR
FTMi 1.1	Tangerina "Mexerica"	Cerro Azul - PR
FLA5.2, FLA5.3, FLA5.4, FLA5.5, FLA5.7, FLA5.9, FLA 6.2, FLA 6.3, FLA 7.3, FLA 7.5, FLA 7.6, FLA 7.8, FLA 7.10, FLA 9.2, FLA 9.3, FLA 10.1, FLA 10.2, FLA 11.1	Laranja	Cerro Azul - PR
FTP1.2, FTP1.3, FTP1.4, FTP1.5 m1, FTP1.5 m2, FTP1.6, FTP1.9, FTP1.10, FTP2.1, FTP3.3, FTP3.4, FTP3.5, FTP3.6, FTP3.7, FTP3.8, FTP3.9, FTP3.10 m1, FTP3.10 m2, FTP3.11, FTP3.12, FTP3.13, FTP3.15, FTP3.16, FTP3.17, FTP3.19, FTP3.21, FTP3.23, FTP3.24, FTP3.25, FTP3.27 m1, FTP3.27 m2, FTP3.29, FTP 4.3, FTP 4.8, FTP 4.11, FTP 4.21, FTP 4.23, FTP 4.36, FTP 5.1, FTP5.4, FTP6.2, FTP6.3, FTP6.4, FTP6.12, FTP6.14, FTP6.15, FTP6.33, FTP6.35, FTP7.1, FTP7.2, FTP7.4, FTP7.8, FTP7.13, FTP8.2, FTP10.1, FTP10.2, FTP11.3, FTP11.5, FTP11.7, FTP11.8, FTP12.1 FTP12.4, FTP12.6, FTP13.1 FTP13.2, FTP14.1 FTP14.2, FTP14.3, FTP15.1 FTP15.2, FTP15.5, FTP16.2, FTP17.1 FTP17.3, FTP17.7, FTP18, FTP19.1, FTP19.6, FTP20.3, FTP20.4, FTP21.1, FTP21.8, FTP21.12, FTP21.16, FTP21.17, FTP22.4, FTP22.8, FTP23.5, FTP24.5, FTP24.8, FTP24.9, FTP24.14, FTP24.16, FTP25.3, FTP25.5, FTP25.6, FTP25.14, FTP25.16, FTP25.19, FTP26.2, FTP27.1, FTP27.2, FTP27.3, FTP28, FTP29.2, FTP29.6, FTP30.2, FTP30.4	Tangerina "Ponkan"	Cerro Azul - PR
FTMi2.1, FTMi2.4, FTMi2.5, FTMi3.1, FTMi4.1, FTMi5.1, FTMi5.4, FTMi5.6, FTMi5.7, FTMi5.10, FTMi5.11, FTMi6.2, FTMi6.3, FTMi7.2, FTMi7.3, FTMi7.4, FTMi7.5, FTMi7.7, FTMi8.1, FTMi8.3,	Tangerina "Mexerica"	Doutor Ulysses-PR
FLP 1.1, FLP 1.2	Laranja "Pera"	Doutor Ulysses-PR

QUADRO 3 - LINHAGENS DE *Guignardia* spp. ISOLADAS DE LESÃO EM FRUTOS CÍTRICOS NO ESTADO DO PARANÁ (Continua)

LINHAGEM	HOSPEDEIRO	ORIGEM
FTP31, FTP32.5, FTP32.6, FTP32.7, FTP33.1, FTP33.4, FTP33.5, FTP33.8, FTP33.14, FTP33.15, FTP33.16, FTP34	Tangerina "Ponkan"	Doutor Ulysses-PR
FTMO6.1, FTMO6.2, FTMO7.1, FTMO7.4, FTMO7.7, FTMO8.1, FTMO8.2, FTMO8.3, FTMO9.2, FTMO10.2, FTMO10.4, FTMO11.1, FTMO11.3, FTMO12.1, FTMO12.2	Tangerina "Montenegrina"	Doutor Ulysses-PR

QUADRO 3 - LINHAGENS DE *Guignardia* spp. ISOLADAS DE LESÃO EM FRUTOS CÍTRICOS NO ESTADO DO PARANÁ (Conclusão)

NOTA: Linhagens isoladas por FABRIS (2009) e depositadas na coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos (LabGeM) da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Tangerina "Mexerica", "Montenegrina" e "Ponkan" (*Citrus reticulata*). Laranja "Pera" (*Citrus sinensis*).

LINHAGEM	HOSPEDEIRO	ORIGEM
<b>Isolamento I - 08/08/2006</b>		
ECTP 5, ECTP 6.2, ECTP 6.3, ECTP 7, ECTP8.1, ECTP8.2, ECTP8.5, ECTP8.6, ECTP8.7, ECTP9, ECTP11.1, ECTP11.3, ECTP11.4, ECTP12.3, ECTP12.4, ECTP13, ECTP14.3, ECTP15.1, ECTP15.2, ECTP15.4, ECTP15.6, ECTP15.7, ECTP16.1, ECTP16.2, ECTP16.3, ECTP17.1, ECTP17.2, ECTP18, ECTP19.3, ECTP21.1, ECTP21.2, ECTP22, ECTP 23 m1, ECTP 23 m4	Tangerina "Ponkan"	Cerro Azul - PR
<b>Isolamento II - 08/08/06</b>		
ECTP 1, ECTP 2, ECTP 3	Tangerina "Ponkan"	Cerro Azul - PR
ECLi 3, ECLi 5, ECLi 8, ECLi 9, ECLi 10, ECLi 11, ECLi 13, ECLi 14, ECLi 16, ECLi 17, ECLi 18, ECLi 19, ECLi 20, ECLi 21, ECLi 22 m5, ECLi 22 m12, ECLi 22 m13, ECLi 25	Limão "Cravo"	Cerro Azul - PR
FLA 1, FLA 3, FLA 4	Laranja	Cerro Azul - PR
<b>Isolamento III - 09/11/06</b>		
ECLa 3.2, ECLa 4.1, ECLa 4.2, ECLa 5, ECLa 6, ECLa 7.1, ECLa 7.2, ECLa 7.3, ECLa 7.4, ECLa 7.5, ECLa 7.6, ECLa 7.7, ECLa 9.1, ECLa 9.2, ECLa 9.3, ECLa 9.4	Laranja	Cerro Azul - PR

QUADRO 4 - LINHAGENS DE *Guignardia* spp. ISOLADAS EM FOLHAS DE CITROS E MANGA NOS ESTADOS DE SÃO PAULO E PARANÁ (Continua)

LINHAGEM	HOSPEDEIRO	ORIGEM
<b>Isolamento IV - 14/05/07</b>		
EM 1.1, EM 1.2, EM 2, EM 3, EM 4.1, EM 4.2, EM 4.3, EM 5, EM 6, EM 7.1, EM 7.3, EM 7.4, EM 7.5, EM 7.6, EM 8.1, EM 8.2, EM 8.3, EM 8.4, EM 8.5, EM 9.1, EM 9.2, EM 9.3, EM 9.4, EM 9.5, EM 9.6, EM 9.7	Manga	Pompéia - SP
ECLa 10, ECLa 11, ECLa 12.1, ECLa 12.2, ECLa13	Laranja	Pompéia - SP
<b>Isolamento V - 21/07/07</b>		
EM 11.4, EM 12.1, EM 12.2, EM 13.1, EM 13.2, EM 13.3, EM 14.1, EM 14.2, EM 14.3, EM 15.2, EM 15.3, EM 15.4, EM 15.5, EM 16.1, EM 16.5, EM 16.10, EM 17.2, EM 17.4, EM 17.6, EM 18.1, EM 18.2, EM 18.4, EM 18.5, EM 19	Manga	Cerro Azul - PR
ECTMe 2.1, ECTMe 3.3, ECTMe 3.4, ECTMe 4.1	Tangerina "Mexerica"	Doutor Ulysses-PR
ECLiA 1.1, ECLiA 1.2, ECLiA 2, ECLiA 3	Lima Ácida "Tahiti"	Cerro Azul - PR
ECTP 24, ECTP 25	Tangerina "Ponkan"	Doutor Ulysses-PR
<b>Isolamento VI - 31/08/07</b>		
ECTP 26.1, ECTP 26.3, ECTP 26.4, ECTP 26.5, ECTP 26.8, ECTP 26.9, ECTP 26.10, ECTP 27.1, ECTP 27.2, ECTP 27.3, ECTP 27.5, ECTP 27.7	Tangerina "Ponkan"	Cambé - PR
ECTMe 9.2, ECTMe 9.4, ECTMe 9.6, ECTMe 9.7, ECTMe 9.8, ECTMe 9.9, ECTMe 9.10, ECTMe 9.11, ECTMe 9.12, ECTMe 9.13, ECTMe 9.14	Tangerina "Mexerica"	Rolândia - PR
<b>Isolamento VII - 10/11/07</b>		
ECLa 14, ECLa 15, ECLa 16.1, ECLa 16.2, ECLa 18, ECLa 19, ECLa 20	Laranja "Folha Murcha"	Nova América da Colina - PR

**QUADRO 4 - LINHAGENS DE *Guignardia* spp. ISOLADAS EM FOLHAS DE CITROS E MANGA NOS ESTADOS DE SÃO PAULO E PARANÁ (Conclusão)**

NOTA: Linhagens isoladas pelo autor (2009) e depositadas na coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos (LabGeM) da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Tangerina "Mexerica" e Tangerina "Ponkan" (*Citrus reticulata*). Limão "Cravo" (*Citrus limonia*). Laranja e Laranja "Folha Murcha" (*Citrus sinensis*). Manga (*Mangifera indica*). Lima Ácida "Tahiti" (*Citrus latifolia*).

## 4.2 MEIOS DE CULTURA

### 4.2.1 Meio Ágar-Água (AA) acrescido de 3% de MC (item 4.2.5)

Meio completo .....	30 mL
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p. ....	1000 mL
Ágar .....	15 g

Foram acrescentados 3% de meio completo líquido (item 4.2.5) em água destilada. O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH 1N e o ágar acrescentado diretamente aos frascos. O meio foi autoclavado a 121°C, 1 atm, por 20 minutos e armazenado em temperatura ambiente.

### 4.2.2 Meio Ágar de Batata e Dextrose (BDA)

Batata .....	200 g
Dextrose .....	20 g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p. ....	1000 mL
Ágar .....	15 g

As batatas foram descascadas, cortadas em pequenos pedaços e cozidas em 500 mL de água destilada por 20 minutos em forno microondas. As batatas foram descartadas e ao caldo restante acrescentado a dextrose. O volume foi completado para 1000 mL, o pH ajustado para 5,8 com NaOH 1N e o ágar acrescentado diretamente aos frascos. O meio foi autoclavado a 121°C, 1 atm, por 20 minutos e armazenado em temperatura ambiente.

#### 4.2.3 Meio Ágar-Aveia (OA) de Hoekstra e Aptroot (1988)

Aveia em flocos .....	20 g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p. ....	1000 mL
Ágar .....	15 g

A aveia foi adicionada em 1000 mL de água destilada e aquecida por 20 minutos em forno microondas ou por duas horas em fogo baixo. A solução foi filtrada em gaze e o volume completado para 1000 mL. O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH 1N e o ágar acrescentado diretamente aos frascos. O meio foi autoclavado a 121°C, 1 atm, por 20 minutos e armazenado em temperatura ambiente.

#### 4.2.4 Meio Ágar-Citros

Folhas cítricas .....	28 g
Glicose .....	20 g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p. ....	1000 mL
Ágar .....	15 g

As folhas de citros em geral foram pesadas, lavadas em água corrente e autoclavadas em 80% do volume final. As folhas foram descartadas e a glicose acrescentada ao caldo restante. O volume foi completado para 1000 mL, o pH ajustado para 5,8 com NaOH 1N e o ágar acrescentado diretamente aos frascos. O meio foi autoclavado a 121°C, 1 atm, por 20 minutos e armazenado em temperatura ambiente.

#### 4.2.5 Meio Completo (MC) de Pontecorvo *et al.* (1953), modificado por Azevedo e 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> .....	0,01g
ZnSO <sub>4</sub> .....	0,01g
Glicose .....	10 g
Peptona .....	2,0 g
Extrato de levedura .....	2,0 g
Caseína hidrolisada .....	1,5 g
Solução de vitaminas (item 4.3.2) .....	1,0 mL
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p. ....	1000 mL

Todos os ingredientes foram misturados em água destilada sob agitação. O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH 1N. Para MC sólido foram acrescentados 1,5% de ágar. O meio foi autoclavado a 121°C, 1 atm, por 20 minutos e armazenado em temperatura ambiente.

#### 4.2.6 Meio Ágar-Manga

Extrato de folhas de mangueira.....	40 mL
Meio completo .....	1000 mL

Para composição do extrato de folhas de mangueira 50g de folhas foram lavadas em água corrente e batidas no liquidificador em água destilada. O extrato obtido foi filtrado em papel filtro com auxílio da bomba a vácuo. O volume foi

completado para 1000 mL e o pH ajustado para 5,8 com NaOH 1N. O extrato foi então autoclavado a 121°C, 1 atm, por 20 minutos e armazenado a 4°C.

Para o meio Ágar-Manga foram adicionados 40 mL do extrato pronto para cada 1000 mL de meio Completo sólido (item 4.2.5) previamente autoclavado. O meio completo foi fundido em microondas e o extrato líquido adicionado.

### 4.3 SOLUÇÕES E REAGENTES

#### 4.3.1 Fenol Saturado

O fenol cristalizado foi dissolvido em banho-maria a 60° C. Após descongelar foi acrescido um volume de tampão Tris-HCl (0,5M pH 8,0) e Hidroxiquinolina (0,1g/100mL de Fenol). A mistura foi agitada por 15 minutos em Becker vedado com papel filme e coberto com papel alumínio. Após 24 horas de descanso o sobrenadante foi retirado e um volume de Tris-HCl (0,1M pH 8,0) foi adicionado. A mistura foi novamente agitada por 15 minutos em Becker vedado e protegido da luz. Após 24 horas de descanso o sobrenadante foi retirado e o pH aferido com fita de Tornazol. Este procedimento foi repetido até a solução atingir pH 8,0. Em seguida, a fase aquosa foi retirada e adicionado 1/10 do volume final de tampão Tris-HCl (0,1M pH 8,0). A solução foi estocada a 4° C ao abrigo da luz.

#### 4.3.2 Solução de vitaminas

Ácido nicotínico .....	100 mg
Ácido p-aminobenzóico .....	10 mg
Biotina .....	0,2 mg
Piridoxina .....	50 mg
Riboflavina .....	100 mg
Tiamina .....	50 mg



Água destilada esterilizada ..... 100 mL

A solução foi acondicionada em frasco escuro previamente autoclavado, aquecida a 100°C em banho-maria por 15 minutos e armazenada a 4°C.

#### 4.4 ISOLAMENTO

Foram realizados 7 isolamentos independentes em folhas aparentemente saudáveis de plantas cítricas e de mangueira, provenientes dos Estados do Paraná e São Paulo. Algumas plantas cítricas com sintomas da Mancha Preta dos Citros também foram analisadas. As amostras foram coletadas em 6 municípios distintos, sendo 5 localizados no Estado do Paraná e um no Estado de São Paulo, distribuídos geograficamente segundo IBGE (2005), conforme descrição nos QUADROS 5 e 6 e nas FIGURAS 2 e 3. Os hospedeiros e as variedades utilizadas em cada isolamento, bem como, o número de fragmentos foliares analisados, também se encontram descritos nos QUADROS 5 e 6.

ISOLAMENTO	I	II	III	IV
DATA	08/08/06	29/09/06	09/11/06	14/05/07
MUNICÍPIO	Cerro Azul	Cerro Azul	Cerro Azul	Pompéia
ESTADO	Paraná	Paraná	Paraná	São Paulo
MESORREGIÃO GEOGRÁFICA	Metropolitana de Curitiba	Metropolitana de Curitiba	Metropolitana de Curitiba	Marília
MICRORREGIÃO GEOGRÁFICA	Cerro Azul	Cerro Azul	Cerro Azul	Marília
LOCALIDADE	Ribeirão Scheffer	Quarteirão dos Órfãos	Quarteirão dos Órfãos	Colégio Técnico Agrícola
HOSPEDEIRO/VARIEDADE	Limão "Cravo" <sup>a</sup> Tangerina "Mexerica" <sup>a</sup> Tangerina "Montenegrina" <sup>a</sup> Tangerina "Ponkan" <sup>b</sup>	Tangerina "Ponkan"	Laranja	Tangerina (T) Laranja (L) Manga (M)
Nº DE PLANTAS/VARIEDADE	15	33 <sup>c</sup>	10 <sup>d</sup>	7 (T), 15 (L) e 15 (M)
Nº FRAGMENTOS/PLANTA	6	6 a 30	12 a 30	30
Nº FRAGMENTOS TOTAIS/VARIEDADE	90	780	270	210 (T), 450 (L) e 450(M)

QUADRO 5 - REGIÕES GEOGRÁFICAS DE COLETA, HOSPEDEIROS E NÚMERO DE FRAGMENTOS FOLIARES DOS ISOLAMENTOS I, II, III E IV

FONTES: IBGE (2005).

NOTA: <sup>a</sup>Variedade coletada na propriedade Jadir Balles. <sup>b</sup>Variedade coletada na propriedade Comercial Pereira. <sup>c</sup>Entre as 33 plantas coletadas, 8 apresentavam sintomas da MPC. <sup>d</sup>Entre as 10 plantas coletadas, 8 apresentavam sintomas da MPC.

ISOLAMENTO	V	VI	VII
DATA	21/07/07	31/08/07	10/11/07
MUNICÍPIO	Cerro Azul e Dr. Ulysses	Cambé e Rolândia	Nova América da Colina
ESTADO	Paraná	Paraná	Paraná
MESORREGIÃO GEOGRÁFICA	Metropolitana de Curitiba	Norte Central Paranaense	Norte Pioneiro Paranaense
MICRORREGIÃO GEOGRÁFICA	Cerro Azul	Londrina	Cornélio Procópio
LOCALIDADE	Cerro Azul Sete Quedas do Meio Matão	Floresta Verde I (FVI) Floresta Verde II (FVII) Umbehaum III (UIII)	Sítio Sato I Sítio Sato II Sítio Santo Antônio
VARIEDADES	Lima Ácida "Tahiti" <sup>a</sup> Laranja "Pera Valência" <sup>b</sup> Tangerina "Mexerica" <sup>b</sup> Tangerina "Murcote" <sup>b</sup> Tangerina "Ponkan" <sup>b</sup> Tangerina "Montenegrina" <sup>c</sup> Manga <sup>d</sup>	Tangerina "Ponkan" (TP) <sup>e</sup> Tangerina "Mexerica Rio" (TM) <sup>f</sup>	Laranja "Folha Murcha" <sup>g</sup> Laranja "Navelina" <sup>g</sup> Laranja "Pera Rio" <sup>h</sup>
Nº DE PLANTAS/VARIEDADE	10	TP: 20 (FVI) e 15 (FVII) TM: 40 (UIII)	10
Nº FRAGMENTOS/PLANTA	18	6	18
Nº FRAGMENTOS TOTAIS/VARIEDADE	180	120 e 90 (TP) 240 (TM)	180

QUADRO 6 - REGIÕES GEOGRÁFICAS DE COLETA, HOSPEDEIROS E NÚMERO DE FRAGMENTOS FOLIARES DOS ISOLAMENTOS V, VI E VII

NOTA: <sup>a</sup>Variedade coletada no município de Cerro Azul na propriedade Odair Andrigheto em dois pomares distintos, um em produção e outro abandonado. <sup>b</sup>Variedade coletada no município de Dr. Ulysses, região Sete Quedas do Meio, na propriedade Anibal Gilhete. <sup>c</sup>Variedade coletada no município de Dr. Ulysses, região Matão, na propriedade Rozélio Gilhete. <sup>d</sup>Variedade coletada no município de Cerro Azul na propriedade IAPAR. <sup>e</sup>Variedade coletada no

município de Cambé, sendo 20 plantas na propriedade Floresta Verde I e 15 na propriedade Floresta Verde II. <sup>f</sup>Variedade coletada no município de Rolândia na propriedade Umbeaum III. <sup>g</sup>Variedade coletada na propriedade Sítio Sato I, em pomar sem sintoma da MPC e com aplicação de fungicida 40 dias antes da coleta. <sup>h</sup>Variedade coletada nas propriedades Sítio Sato II e Sítio Santo Antônio, em pomares sem sintoma da MPC e com aplicação de fungicida uma semana antes da coleta.

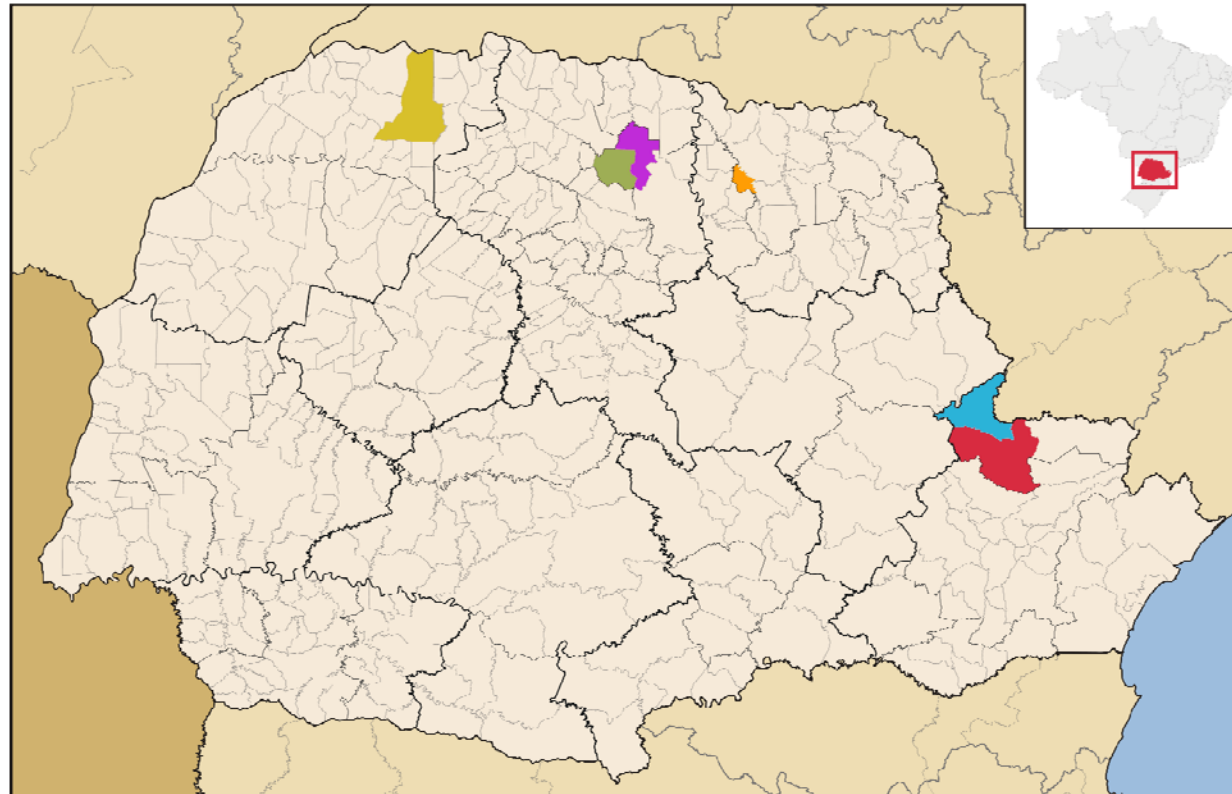
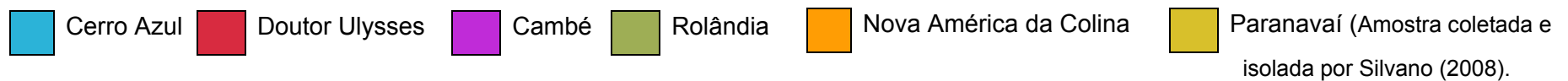


FIGURA 2 - ÁREA DE COLETA DAS AMOSTRAS NO ESTADO DO PARANÁ

FONTE: IBGE (2005).



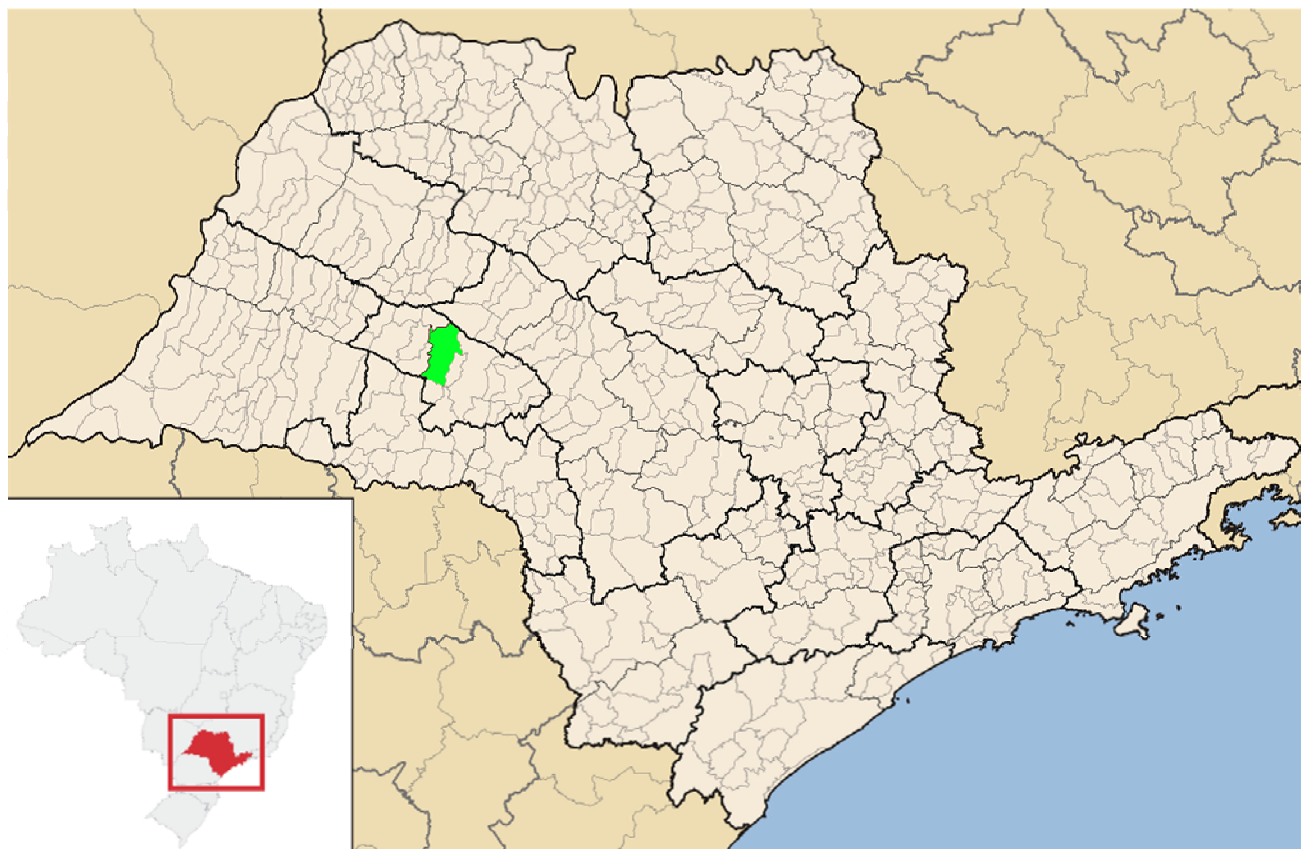


FIGURA 3 - ÁREA DE COLETA DAS AMOSTRAS NO ESTADO DE SÃO PAULO

FONTE: IBGE (2005).

 Pompéia

Os fungos foram isolados de plantas aparentemente saudáveis, seguindo a metodologia descrita por Petrini (1986), adaptada por Glienke (1995) e com algumas modificações. As folhas foram superficialmente desinfetadas por meio de imersão em etanol 70% por 1 minuto, tratamento com NaClO 3% por 6 minutos, etanol 70% por 30 segundos e posterior lavagem em água destilada por 6 minutos. Após a desinfestação externa as folhas foram cortadas assepticamente em 6 fragmentos (5mm x 5mm). Estes foram transferidos para placas de Petri contendo BDA (item 4.2.2) adicionado de tetraciclina (100 µg/mL), para impedir o crescimento bacteriano, e incubados a 22°C. As placas foram observadas diariamente quanto ao aparecimento de isolados de *Guignardia* e *Phyllosticta*, e os fungos transferidos para tubos com MC (item 4.2.5) inclinado, e incubados a 28°C.

As frequências de isolamento dos fungos dos gêneros *Guignardia* e *Phyllosticta* foram obtidas através da relação entre o número total de isolados e o número total de fragmentos incubados (SOUZA *et al.*, 2004).

A denominação dos isolados obtidos foi atribuída de acordo com a metodologia de isolamento (folhas ou frutos), a espécie hospedeira, a variedade e a planta. Os isolados oriundos de folhas, através da metodologia de isolamento de endofíticos, receberam a inicial “E”. Já os isolados obtidos de lesão da MPC em frutos, receberam a inicial “F”. As demais iniciais alfabéticas que acompanham os isolados referem-se à espécie do hospedeiro ao qual foram isolados, seguidos pela sua variedade. A numeração que sucede estas iniciais alfabéticas indica a planta em que o isolado foi obtido, seguido do respectivo número do isolado. Por exemplo, o isolado ECTMe9.4 (QUADRO 4 - vide Material Biológico) foi isolado de folha pela metodologia endofítica (E), de uma espécie de citros (C), da variedade Tangerina “Mexerica” (TMe), sendo o quarto isolado da planta 9.

Para fins de publicação, a denominação dos isolados seguiu a padronização adotada no Laboratório de Genética de Microrganismos (UFPR), descrita no ANEXO 2.

#### 4.5 OBTENÇÃO DE COLÔNIAS MONOSPÓRICAS

Foram obtidas colônias monospóricas de todos os isolados obtidos no presente trabalho. Os fungos foram inoculados em meio AA (item 4.2.1) próximos a fragmentos foliares de citros ou manga, previamente autoclavados, e incubados à 28°C. Após aproximadamente 15 dias de crescimento, os picnídios formados sobre as folhas foram coletados com o auxílio de uma agulha e colocados em tubos tipo *Eppendorf* contendo 300 µL de água destilada autoclavada. A solução foi agitada em *Vortex*, para liberação dos esporos das estruturas de reprodução, e a concentração estimada em Câmara de Neubauer. Os tubos foram centrifugados e as possíveis hifas precipitadas através de um *spin*. A solução foi então plaqueada em meio BDA (item 4.2.2) e incubada a 28°C, por aproximadamente 10 dias. Após a germinação dos esporos, procedeu-se o isolamento das colônias monospóricas para posterior extração de DNA.

#### 4.6 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Os isolados foram analisados morfológicamente quanto às estruturas de reprodução e comparados com isolados de *G. citricarpa*, *G. mangiferae* e *Phyllosticta spinarum*. Os isolados foram crescidos em placas com meio Aveia-Ágar (item 4.2.3) contendo um fragmento de caule de lupin (*Lupinus* sp.) (CROUS e SAMSON, 2009) e incubados a temperatura ambiente. Após esporulação as estruturas foram removidas e observadas em microscopia com *Differential Interference Contrast* (DIC), acrescidas de ácido láctico com e sem azul de algodão, e fotodocumentadas utilizando o *software NIS-Elements Dongle 3.0*.

#### 4.7 CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras analisadas no presente trabalho foram conservadas em meio Ágar-Citros (item 4.2.4) ou meio Ágar-Manga (4.2.6), de acordo com os respectivos hospedeiros, e estocados a 4°C.

Os repiques foram realizados mensalmente e os isolados depositados na coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos (LabGeM) da UFPR.

#### 4.8 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi realizada de acordo com Reader e Broda (1985), modificado por Blanco (1999).

Fragmentos de micélio foram inoculados em MC (item 4.2.5), a 28°C por quatro a cinco dias. O micélio foi coletado com o auxílio de uma espátula e liofilizado por 48 horas. Após liofilização o micélio foi triturado em Grau de porcelana com adição de nitrogênio líquido. A cada grama de micélio 6 mL de tampão de extração (Tris-HCl pH 8,0 200 mM, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 1% p/v), aquecido a 70°C, foram acrescentados e a mistura incubada por 20 minutos à mesma temperatura. A desproteínização foi realizada em três passos: tratamento com um fenol saturado (item 4.3.1), Clorofane (Fenol - Clorofórmio, 1:1 v/v) e Clorofil (Clorofórmio - Álcool isoamílico, 24:1 v/v), sempre na proporção 1:1. Cada tratamento foi seguido de centrifugação a 5000 rpm por 15 minutos e coleta da fase aquosa. Os ácidos nucleicos foram precipitados com um volume de Isopropanol por uma hora a -16°C. Após este período, a solução foi centrifugada a 10000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante desprezado e o precipitado lavado em etanol 70%. Os tubos foram invertidos para a secagem do DNA, e este ressuspendido cuidadosamente em 100 µL de tampão TE (Tris-HCl, pH 8,0 10mM, EDTA, pH 8,0 1mM).

A integridade do DNA extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) e visualizada com brometo de etídeo (0,00005% p/v) em luz



ultravioleta. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro de massa e diluído para uso na concentração de 10 ng/ $\mu$ L.

#### 4.9 SEQUENCIAMENTO DAS REGIÕES ITS1-5,8S-ITS2 DO rDNA E $\alpha$ 1 DO FATOR DE ELONGAÇÃO

##### 4.9.1 Amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal

A reação foi realizada com os *primers* V9G e ITS4 (QUADRO 7), que são universais para fungos e permitem amplificar a região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal (FIGURA 4).

<b>PRIMER</b>	<b>SEQUÊNCIA</b>
V9G <sup>1</sup>	5' TTACGTCCCTGCCCTTTGTA 3'
ITS4 <sup>2</sup>	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'
EF1-728F <sup>3</sup>	5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG 3'
EF-2 <sup>3</sup>	5' GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT 3'

#### QUADRO 7 - SEQUÊNCIAS DOS *PRIMERS* UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO E NO SEQUENCIAMENTO DAS REGIÕES ITS1-5,8S-ITS2 DO rDNA E $\alpha$ 1 DO FATOR DE ELONGAÇÃO

FONTE: De Hoog e Gerrits Van Den Ende (1998)<sup>1</sup>. White e Morrow (1990)<sup>2</sup>. Carbone e Kohn (1999)<sup>3</sup>.

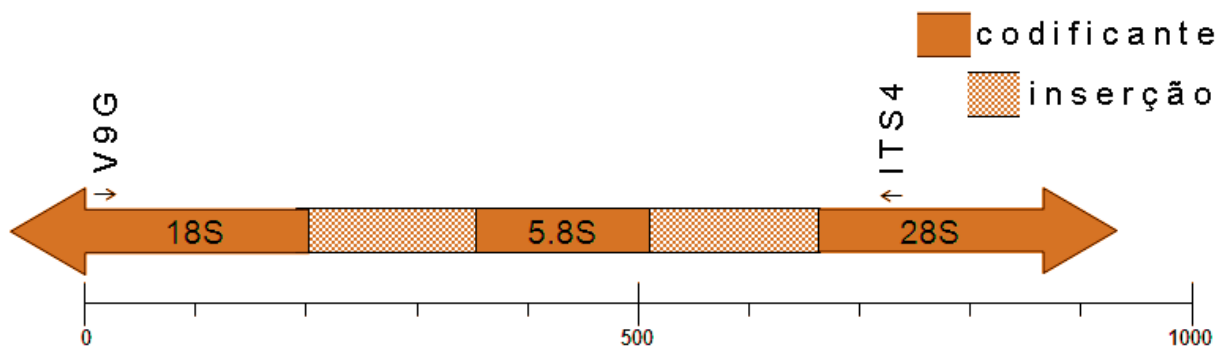


FIGURA 4 - REGIÃO ITS1-5,8S-ITS2 DO DNA RIBOSSOMAL

NOTA: Gene que codifica o RNA ribossômico com 475 pb, sendo 158 pb codificantes.

FONTE: O autor.

As condições da reação foram as descritas por Stringari e Waculicz-Andrade (2008), com algumas modificações: 50 ng de DNA, tampão PCR 1x, 1,5U de *Taq* polimerase, 0,06  $\mu$ M de *primers* (3 pmol/reação), 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de  $MgCl_2$ , e volume final de 50  $\mu$ l.

A amplificação foi realizada em termociclador *Eppendorf*<sup>®</sup> (Modelo: *Mastercycler Gradient*), com desnaturação inicial a 94° C por 2 minutos; 35 ciclos de 30 segundos a 94° C, 1 minuto a 55° C, 1 minuto a 72° C; seguida de extensão final de 3 minutos a 72° C.

Os produtos da amplificação da PCR foram visualizados e quantificados em gel de agarose 1% (p/v) com o marcador de massa *Low DNA Mass Ladder* (*Invitrogen*<sup>®</sup>).

#### 4.9.2 Amplificação da região $\alpha$ 1 do Fator de Elongação

A reação foi realizada com os *primers* EF1-728F e EF-2 (QUADRO 7 - vide item 4.8.1), que amplificam a região  $\alpha$ 1 do gene que codifica o fator de elongação da tradução (FIGURA 5).

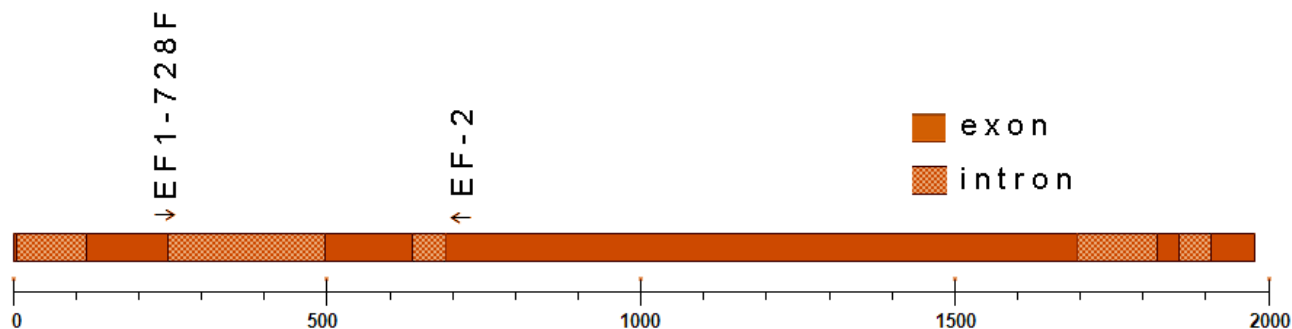


FIGURA 5 - DETALHE DO GENE QUE CODIFICA A REGIÃO  $\alpha$ 1 DO FATOR DE ELONGAÇÃO

NOTA: Gene que codifica o fator de alongação  $\alpha$ -1 com 1975 bp, sendo 1383 pb codificantes para 461 aminoácidos.

FONTE: O autor.

As condições da reação foram realizadas com as seguintes condições: 50 ng de DNA, tampão PCR 1x, 1,5U de *Taq* polimerase, 0,06  $\mu$ M de *primers* (3 pmol/reação), 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de  $MgCl_2$ , e volume final de 50  $\mu$ L.

A amplificação foi realizada em termociclador *Eppendorf* (Modelo: *Mastercycler Gradient*), com desnaturação inicial a 94° C por 2 minutos; 35 ciclos de 30 segundos a 94° C, 1 minuto a 55° C, 1 minuto a 72° C; seguida de extensão final de 3 minutos a 72° C.

Os produtos da amplificação da PCR foram visualizados e quantificados em gel de agarose 1% (p/v) com o marcador de massa *Low DNA Mass Ladder* (*Invitrogen*®).

#### 4.9.3 Purificação do DNA

Aos produtos da amplificação das PCRs, com os *primers* descritos no QUADRO 7, foram acrescentados 50  $\mu$ L de PEG (PEG 20%, NaCl 2,5M) e incubados a 37°C por 30 minutos. Após este período, os tubos foram centrifugados por 20 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi descartado e ao restante foi adicionado 125  $\mu$ L de etanol 80% gelado. Após 1 minuto em etanol 80% os tubos

foram centrifugados a 13000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao restante adicionado 125  $\mu$ L de etanol absoluto gelado pela parede do tubo. Novamente o sobrenadante foi descartado e o restante do etanol evaporado. O *pellet* resultante foi ressuspensionado em 15  $\mu$ L de água ultrapura e deixado a temperatura ambiente por pelo menos 2 horas.

Após purificação, os produtos da PCR foram quantificados em gel de agarose 1% (p/v) com o marcador de massa *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen®).

#### 4.9.4 Reação de Sequenciamento

O sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA e da região  $\alpha$ 1 do Fator de Elongação foi realizado pelo método de terminação de cadeia segundo SANGER; NICKLEN e COULSON (1977), utilizando a incorporação de dideoxynucleotídeos fluorescentes, em Seqüenciador Automático de DNA.

As reações de sequenciamento foram realizadas em placas envolvidas em papel alumínio com pouca luz incidente. Para reação foram utilizadas de 50 a 100 ng do produto da PCR purificado, 0,25  $\mu$ M do *primer* V9G (QUADRO 7 - vide item 4.8.1), 2  $\mu$ L da mistura para sequenciamento ET (kit: *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE* da Amersham Biosciences®) e água ultrapura quando necessária para completar um volume final de 10  $\mu$ L.

As mesmas condições foram aplicadas para os *primers* ITS4, EF1-728F e EF-2 (QUADRO 7 - vide item 4.8.1).

A amplificação foi realizada em termociclador *Eppendorf*® (Modelo: *Mastercycler Gradient*), seguindo uma desnaturação inicial a 94° C por 2 minutos; 35 ciclos de 20 segundos a 94° C, 15 segundos a 50° C e 1 minuto a 60° C.

#### 4.9.5 Purificação da Reação de Sequenciamento

Ao produto da reação de sequenciamento foram adicionados 1  $\mu$ L de acetato de amônio 7,5M e 27,5  $\mu$ L de etanol absoluto. A placa de sequenciamento foi

fechada e o conteúdo misturado por inversão por 30 vezes. A placa foi então centrifugada por 45 minutos a 2500 rcf e o sobrenadante descartado. Após um *spin down* (com a placa invertida em papel toalha) a 500 rcf, adicionou-se 100 µL de etanol 70% recém preparado. Seguiu-se uma centrifugação a 2500 rcf com a placa aberta. O sobrenadante foi novamente descartado e um *spin down* a 750 rcf foi realizado. As amostras foram colocadas na estufa a 37°C por 3 minutos e 10 µL de *Loading Solution* (kit: *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE* da *Amersham Biosciences*®) foram adicionados a cada reação. A placa foi fechada com adesivo, envolvida em papel alumínio e agitada no vórtex por 1 minuto. Após um *spin* a 2500 rcf, a placa foi submetida à eletroforese em Sequenciador Automático de DNA modelo *MegaBACE* (*Amersham Biosciences*®).

Os parâmetros de eletroforese selecionados durante o sequenciamento foram: voltagem de injeção de 2kV, tempo de injeção de 100 segundos, voltagem da corrida de 6kV e tempo de corrida de 240 minutos.

As corridas efetuadas foram analisadas através de programas disponíveis no pacote de *softwares* do *MegaBACE*. O *Sequence Analyser* gerou os eletroferogramas de cada isolado e através do programa *ScoreCard* foram obtidas as informações estatísticas de cada seqüência, como número de nucleotídeos obtidos e a eficiência.

#### 4.9.6 Edição e Análise das Sequências

A edição das seqüências obtidas foi realizada com auxílio do programa MEGA versão 4.0 (TAMURA *et al.*, 2006) e posterior inspeção visual através do programa BioEdit versão 7.0 (HALL, 2005). As seqüências obtidas foram alinhadas pelo programa MAFFT versão 6 (*Multiple alignment program for nucleotide sequences*) e foram comparadas com outras seqüências existentes no banco de dados (NCBI, 2003), pelo programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997), o qual permite detectar similaridade de uma seqüência biológica com seqüências caracterizadas já existentes. 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.

#### 4.9.7 Análise Filogenética

Após a edição, alinhamento e análise prévia das sequências, estas foram submetidas ao *software* MEGA versão 4.0 (TAMURA *et al*, 2006) para obtenção das árvores filogenéticas baseadas em distância. Para reconstrução filogenética da topologia e a estimativa dos ramos foi utilizado o algoritmo *Neighbor-joining* (NJ).

Na análise da região ITS e 5,8S do rDNA dos isolados de *G. citricarpa* foram utilizadas como referência 2 linhagens de *G. citricarpa* depositadas no *Genbank*, com registros gi|28625524|gb|AF346772.1 e gi|20378202|gb|AF374371.1.

#### 4.10 VARIABILIDADE GENÉTICA

##### 4.10.1 RAPD

##### 4.10.1.1 Amplificação do DNA

As reações foram realizadas de acordo com as condições descritas por Glienke-Blanco *et al.* (2002), contendo: 50 ng da DNA, tampão PCR 1x, 1,5 U de *Taq* polimerase, 0,4 mM de *primers*, 0,2 mM de cada dNTP, 3 mM de MgCl<sub>2</sub> e um volume final de 25 µL. Foram utilizados os *primers* da linha OPX 11, 14, 17 e 19 (*Operon Technologies*®), descritos no QUADRO 8.

<b>PRIMER</b>	<b>SEQUÊNCIA</b>
OPX 11	5' GGAGCCTCAG 3'
OPX 14	5' ACAGGTGCTG 3'
OPX 17	5' GACACGGACC 3'
OPX 19	5' TGGCAAGGCA 3'

QUADRO 8 - SEQUÊNCIAS DOS *PRIMERS* UTILIZADOS NO RAPD

FONTE: *Operon Technologies*®

A amplificação foi realizada de acordo com as condições otimizadas por GLIENKE-BLANCO *et al.* (2002): desnaturação inicial a 94° C por 4 minutos; 40 ciclos de 1 minuto a 94° C, 1,5 minuto a 37° C, e 2 minutos a 72° C; extensão final de 3 minutos a 72° C. Para esta reação foi utilizado um termociclador *Eppendorf®* (Modelo: *Mastercycler Gradient*).

#### 4.10.1.2 Análise da Variabilidade Genética

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese (3 V/cm) em gel de agarose 1,5% (p/v) e posteriormente corados por 20 minutos em solução de brometo de etídeo (0,00005% p/v) e fotografado sob luz UV. Como marcador de peso molecular foi utilizado DNA *ladder* de 100pb.

Na análise da variabilidade genética dos marcadores RAPD obtidos foi utilizado o *software* NTSYS (*Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs*), de acordo com os princípios adotados em taxonomia numérica (ROHLF, 1988).

As bandas resultantes da amplificação foram analisadas com base em variáveis binárias, onde 0 indica ausência de banda e 1 presença. Utilizando o *software* NTSYS, a partir da matriz binária foi construída uma matriz de similaridade utilizando o coeficiente de Jaccard (J). Este coeficiente permite calcular similaridades com base em variáveis binárias. As bandas foram consideradas como variáveis, enquanto as linhagens como unidades. O coeficiente foi calculado segundo a fórmula  $J=M/P$ , onde M é o número de concordâncias positivas, e P o número total de variáveis, menos as concordâncias negativas (SNEATH e SOKAL, 1973).

A partir da matriz de similaridade, as unidades foram agrupadas através do método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*), que é um modelo hierárquico que permite a construção de dendrogramas.

Para verificação da confiabilidade dos agrupamentos do dendrograma, foi realizada uma análise *bootstrap* com 10.000 reamostragens, segundo descrito por Felsenstein (1985), utilizando o *software* BOOD (COELHO, 2005). Foram considerados consistentes os agrupamentos que apresentaram **P** maior ou igual a 95%, sendo **P** a frequência de determinado agrupamento no conjunto dos dendrogramas resultantes das repetições *bootstrap*.

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) foi realizada utilizando o software Arlequin 3,0 (EXCOFFIER *et al.*, 2005).

#### 4.11 IDENTIFICAÇÃO POR MARCADOR MORFOLÓGICO

A identificação morfológica dos isolados endofíticos de *Guignardia* e *Phyllosticta* e dos isolados patogênicos de *G. citricarpa* foi realizada de acordo com Baayen *et al.* (2002).

As colônias foram inoculadas em meio Ágar-Aveia (item 4.2.2) e incubadas por 7 a 10 dias, a 22°C na ausência de luz. Os isolados foram analisados quanto à presença ou ausência de um halo amarelo ao redor da colônia.

Foram testados 365 isolados de *Guignardia* e *Phyllosticta*, 6 linhagens controle com teste de patogenicidade (3 *G. citricarpa* e 3 *G. mangiferae*) segundo Baldassari *et al.* (2008) e 5 linhagens de *Phyllosticta spinarum* (QUADROS 1 a 4).



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ISOLAMENTO

O primeiro isolamento (Isolamento I) foi realizado em folhas assintomáticas de citros, coletadas em duas propriedades da região da Serra (Ribeirão Scheffer), município de Cerro Azul - PR, com alta incidência da doença MPC, conforme dados apresentados no QUADRO 5 (item Materiais e Métodos). O número de isolados do gênero *Phyllosticta* (*Guignardia*) e sua respectiva frequência encontram-se descritos na TABELA 3.

TABELA 3 - HOSPEDEIRO, NÚMERO E FREQUÊNCIA ESTIMADA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO GÊNERO *Phyllosticta* OBTIDO NO ISOLAMENTO I

Planta hospedeira	Nº de isolados	Frequência (%)
Tangerina "Mexerica" (ECTMe)	10	11,1
Tangerina "Montenegrina" (ECTMo)	17	18,9
Limão "Cravo" (ECLi)	42	46,7
Tangerina "Ponkan" (ECTP)	29	32,2
<b>Total</b>	<b>98</b>	<b>27,2</b>

NOTA: Frequência calculada de acordo com Souza *et al.* (2004).

Observa-se que, dentre os 98 isolados de *Phyllosticta* spp. obtidos de plantas cítricas, a maior frequência (46,7%) foi observada em plantas de limão "Cravo". E, entre as variedades de tangerineira, a maior frequência foi observada em tangerina "Ponkan", sendo quase três vezes superior a observada para variedade Mexerica. Para caracterização morfológica e molecular, foram utilizados 21, dos 98 isolados, sendo 18 provenientes de limão "Cravo" e 3 de tangerina "Ponkan". Estes isolados foram caracterizados empregando-se o marcador morfológico meio Ágar-Aveia (BAAYEN *et al.*, 2002), os marcadores RAPD e o sequenciamento das regiões ITS e EF. Dentre os 21 isolados, 76,2% foram classificados como *G. citricarpa* e 23,8%

como *G. mangiferae*, sendo esta última, presente apenas em folhas de limão “Cravo”.

O isolamento II foi realizado em folhas com e sem sintomas da MPC, coletadas em uma propriedade da região de Quarteirão dos Órfãos, município de Cerro Azul - PR (QUADRO 5), com alta incidência da doença MPC. As amostras foliares foram coletadas em 33 plantas de tangerina “Ponkan” apresentando frutos com sintomas da MPC. Foram obtidos 108 isolados do gênero *Phyllosticta* dentre os 780 fragmentos analisados, resultando em uma frequência estimada de 13,8% (APÊNDICE 1).

Os dados referentes à frequência de isolamento de *Phyllosticta* spp. a partir de folhas de tangerineira “Ponkan” com ou sem sintomas da MPC encontram-se apresentados na TABELA 4. Observa-se, conforme tais dados, que a maior frequência de isolamento de *Phyllosticta* (61,1%) deu-se a partir de folhas sintomáticas, sendo praticamente o dobro quando comparado àquelas obtidas de folhas assintomáticas.

TABELA 4 - IDENTIFICAÇÃO DA PLANTA E FREQUÊNCIA DE ISOLAMENTO DE *Phyllosticta* spp. A PARTIR DE FOLHAS DE TANGERINEIRA “PONKAN” COM OU SEM SINTOMAS APARENTES DA MPC

Planta	Frequência (%)	
	Sem sintoma	Com sintoma
6	50,0	58,3
10	8,3	8,3
17	33,3	61,1
21	0	33,3
31	8,3	25,0
<b>Total</b>	<b>20,0</b>	<b>39,4</b>

NOTA: Frequência calculada de acordo com Souza *et al.* (2004).

Comparando-se isolados da mesma planta, a partir de folhas assintomáticas e de folhas com sintomas da MPC, foi possível observar que as maiores frequências de *Phyllosticta* spp (39,4%), foram obtidas de folhas com sintomas (TABELA 4). A partir dos 108 isolados obtidos (APÊNDICE 1), 34 deles, sendo 27 de folhas de

tangerineira assintomática, e 7 de plantas com sintomas aparentes, foram caracterizados morfológica e molecularmente. De acordo com os resultados (TABELA 5), observa-se que, independente dos antecedentes, em termos de presença ou não de sintomas aparentes da MPC, foram obtidos isolados de *G. citricarpa* e, principalmente de *G. mangiferae*.

TABELA 5 - FREQUÊNCIA DE ISOLADOS DE *Guignardia citricarpa* E *G. mangiferae* OBTIDOS DE FOLHAS DE TANGERINEIRA “PONKAN” COM E SEM SINTOMAS APARENTES DA MPC

	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. citricarpa</i>	Total
<b>Com sintoma</b>	85,7 (6)	14,3 (1)	20,6 (7)
<b>Sem sintoma</b>	63,0 (17)	37,0 (10)	79,4 (27)
<b>Total</b>	67,7 (23)	32,3 (11)	100,0 (34)

NOTA: Valores em porcentagem. Entre parênteses valores absolutos. Teste de significância com p-valor = 0,3829. Classificação obtida pelo marcador morfológico meio Ágar-Aveia, por marcadores RAPD e pelo sequenciamento das regiões ITS e EF.

A partir de tecidos de plantas aparentemente assintomáticas e de plantas com sintoma foram obtidos maior número de isolados de *G. mangiferae* (23) do que *G. citricarpa* (11). Comparando-se o isolamento de *Guignardia* a partir de tecidos de plantas com e sem sintomas, apesar de terem sido obtidos mais isolados de plantas sem sintomas (79,4%) do que de plantas com sintomas (20,6%), esta diferença não foi significativa apresentando p-valor de 0,3829.

O isolamento III também foi realizado em plantas com e sem sintomas da MPC, em uma propriedade da região de Quarteirão dos Órfãos, município de Cerro Azul - PR (QUADRO 5). As amostras foliares foram coletadas em 10 plantas de laranjeira, sendo duas assintomáticas e 8 com algum sintoma aparente. Do total de 270 fragmentos, foram obtidos 32 isolados do gênero *Phyllosticta*, resultando em uma frequência estimada de 11,8% (APÊNDICE 2). Para caracterização foram analisados 16 isolados do total obtido neste isolamento. Dentre os 16 isolados, 15 são provenientes das 8 plantas com sintoma aparente e apenas um é oriundo de uma das 2 plantas assintomáticas.

A TABELA 6 apresenta a relação entre a presença ou ausência de sintomas aparentes nas folhas de laranjeira das quais os fungos do gênero *Phyllosticta* foram isolados e a sua respectiva classificação.

TABELA 6 - FREQUÊNCIA DE ISOLADOS DE *Guignardia citricarpa* E *G. mangiferae* OBTIDOS DE FOLHAS DE LARANJEIRA COM E SEM SINTOMAS APARENTES DA MPC

	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. citricarpa</i>	Total
<b>Com sintoma</b>	86,7 (13)	13,3 (2)	93,8 (15)
<b>Sem sintoma</b>	0,0 (0)	100,0 (1)	6,3 (1)
<b>Total</b>	81,3 (13)	18,8 (3)	100,0 (16)

NOTA: Valores em porcentagem. Entre parênteses valores absolutos. Teste de significância com p-valor = 0,1856. Classificação obtida pelo marcador morfológico meio Ágar-Aveia, por marcadores RAPD e pelo sequenciamento das regiões ITS e EF.

De forma semelhante ao observado no isolamento II, a partir de tecidos com e sem sintomas foram obtidos maior número de isolados de *G. mangiferae* (13) do que *G. citricarpa* (3). Comparando-se o isolamento de *Guignardia* a partir de tecidos de plantas com e sem sintomas, apesar de terem sido obtidos mais isolados de plantas com sintomas (93,8%) do que de plantas sem sintomas (6,3%), esta diferença não foi significativa apresentando p-valor de 0,1856.

No isolamento IV, cujas amostras foliares foram coletadas em pomares sadios de citros e mangueira no município de Pompéia - SP, foram obtidos 48 isolados de *Phyllosticta* spp. (TABELA 7).

TABELA 7 - HOSPEDEIRO, NÚMERO E FREQUÊNCIA ESTIMADA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO GÊNERO *Phyllosticta* OBTIDO NO ISOLAMENTO IV

<b>Planta hospedeira</b>	<b>Nº de isolados</b>	<b>Frequência (%)</b>
Tangerina (ECT)	8	3,8
Laranja (ECLa)	9	2,0
Manga (EM)	31	6,7
<b>Total</b>	<b>48</b>	<b>4,3</b>

NOTA: Frequência calculada de acordo com Souza *et al.* (2004).

De acordo com os resultados obtidos, a maior frequência de isolamento deu-se a partir de folhas de mangueira (6,7%). E, comparando-se o isolamento de *Phyllosticta* spp. a partir de folhas das duas espécies cítricas, observa-se que a maior frequência ocorreu a partir de tangerineira, sendo praticamente o dobro daquela obtida em folhas de laranjeira. Para caracterização morfológica e molecular foram analisados 31 dos 48 isolados obtidos, sendo 5 de laranjeira e 26 de mangueira. Os resultados revelaram que 35,5% dos isolados obtidos neste isolamento são *G. mangiferae* e, 64,5% pertencem a uma outra espécie de *Phyllosticta* ainda não descrita na literatura. Esta nova espécie foi encontrada somente em folhas de mangueira e correspondem a 77% dos isolados neste hospedeiro.

O isolamento V foi realizado em folhas aparentemente saudáveis de citros e mangueira, coletadas na região do Vale do Ribeira, nos municípios de Cerro Azul e Dr. Ulysses - PR, conforme dados apresentados no QUADRO 6 (item Materiais e Métodos). A partir dos tecidos foliares coletados foram obtidos 191 isolados (TABELA 8). Dentre os hospedeiros analisados, incluindo várias espécies cítricas e mangueira, a maior frequência de isolamento deu-se a partir desse último, com 44,4%. Dentre as espécies cítricas, em níveis bem abaixo àquele observado em mangueira, destacam-se a tangerina “Mexerica”, com 27,2%, e a tangerina “Ponkan”, com 13,9%.

TABELA 8 - NÚMERO E FREQUÊNCIA ESTIMADA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO GÊNERO *Phyllosticta* OBTIDO NO ISOLAMENTO V

Planta hospedeira	Nº de isolados	Frequência (%)
Lima Ácida <sup>1</sup>	16	8,9
Lima Ácida <sup>2</sup>	9	5,0
Manga	80	44,4
Tangerina "Montenegrina"	4	2,2
Tangerina "Mexerica"	49	27,2
Laranja "Pera-Valência"	3	1,7
Tangerina "Murcote"	5	2,8
Tangerina "Ponkan"	25	13,9
<b>Total</b>	<b>191</b>	<b>13,3</b>

NOTA: <sup>1</sup>Pomar abandonado (sem tratamento). <sup>2</sup>Pomar em produção. Frequência calculada de acordo com Souza *et al.* (2004).

Em relação à espécie Lima Ácida "Tahiti", ainda que a frequência de isolamento de *Phyllosticta* tenha sido baixa (8,9% e 5,0%), quando comparada as demais variedades cítricas, observa-se que a frequência foi mais elevada a partir de folhas de plantas onde não são realizadas práticas culturais, incluindo o uso de fungicidas, do que de folhas de plantas com algum tipo de tratamento (5,0%). Dessa forma, ainda que a representatividade da amostra seja consideravelmente baixa, a possível influência das práticas culturais na sobrevivência do fungo não pode ser subestimada.

Para caracterização morfológica e molecular foram analisados 34 isolados dos 191 obtidos neste isolamento. Os resultados revelaram que 55,9% dos isolados caracterizados são *G. mangiferae*, 29,4% pertencem a uma outra espécie de *Phyllosticta* sp. e 14,7% são *G. citricarpa*. Da mesma forma que o observado para o isolamento IV, a nova espécie de *Phyllosticta* foi encontrada somente em folhas de mangueira e correspondem a 41,7% dos isolados neste hospedeiro, sendo os demais identificados como *G. mangiferae*.

O isolamento VI foi realizado em folhas aparentemente saudáveis de tangerineira, coletadas na mesorregião norte central do Paraná, nos municípios de Cambé e Rolândia (QUADRO 6). As amostras foliares de Cambé foram coletadas na variedade Ponkan, em duas localidades distintas. Em Rolândia, as amostras foliares foram coletadas de tangerina "Mexerica-Rio". A TABELA 9 apresenta o número e a

frequência estimada dos fungos endofíticos do gênero *Phyllosticta* obtidos neste isolamento.

TABELA 9 - NÚMERO E FREQUÊNCIA ESTIMADA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO GÊNERO *Phyllosticta* OBTIDO NO ISOLAMENTO VI

Planta hospedeira	Nº de isolados	Frequência (%)
Tangerina "Ponkan" <sup>1</sup>	13	10,8
Tangerina "Ponkan" <sup>2</sup>	17	18,9
Tangerina "Mexerica-Rio"	22	9,2
<b>Total</b>	<b>52</b>	<b>11,5</b>

NOTA: <sup>1</sup>Propriedade Floresta Verde I. <sup>2</sup>Propriedade Floresta Verde II. Frequência calculada de acordo com Souza *et al.* (2004).

Para caracterização morfológica e molecular foram selecionados 23 dos 52 isolados obtidos neste isolamento. Os resultados da identificação revelaram a presença somente da espécie *G. mangiferae* neste hospedeiro.

O isolamento VII foi realizado em folhas aparentemente sadias de laranja, coletadas na mesorregião norte pioneiro do Paraná, no município de Nova América da Colina (QUADRO 6). As amostras foliares foram coletadas nas variedades "Folha Murcha", "Navelina" e "Pera-Rio", em três localidades distintas.

A TABELA 10 apresenta o número e a frequência estimada dos fungos endofíticos do gênero *Phyllosticta* obtidos neste isolamento.

TABELA 10 - NÚMERO E FREQUÊNCIA ESTIMADA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO GÊNERO *Phyllosticta* OBTIDO NO ISOLAMENTO VII

Planta hospedeira	Nº de isolados	Frequência (%)
Laranja "Folha Murcha" <sup>1</sup>	59	32,7
Laranja Navelina <sup>1</sup>	49	27,2
Laranja "Pera" Rio <sup>2</sup>	20	11,1
Laranja "Pera" Rio <sup>3</sup>	2	1,1
<b>Total</b>	<b>130</b>	<b>18</b>

NOTA: <sup>1</sup>Propriedade Sítio Sato 1. <sup>2</sup>Propriedade Sítio Sato II. <sup>3</sup>Propriedade Santo Antônio. Frequência calculada de acordo com Souza *et al.* (2004).

Foram analisados 7 dos 130 isolados obtidos neste isolamento. Os resultados identificaram todos como pertencentes à espécie *G. mangiferae*.

A TABELA 11 apresenta a comparação entre as frequências de colonização de *Phyllosticta* sp. e *Guignardia* spp. nos sete isolamentos realizados.

TABELA 11 – FREQUÊNCIAS DE COLONIZAÇÃO DE *Phyllosticta* sp. E *Guignardia* spp. EM DIFERENTES HOSPEDEIROS E LOCALIDADES

LOCALIDADES	<i>C. reticulata</i>	<i>C. sinensis</i>	<i>C. limonia</i>	<i>C. latifolia</i>	<i>M. indica</i>
<b>Cerro Azul-PR</b>	15,62	11,85	46,67	6,94	8,89
<b>Dr. Ulysses-PR</b>	11,53	1,67	-	-	-
<b>Cambé-PR</b>	14,29	-	-	-	-
<b>Rolândia-PR</b>	9,17	-	-	-	-
<b>Nova América da Colina-PR</b>	-	18,06	-	-	-
<b>Pompéia-SP</b>	3,81	2,00	-	-	6,89

NOTA: Valores em porcentagem. (-): ausência de isolados no hospedeiro e localidade. Frequência calculada de acordo com Souza *et al.* (2004).

A maior frequência obtida entre os isolamentos (46,67%) foi encontrada em plantas de limão “Cravo” (*Citrus limonia*) em Cerro Azul, seguida por laranja (*Citrus sinensis*) coletada em Nova América da Colina, com frequência de 18,06%.

Nas variedades de tangerineira (*Citrus reticulata*), a frequência de *Phyllosticta* e *Guignardia* isoladas em plantas da região Noroeste do Paraná (14,29% e 9,17%), praticamente não diferiu das isoladas no Vale do Ribeira (15,62% e 11,53%), onde há alta incidência da doença MPC.

As menores frequências de isolamento foram encontradas em plantas de laranja (*Citrus sinensis*), com 2,00% em Pompéia-SP e 1,67% em Dr. Ulysses-PR, embora em Nova América da Colina a colonização tenha sido expressivamente superior.

A nomenclatura dos isolados obtidos nestes sete isolamentos está descrita no QUADRO 4 (vide Materiais e Métodos). Para fins de publicação, a denominação dos isolados seguiu a padronização adotada no Laboratório de Genética de Microrganismos (UFPR), descrita no ANEXO 2. Como citado anteriormente, todos foram caracterizados molecularmente através de marcadores RAPD e



sequenciamento da região ITS e EF, tornando possível a comparação entre os métodos utilizados, a elucidação das espécies e a sua relação com a frequência de isolamento. Análises morfológicas também foram realizadas segundo a metodologia descrita por Baayen *et al.* (2002) e serão discutidas a seguir.

## 5.2 ANÁLISE TAXONÔMICA E DE DIVERSIDADE GENÉTICA

### 5.2.1 Sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA e do EF- $\alpha$ 1

Visando a análise da distância genética e taxonômica dos isolados, foi realizado o sequenciamento das regiões ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA e  $\alpha$ 1 do fator de alongação de 124 isolados. Comparando-se as sequências obtidas com aquelas depositadas no banco de dados NCBI, os isolados foram identificados como *G. citricarpa* quando apresentaram identidade igual ou superior a 98% com as sequências da mesma espécie depositadas no *Genbank*. Igualmente, foi utilizado o valor de identidade superior a 97% com sequências de *G. mangiferae* para a classificação destes isolados.

A FIGURA 6 apresenta a árvore filogenética de distância com os dados colapsados e o APÊNDICE 3 apresenta a árvore com os dados detalhados. Ambos foram obtidos pela análise conjunta das sequências ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA e do gene  $\alpha$ 1 do Fator de Elongação, e revelam a separação dos isolados em 4 grupos monofiléticos.

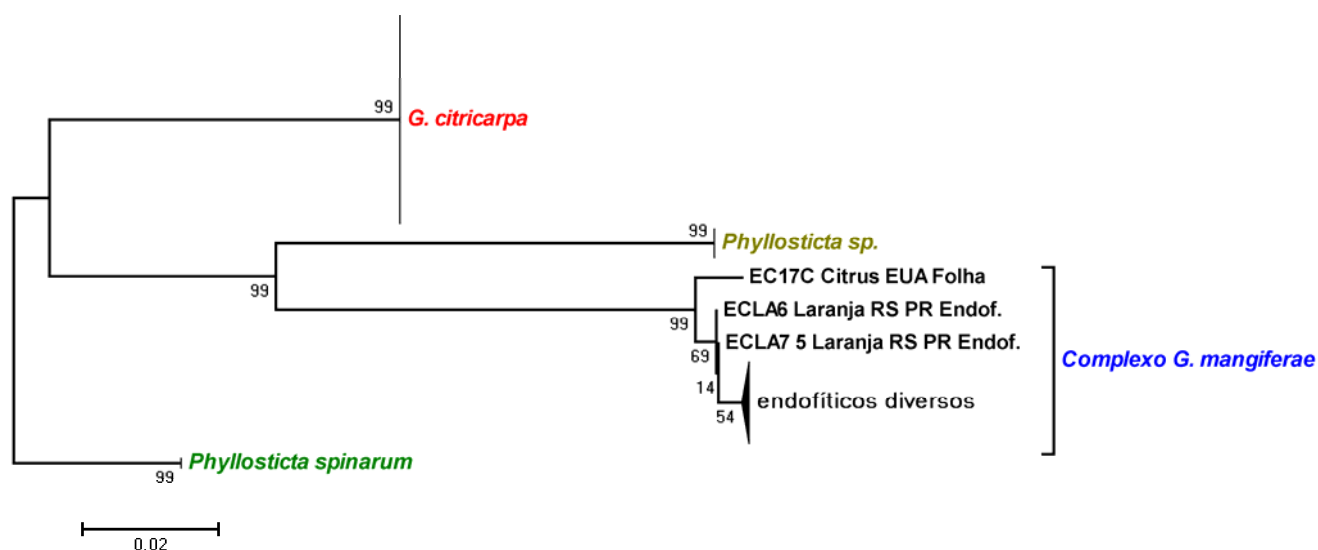


FIGURA 6 - ÁRVORE FILOGENÉTICA COLAPSADA OBTIDA COM AS SEQUÊNCIAS ITS1-5.8S-ITS2 DO rDNA E  $\alpha 1$  DO FATOR DE ELONGAÇÃO

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Árvore filogenética com 124 isolados obtida pelo método de distância por Neighbor-Joining. 76 isolados foram classificados como *G. citricarpa*, 33 como *G. mangiferae*, 11 como *Phyllosticta* sp. e 4 *P. spinarum* como grupo externo. Para árvore detalhada ver APÊNDICE 3.

O primeiro grupo é formado por isolados praticamente idênticos de *G. citricarpa*. Esta similaridade de sequência é surpreendente, uma vez que tais isolados são provenientes de diferentes regiões (Estados brasileiros e diferentes países), variedades cítricas, tipos de sintomas de Mancha Preta dos Citros e época de isolamento (entre os anos de 1997 e 2008). Além disso, os isolados obtidos de lesões da MPC são idênticos aos obtidos do interior de folhas cítricas. Tais resultados demonstram uma alta especificidade do patógeno com o hospedeiro e ausência de variabilidade destes isolados. Wulandari *et al.* (2009), mediante estudo realizado em frutos de pomelos provenientes da Ásia, com sintomas semelhantes a MPC, observaram a existência de uma nova espécie de *Phyllosticta*. De acordo com os autores, por meio de sequências ITS e dos genes do EF e da actina, os isolados mostraram-se diferentes geneticamente das demais espécies de *Guignardia* conhecidas, sendo denominada como *Phyllosticta citriasiana*.

Nas plantas e pomares investigados no presente estudo, não foram obtidos isolados com características genéticas semelhantes às descritas por Wulandari *et al.* (2009). Entretanto, mesmo com as diferenças bioecológicas entre os países

asiáticos e os da América do Sul, a possibilidade da ocorrência de *P. citriasiana* não pode ser descartada, ainda que a cultura do pomelo seja realizada em pequena escala comercial no país. Assim, a ausência desta espécie no presente trabalho, pode ser explicada por duas hipóteses: 1) a espécie é específica de frutos de pomelo e não coloniza as demais plantas investigadas; 2) a espécie tem distribuição exclusiva na Ásia. Nenhuma das duas hipóteses pode ser descartada neste trabalho, uma vez que não foram utilizadas linhagens provenientes da Ásia e nem isoladas de pomelo. Sugere-se a investigação de linhagens provenientes de pomelo no Brasil a fim de testar tais hipóteses.

O segundo maior grupo observado (FIGURA 6 e APÊNDICE 3) corresponde a isolados de *G. mangiferae*, provenientes de diferentes hospedeiros (variedades cítricas, mangueira e guanxuma), diversas regiões e anos de isolamento. Neste grupo é possível observar variabilidade genética, sem, entretanto, estar associada à procedência dos isolados. É interessante observar que isolados obtidos como endófitos de manga em Pompéia - SP são idênticos a isolados endófitos de citros no Paraná, como por exemplo, os isolados EM9.7 e ECLi9 (APÊNDICE 3). Tais resultados demonstram a ausência de especificidade desta espécie com os hospedeiros. Ao contrário do observado para *G. citricarpa*, *G. mangiferae* pode ser isolada como endófitica de plantas da vegetação espontânea circundante aos pomares cítricos.

Tal diversidade de hospedeiros já foi observada por Okane, Nakagiri e Ito (2001), Baayen *et al.* (2002), Rodrigues *et al.* (2004) e Wulandari *et al.* (2009) e revela a necessidade de mais estudos com o objetivo de distinção de espécies neste complexo.

O terceiro grupo é formado por 60% dos isolados obtidos em folhas de mangueira. Estes isolados foram identificados como *Phyllosticta* sp., uma vez que a identidade observada foi inferior a 93% com sequências de *Phyllosticta* e *Guignardia* depositadas no *Genbank*. Analisando as sequências destes isolados foi identificada a presença de um *intron* autocatalítico do Grupo I, com 451 pb (FIGURA 7), na porção terminal da região 18S do rDNA (FIGURA 8).

18S:TTAGTGAGGCCTTCGGACTGGCTCAGGGAGGTCGGCAACGACCACCCAGAGCCGGAAAGT  
 TCGTCAAACACTACGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGT **TTCCGTA**CCACAGGTGCGGA  
 TCACTGCTTCAGTGATCCTTCCGCGGTGACGCCTACAGAAGCCTTTGTGCCCTCGCAAGAGGAG  
 ATTTCTGGCGACTCTAAACAAGCAGAACGCGCAAGTCGCGGCTCCGGCCGCGGCGACACTTTCG  
**AATTGCGGG**GACATCCTTAGAGCTCTGCCTACCAAGCCGGGGTGGAAACACGCCCGGTGGCCC  
 ATGTTAACAGCATGGGGTACGGTAAAAAGGGTAGAGATTGGGT**AATCCGCAG**CCAAGCTCCTAA  
 GGGCCTTCCGGGGCCACGGAGAAG**GTTACACAGACTAA**GTGGAAGTGGGCTGCGCCTTCGGGC  
 GTGGCT**TAAGATATAGTC**GGGCCCTCGCCGAAACGGCGAGGGGTAGTCACCGCAGCGGCCCTG  
**CGAGCTTCCGAGCACGCAGGAACCGGCCGCTACTACCAATGATAAACCG** **TTCCGTA**GGTGAAC  
 CTGCGGAAGGATCATTA



FIGURA 7 - *INTRON* AUTOCATALÍTICO DO GRUPO I PRESENTE NA PORÇÃO TERMINAL DA REGIÃO 18S DO rDNA NAS LINHAGENS DE *Phyllosticta* sp. ISOLADAS DE MANGA

FONTE: O autor.

NOTA: seqüência da linhagem EM3 com 1609 pb

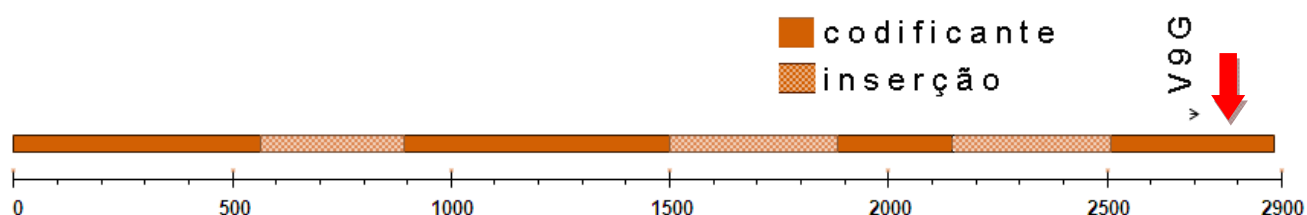


FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA A SUBUNIDADE MENOR DO RNA RIBOSSOMAL

FONTE: O autor.

NOTA: Gene com 2880pb sendo 1083pb codificantes. **V9G**: local de hibridação do *primer* utilizado no sequenciamento. Seta vermelha indica a localização do *intron*.

Tal *intron* apresenta as seqüências conservadas caracterizadas como elementos P, Q, R e S, necessárias para a auto-excisão no processamento pós-transcricional do rRNA 18S (YAMADA *et al.*, 1994).

Com base em diferenças nos mecanismos de *splicing* e na ocorrência de motivos conservados na sua estrutura primária e secundária, os *introns* são classificados em quatro grandes grupos: grupo I, grupo II, mRNA nuclear e enzimáticos (PAQUIN; SHUB, 2001). Os *introns* do grupo I são de particular

interesse porque muitos membros são capazes de se auto-excisar e também por serem elementos genéticos móveis.

Os *introns* do grupo I apresentam uma ampla distribuição filogenética, podendo ser encontrados em mitocôndrias, plastídeos e núcleos de uma ampla variedade de eucariotos e alguns vírus, bem como, em bactéria e seus fagos. No entanto, eles ainda não foram detectados em *Archaea*, um dos três domínios conhecidos. Nas mitocôndrias e cloroplastos, estão inseridos em uma ampla variedade de RNAs e genes que codificam proteínas, sem qualquer preferência aparente para os genes em que estão inseridos, tendendo, no entanto, a inserção em regiões conservadas filogeneticamente. Em contraste, os *introns* nucleares de eucariotos são restritos a genes do rRNA, com exceção de bactéria, onde as sequências integradas só foram encontradas em tRNA (PAQUIN; SHUB, 2001).

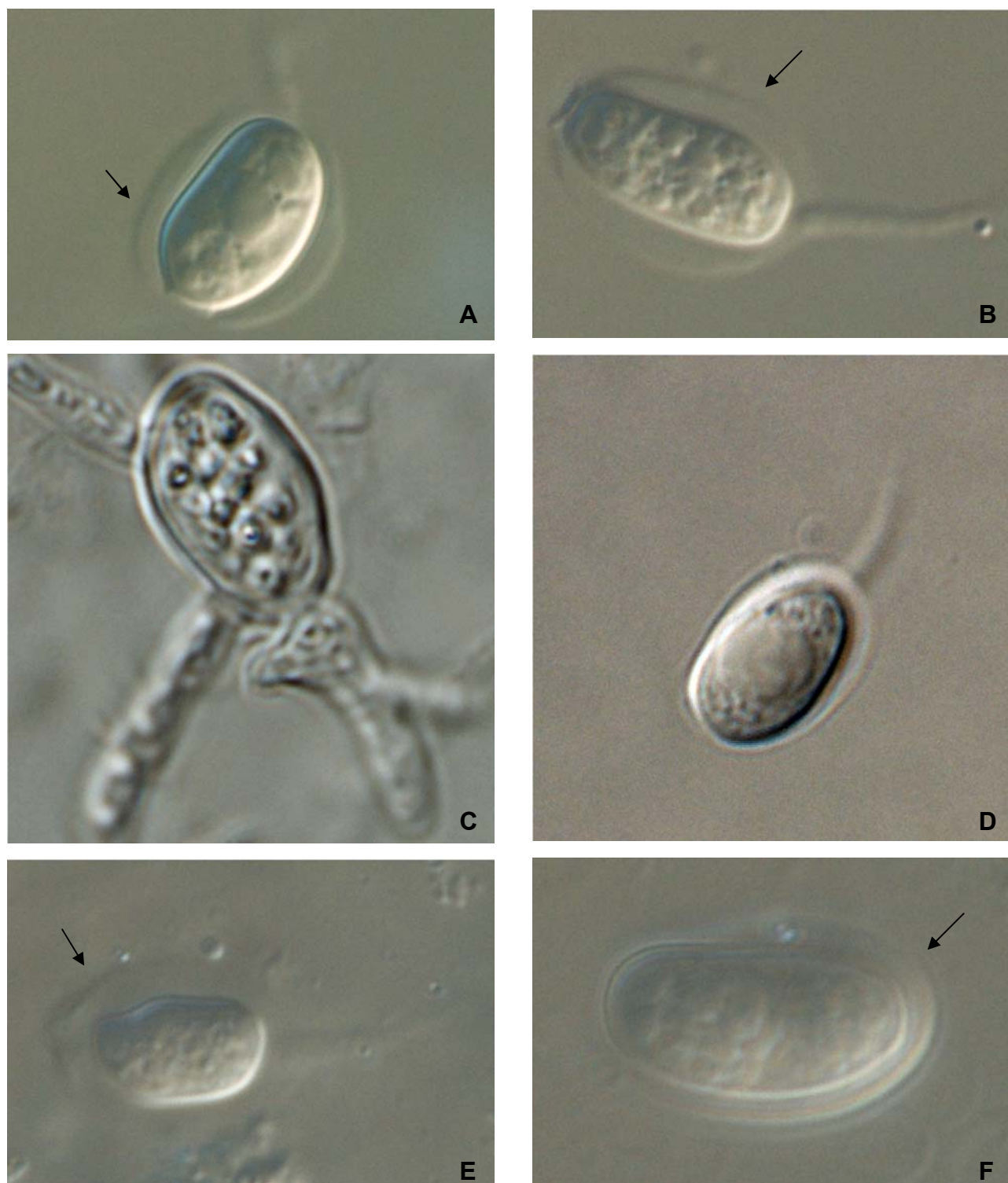
Yamada *et al.* (1994) relataram a ocorrência de um *intron* auto-catalítico do grupo I em vírus que infectam algas eucarióticas do gênero *Chlorella*, coletadas no Japão. Os autores encontraram todas as características conservadas das estruturas primárias e secundárias, descritas para o grupo de *introns* IB. Contrastando com os *introns* nucleares do grupo I eucarióticos, que se localizam nos genes de rRNA, estes foram encontrados em genes que codificam proteínas. Um deles estava inserido no *exon* que codifica uma proteína com significativa homologia ao fator de tradução eucariótico TFIS, podendo ser importante para expressão de genes virais. O outro *intron* identificado estava inserido em um quadro de leitura aberta (*open reading frame* - ORF) de 14,2 kDa, com funções desconhecidas (*unidentified frame* – URF). A distribuição difundida desses *introns* entre as espécies virais e a sua semelhança estrutural com os *introns* do grupo I de algas e protistas, indicam uma transmissão horizontal. Desta forma, esses *introns* virais eucarióticos oferecem uma oportunidade de entender como os *introns* do grupo I estão presentes em organismos de diferentes reinos filogenéticos.

Como a origem e a distribuição dos *introns* do grupo I encontrados em rRNAs nucleares não eram bem compreendidas, Bhattacharya *et al.* (1994) analisaram os *introns* presentes na subunidade menor do rRNA de diversas espécies, incluindo 9 sequências da ordem *Zygnematales* (*Charophyceae*). As análises filogenéticas sugeriram que uma transferência horizontal tenha ocorrido na história evolutiva dos *introns* do grupo I e que, após a transferência, alguns desses elementos podem formar componentes estáveis dos genomas nucleares dos hospedeiros. O *intron* em

*Zygnematales*, que compartilha um sítio de inserção comum (posição 1506 em relação ao *intron* da subunidade menor do rRNA de *Escherchia coli*), forma uma subfamília do grupo I que, após a sua origem, foi herdado através de ancestralidade comum. Desde a primeira *Zygnematales* no registro fóssil do período Devoniano, o *intron* do grupo I “1506”, presumivelmente, foi um componente estável da região codificante da subunidade menor do rRNA deste grupo, por 350-400 milhões de anos.

O grupo de isolados que apresentou o *intron* do grupo I no presente trabalho foi isolado apenas de folhas sadias de mangueira, nos municípios de Cerro Azul-PR e Pompéia-SP. Em Cerro Azul, 41,7% do total de endofíticos obtidos em mangueira foram identificados como *Phyllosticta* sp., enquanto em Pompéia o valor encontrado foi de 77%. Tais isolados apresentaram somente a fase assexuada, sem a formação de ascos em meio de cultura (FIGURA 9), contrastando com os demais endofíticos isolados do mesmo hospedeiro (FIGURA 10).

Na FIGURA 10 encontram-se presentes as estruturas de reprodução sexuada e assexuada de *G. mangiferae*, revelando semelhanças com os conídios de *Phyllosticta* sp. (FIGURA 9). Baayen *et al.* (2002) descreveram que a mucilagem que recobre os conídios em *G. mangiferae* é mais espessa do que a encontrada em *G. citricarpa*. O mesmo foi evidenciado para os isolados 59 e EM2, obtidos de fruto de laranja “Natal” e folha da mangueira, respectivamente (FIGURA 11).



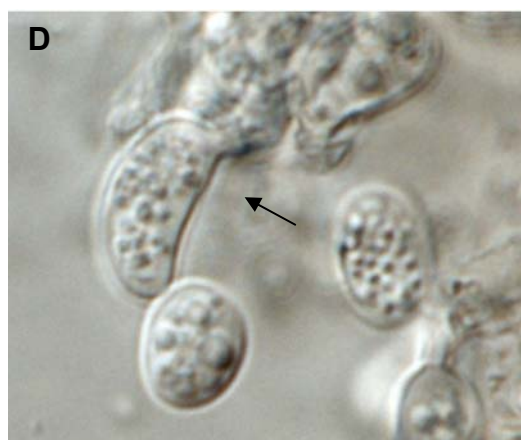
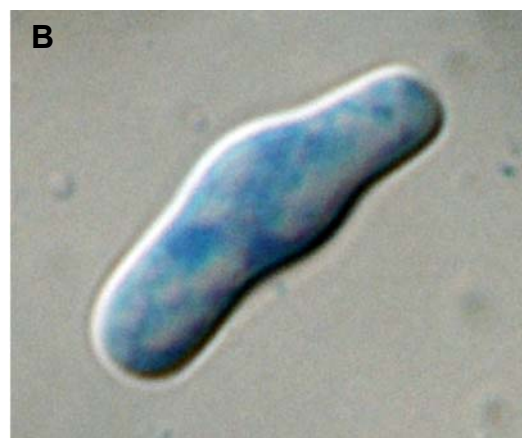
**A e B:** EM 1.1    **C:** EM 8.4    **D:** EM 8.5    **E:** EM 9.4    **F:** EM 9.6

FIGURA 9 - ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO ASSEXUADA DE *Phyllosticta* sp. ISOLADAS DE FOLHAS ASSINTOMÁTICAS DE MANGUEIRA

FONTE: O autor.

NOTA: Microscopia por contraste de fases. Aumento: 1000 x. Setas indicando a presença de mucilagem espessa ao redor dos conídios.





**A e B:** estrutura sexuada  
**C e D:** estrutura assexuada

**FIGURA 10 - ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO SEXUADA E ASSEXUADA DE *G. mangiferae* ISOLADAS DE FOLHAS ASSINTOMÁTICAS DE MANGUEIRA**

FORNE: O autor.

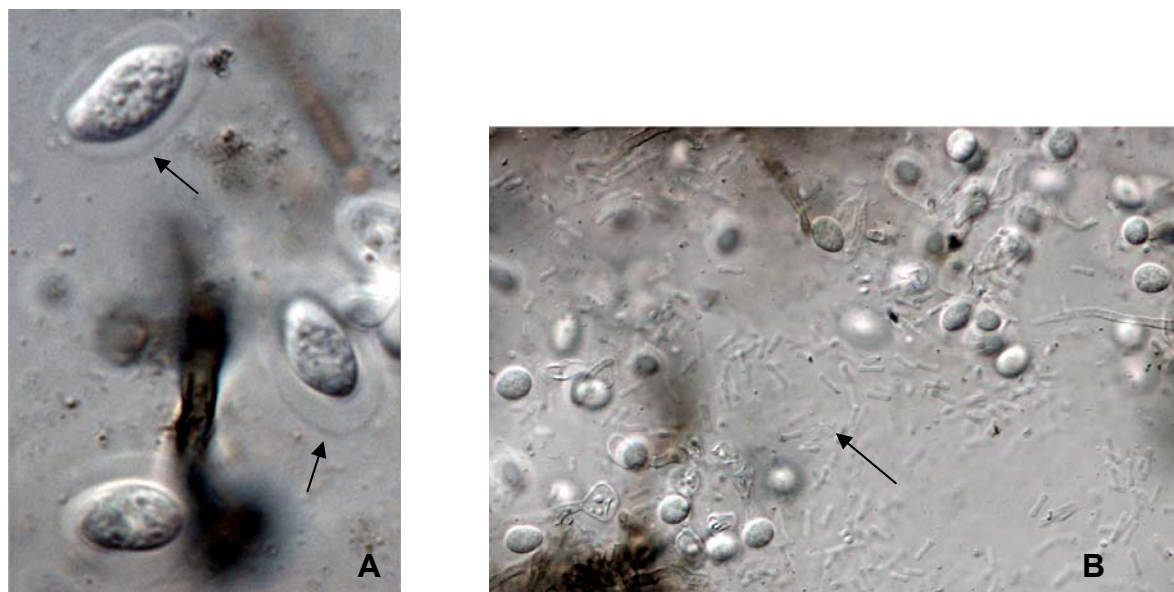
NOTA: Microscopia por contraste de fases.

**A:** pseudotécio com ascos na forma da clava, contendo 8 ascósporos em seu interior. Isolado EM 2. Aumento: 400 x.

**B:** ascósporo do isolado EM 2. Aumento: 1000 x.

**C e D:** conidióforo com conídios globosos em formação do isolado EM 14. Aumento: 1000 x.





**A:** *G. mangiferae*

**B:** *G. citricarpa*

**FIGURA 11 - ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO ASSEXUADA DE *G. mangiferae* E *G. citricarpa* ISOLADAS DE FOLHA DE MANGUEIRA E EM LESÕES DA MPC EM FRUTO DE LARANJEIRA**

FONTE: O autor.

NOTA: Microscopia por contraste de fases.

**A:** seta indicando conídios com mucilagem espessa do endofítico EM 2, isolado de folhas assintomáticas de manga no Estado do Paraná. Aumento: 1000 x.

**B:** conídios com pouca mucilagem do patógeno 59, obtido de lesão da MPC em fruto de laranja "Natal", no Estado de São Paulo. Seta indica a presença de microconídios (espermácios) em forma de halteres. Aumento: 400 x.

Tais resultados não permitem a identificação destes isolados, os quais podem, inclusive, pertencer a uma nova espécie. Interessante observar a ausência de variabilidade entre estes isolados, mesmo provenientes de plantas localizadas nos Estados do Paraná e São Paulo. Tal fato e o isolamento exclusivamente de plantas de manga, podem indicar a especificidade destes isolados com o hospedeiro, da mesma forma que o observado entre *G. citricarpa* e as plantas cítricas. Este panorama é completamente contrastante com o observado para os isolados de *G. mangiferae*. Tal espécie é relatada como endofítica de uma grande variedade de hospedeiros (KOTZÉ, 1981; OKANE, NAKAGIRI e ITO, 2001; BAAYEN *et al*, 2002; GLIENKE-BLANCO *et al.*, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2004; STRINGARI, 2004) e como patogênica em plantas de manga (*Mangiferae indica*) (VALA *et al.*, 1989; MENEZES e OLIVEIRA, 1993; BIOSECURITY AUSTRALIA, 2009) e orquídea

(OKANE, NAKAGIRI e ITO, 2001). Entretanto, nenhum dos autores relatou a realização de testes de patogenicidade com estes isolados. Desta forma, em função dos resultados aqui obtidos, sugere-se que os isolados identificados como *Phyllosticta* sp. podem estar associados a alguma patologia em mangueira, ao contrário dos isolados de *G. mangiferae*, aparentemente não patógenos desse hospedeiro.

Com o objetivo de testar tal hipótese e tentar elucidar a relação dos isolados de *G. mangiferae* e *Phyllosticta* sp. com as plantas de mangueira, tais isolados foram enviados para o Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP em Piracicaba/SP e ensaiados em teste de patogenicidade em frutos de mangueira, pelo Dr. Nelson Massola. Entretanto, nenhum dos isolados de *Phyllosticta* sp. ou *G. mangiferae* testados apresentaram formação de lesão nos frutos. Este resultado negativo talvez possa ser explicado, pois os frutos utilizados no experimento foram obtidos comercialmente e o efeito do tratamento pós-colheita na possível repressão dos sintomas não pode ser subestimado. Este tratamento poderia estar inibindo o desenvolvimento dos isolados inoculados, gerando um resultado falso-negativo. Estudos complementares poderão discernir tais dúvidas, e apresentar resultados mais conclusivos.

O quarto grupo da árvore (FIGURA 6 e APÊNDICE 3) é formado pelos isolados de *Phyllosticta spinarum*, isolados em 1997 como endofíticos de citros em Rio Negro/PR (BLANCO, 1999) e foram utilizados como grupo externo.

Ainda com a finalidade de detectar alguma variabilidade entre os isolados de *G. citricarpa*, talvez não evidenciada na análise em conjunto com as sequências das regiões ITS e EF, foi gerada uma árvore somente para as sequências da região ITS1 - 5,8S e ITS2 (FIGURA 12). Como ainda não existem registros da região  $\alpha$ -1 do fator de alongação desta espécie depositadas no *Genbank*, justifica-se o fato da análise somente para a região ITS.

Como observado na topologia gerada com as sequências das duas regiões (FIGURA 6 e APÊNDICE 3), a variabilidade na sequência da região ITS1 - 5,8S e ITS2 em *G. citricarpa* é praticamente inexistente, mesmo quando os isolados do presente estudo foram comparados com as sequências da mesma espécie depositadas no *Genbank* (FIGURA 12 e APÊNDICE 4). Um único isolado, GCIP-23.2, apresentou uma pequena distância entre os demais e foi isolado de laranja "Pera" no município de Conchal - SP, em lesões típicas de mancha preta. Tais

resultados devem ser confirmados com o sequenciamento e a análise de outras regiões, ou através de metodologias distintas com maior abrangência genômica, como por exemplo, a técnica AFLP.

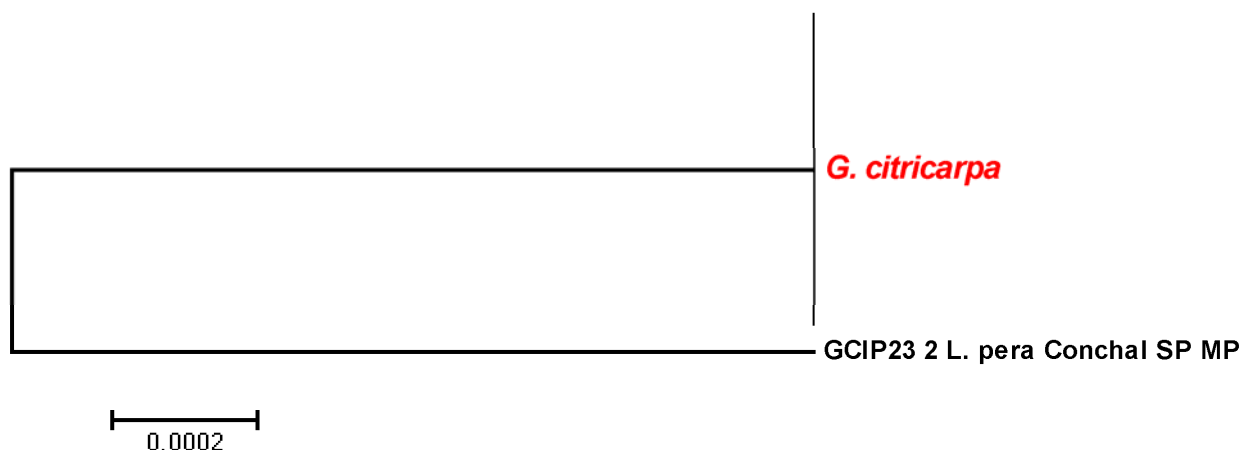


FIGURA 12 - ÁRVORE FILOGENÉTICA COLAPSADA DAS LINHAGENS DE *G. citricarpa* OBTIDA COM A SEQUÊNCIA ITS1-5.8S-ITS2 DO rDNA

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Árvore filogenética com 79 isolados de *G. citricarpa* obtida pelo método de distância por Neighbor-Joining. Para árvore detalhada ver APÊNDICE 4.

### 5.2.2 Marcadores RAPD

Com os objetivos de identificar os isolados em estudo (QUADROS 1 a 4, vide Materiais e Métodos) e de avaliar a magnitude da variabilidade entre os isolados de *G. citricarpa* foi realizada a análise molecular por marcadores RAPD. Foram avaliados 453 isolados de *Guignardia* spp. e *Phyllosticta* spp., dos quais: 3 são linhagens-referência de *G. citricarpa*, 3 são linhagens-referência de *G. mangiferae* (BALDASSARI *et al.*, 2008) e 5 de *P. spinarum* (QUADRO 1). Com o emprego de 4 *primers* de RAPD foram obtidos fragmentos de 200 a 3000 pb.

Seguindo o padrão visual dos *fingerprintings* das linhagens-referência, os isolados analisados (QUADROS 1 a 4) foram seguramente separados e identificados como *G. citricarpa*, *G. mangiferae*, *P. spinarum* e *Phyllosticta* sp. (FIGURAS 14, 15, 16 e 17). As linhagens-referência já haviam sido analisadas e dessa forma, foram

considerados os mesmos padrões obtidos por diversos autores (BLANCO, 1999; CHRISTO, 2002; STRINGARI, 2004; FELTRIN, 2008).

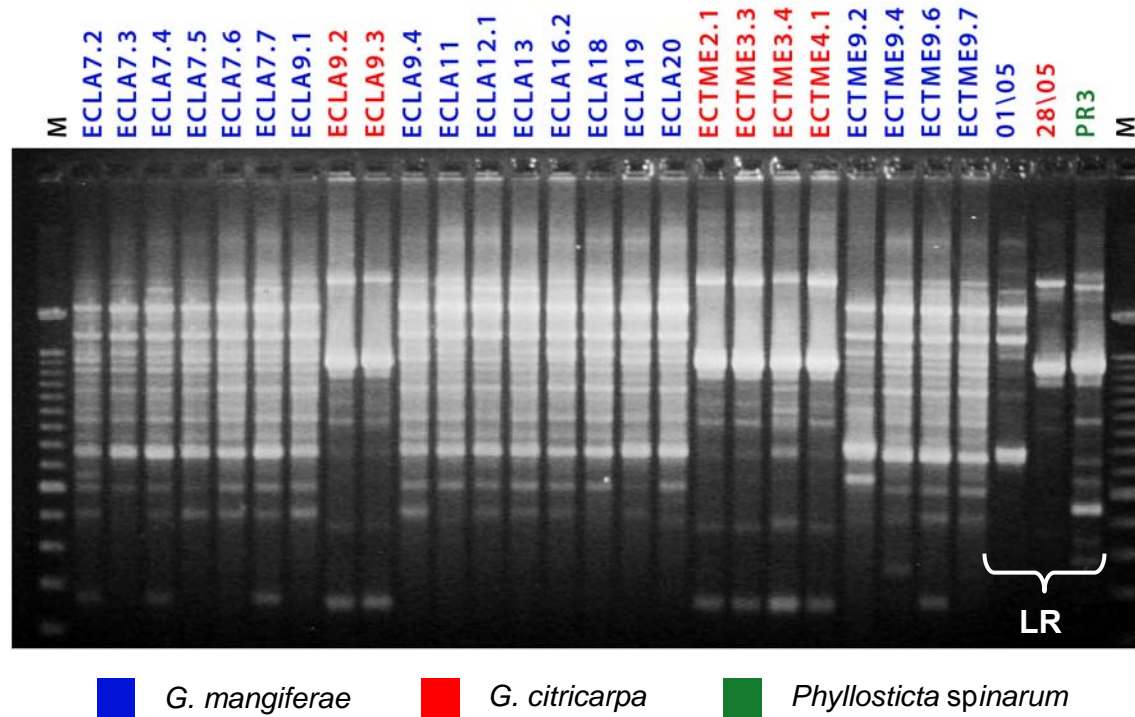


FIGURA 13 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE *G. citricarpa* E *G. mangiferae* UTILIZANDO O PRIMER DE RAPD OPX11 (*Operon Technologies*®)

NOTA: **M**: marcador de peso molecular DNA *Ladder* de 100pb. **LR**: linhagens-refêrência.

**01\05**: linhagem-referência de *G. mangiferae* com teste de patogenicidade negativo para MPC.

**28\05**: linhagem-referência de *G. citricarpa* com teste de patogenicidade positivo para MPC.

**PR3**: linhagem de *P. spinarum* utilizada como grupo externo.

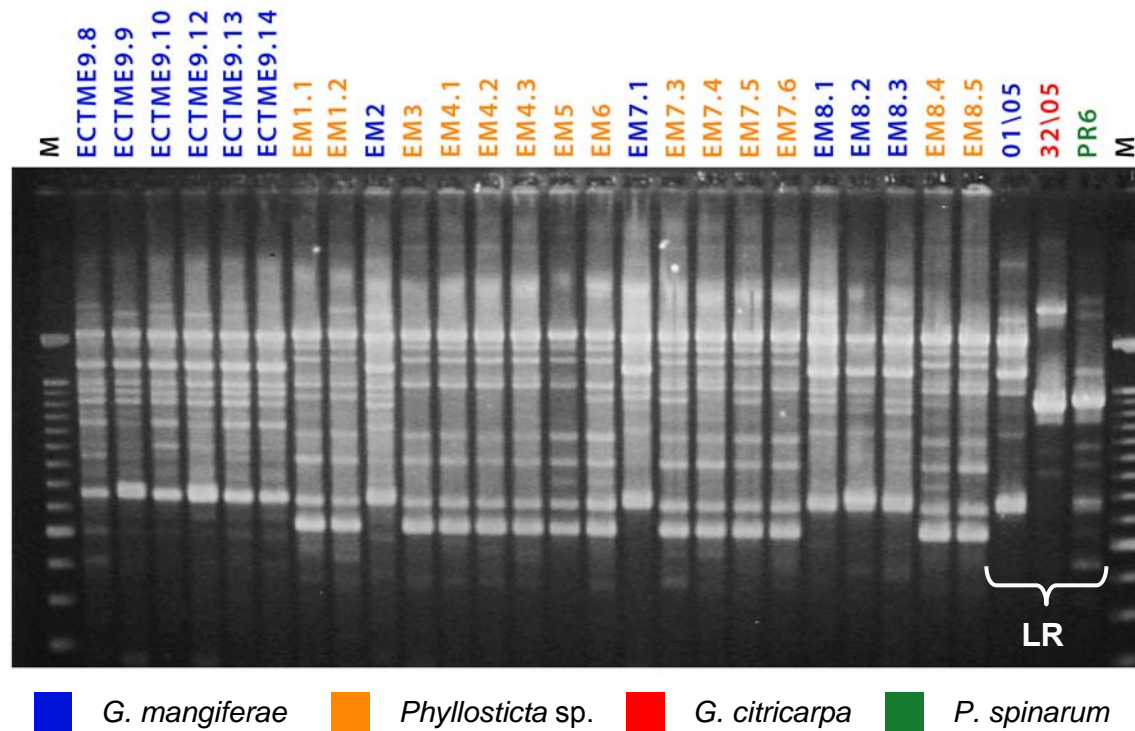


FIGURA 14 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE *G. mangiferae* E *Phyllosticta* sp. UTILIZANDO O PRIMER DE RAPD OPX11 (Operon Technologies®)

NOTA: **M**: marcador de peso molecular DNA *Ladder* de 100pb. **LR**: linhagens-refêrência.  
**01/05**: linhagem-referência de *G. mangiferae* com teste de patogenicidade negativo para MPC.  
**32/05**: linhagem-referência de *G. citricarpa* com teste de patogenicidade positivo para MPC.  
**PR6**: linhagem de *P. spinarum* utilizada como grupo externo.

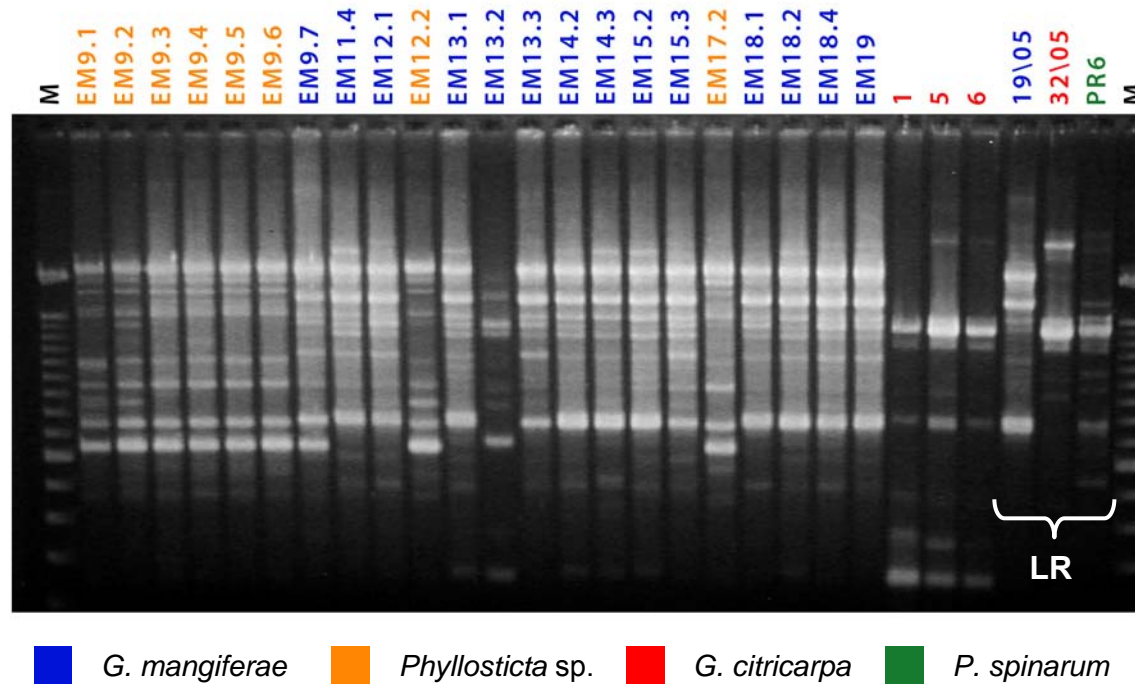


FIGURA 15 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE *Phyllosticta* sp., *G. mangiferae* E *G. citricarpa* UTILIZANDO O PRIMER DE RAPD OPX11 (Operon Technologies®)

NOTA: **M**: marcador de peso molecular DNA Ladder de 100pb. **LR**: linhagens-refênciã.

**19/05**: linhagem-referência de *G. mangiferae* com teste de patogenicidade negativo para MPC.

**32/05**: linhagem-referência de *G. citricarpa* com teste de patogenicidade positivo para MPC.

**PR6**: linhagem de *P. spinarum* utilizada como grupo externo.



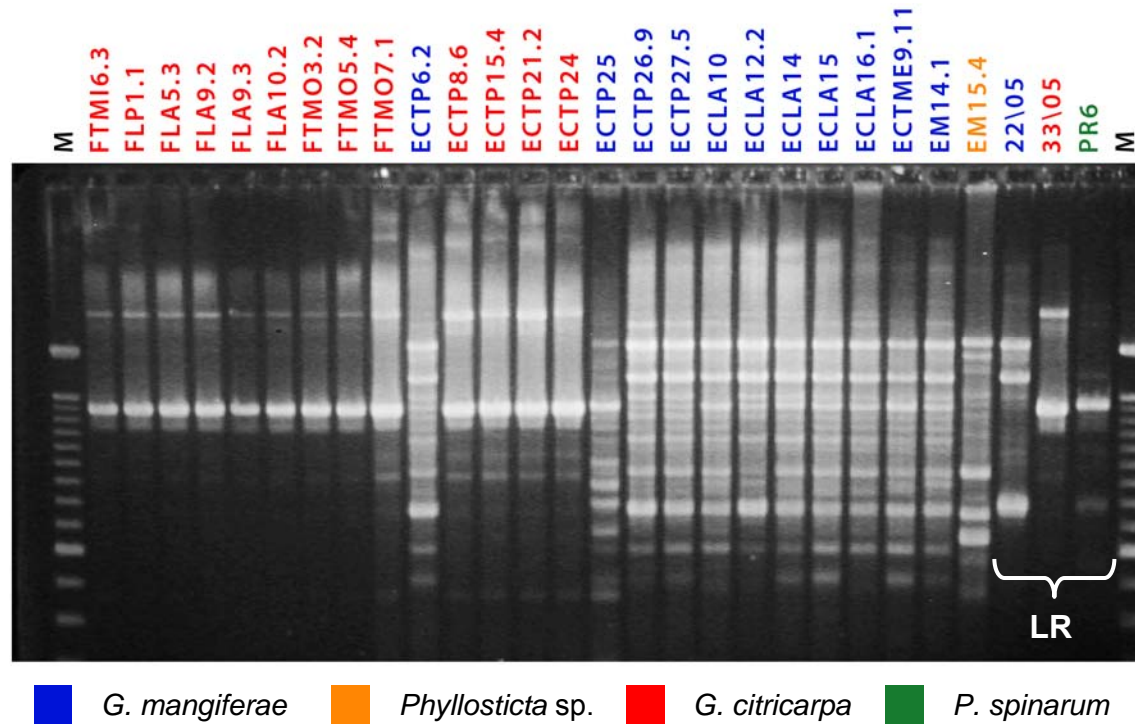


FIGURA 16 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE *G. citricarpa*, *G. mangiferae* E *Phyllosticta* sp. UTILIZANDO O PRIMER DE RAPD OPX11 (*Operon Technologies*®)

NOTA: **M**: marcador de peso molecular DNA *Ladder* de 100pb. **LR**: linhagens-refêrência.

**22/05**: linhagem-referência de *G. mangiferae* com teste de patogenicidade negativo para MPC.

**33/05**: linhagem-referência de *G. citricarpa* com teste de patogenicidade positivo para MPC.

**PR6**: linhagem de *P. spinarum* utilizada como grupo externo.



A partir do perfil de bandas de *G. mangiferae* e *G. citricarpa*, obtidos com os mesmos *primers* utilizados no presente trabalho (OPX14 e OPX17), Christo (2002) selecionou e identificou marcadores exclusivos para cada espécie. Estes marcadores foram sequenciados, e *primers* foram desenhados, de modo a obter-se SCARs para diagnóstico destas espécies via PCR (KAVA-CORDEIRO, 2004). Blanco também desenvolveu um par de *primers* para identificação de linhagens patogênicas de *G. citricarpa*.

A separação visual dos isolados em estudo foi confrontada e confirmada por resultados obtidos por Fabris (2009) (APÊNDICE 5). A autora utilizou os *primers* descritos por Blanco (1999) e Kava-Cordeiro (2004) para diagnóstico, via PCR *multiplex*, dos mesmos isolados do presente trabalho.

Corroborando os resultados obtidos por sequenciamento (FIGURA 6), utilizando-se marcadores RAPD, houve a formação de quatro grupos principais. As FIGURAS 15 e 16 revelam a existência de variabilidade genética entre os isolados de *G. mangiferae*, corroborando os dados obtidos anteriormente (BLANCO, 1999; CHRISTO, 2002; STRINGARI, 2004; MURAY, 2007; FELTRIN, 2008), e sugerindo a existência de mais de uma espécie formando o complexo *G. mangiferae* (ANEXO 1).

Os marcadores RAPD indicaram também a existência de isolados pertencentes a uma espécie diferente, mais similares a *G. mangiferae* do que *G. citricarpa* ou *P. spinarum*, corroborando os resultados obtidos por sequenciamento e análise morfológica (FIGURAS 15, 16 e 17; ANEXO 1 e APÊNDICE 5). Estes isolados também não formaram halo em meio Ágar-Aveia e não apresentaram amplificação quando os *primers* específicos para identificação de *G. mangiferae* e *G. citricarpa* foram utilizados (FABRIS, 2009) (APÊNDICE 5).

Em função da ausência de variação encontrada por meio de sequências ITS e do Fator  $\alpha 1$  de Elongação da Tradução entre os isolados de *G. citricarpa*, todos os 282 isolados foram analisados por RAPD e utilizados no estudo da magnitude da variabilidade genética (FIGURA 17). A matriz de similaridade gerada pelo dendrograma foi comparada com a matriz inicialmente obtida com os marcadores RAPD. A confiabilidade da análise foi confirmada pelo teste de Mantel, onde a correlação destas matrizes ( $r$ ) foi de 0,88995, com uma probabilidade de esta correlação ser ao acaso menor que 0,1% ( $p < 0,001$ ).

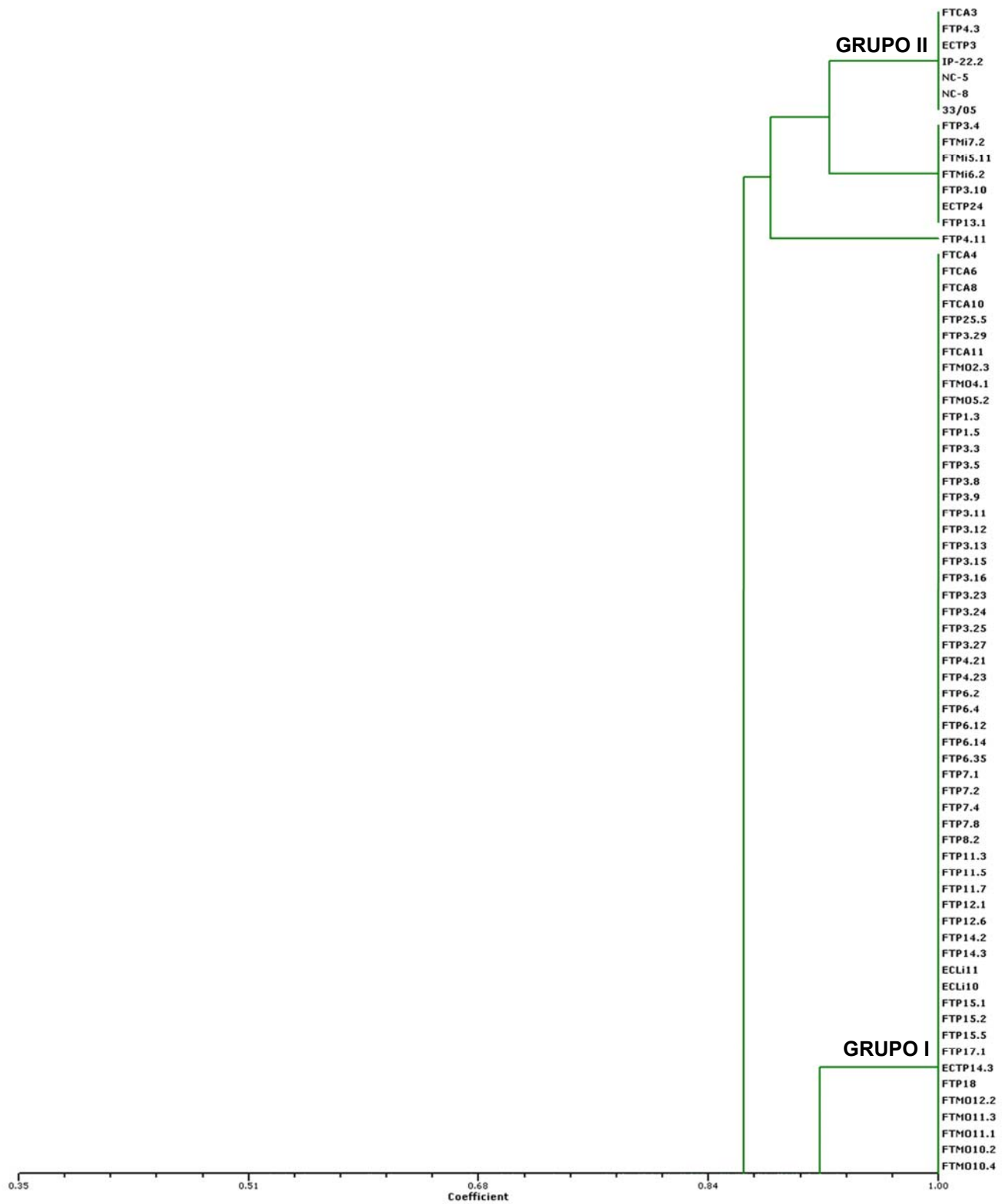


FIGURA 17 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE AS LINHAGENS DE *G. citricarpa* (Continua)

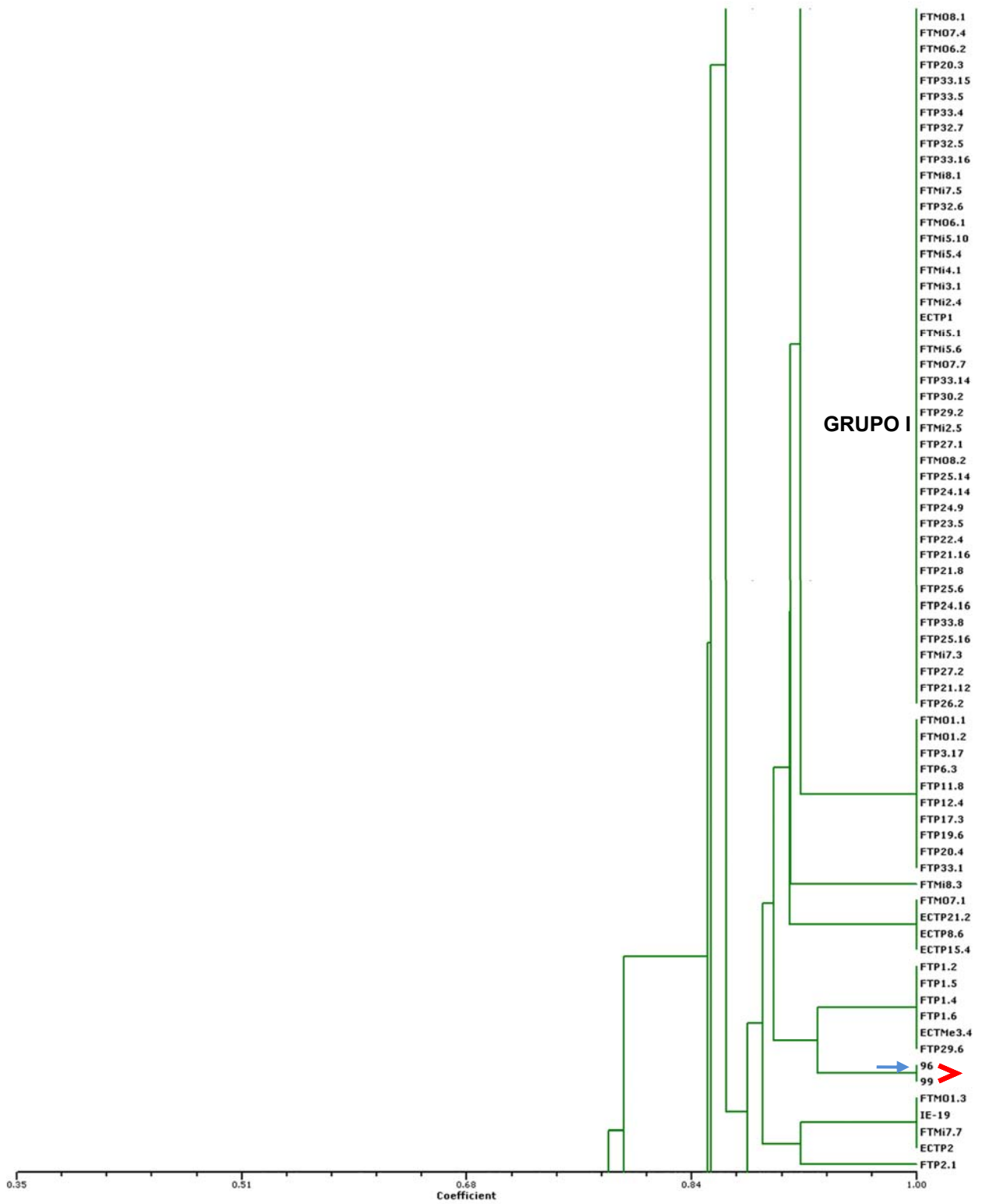


FIGURA 17 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE AS LINHAGENS DE *G. citricarpa* (Continuação)

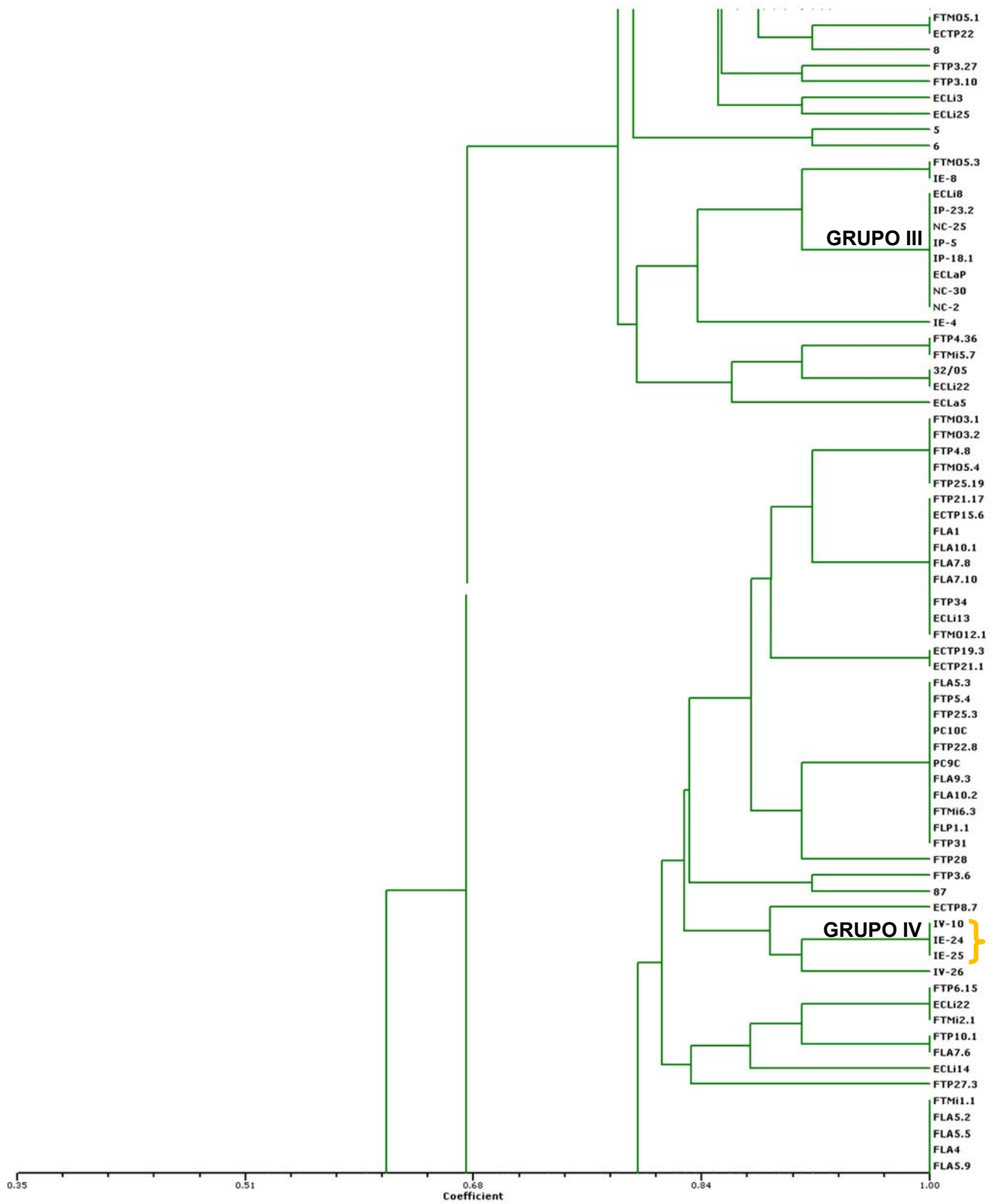


FIGURA 17 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE AS LINHAGENS DE *G. citricarpa* (Continuação)

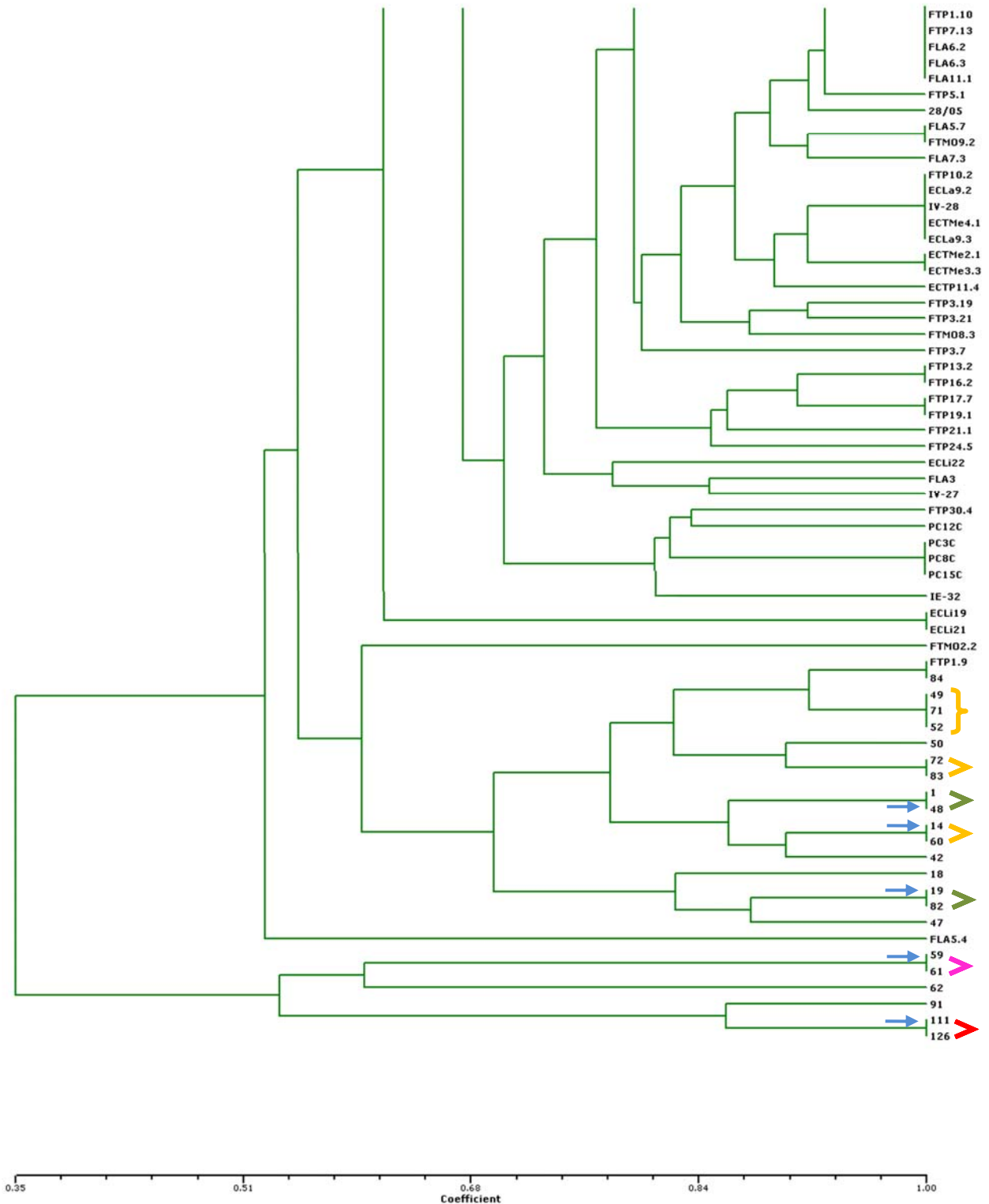


FIGURA 17 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE AS LINHAGENS DE *G. citricarpa* (Conclusão)

NOTA: Dendrograma gerado a partir da similaridade genética dos isolados identificados como *G. citricarpa* obtido por marcadores RAPD, utilizando-se o coeficiente de Jaccard.

**Vermelho:** mesmo genótipo colonizando a mesma variedade (laranja “Natal”) em municípios distintos no Estado de São Paulo e expressando diferentes sintomas. Setas em **azul:** seis genótipos diferentes colonizando a mesma variedade (laranja “Natal”) em municípios distintos de São Paulo (14, 19, 48, 59-61, 96-99, 111-126). Em **laranja:** mesmo genótipo colonizando hospedeiros e variedades distintas em

municípios diferentes em São Paulo. Em verde: mesmo genótipo expressando o mesmo sintoma da MPC em variedades distintas de citros localizados em diferentes municípios de São Paulo. Em rosa: mesmo genótipo colonizando a mesma variedade (laranja “Natal”) em municípios distintos no Estado de São Paulo expressando mesmo sintoma.

Diversos trabalhos já relataram baixa variabilidade dentro desta espécie, sugerindo uma alta especificidade entre hospedeiro e patógeno (BLANCO, 1999; CHRISTO, 2002; STRINGARI, 2004; MURAY, 2007; FELTRIN, 2008). A FIGURA 17 revela a magnitude da variabilidade genética apontando para a existência de variabilidade dentro da espécie *G. citricarpa*, talvez não encontrada por outros autores pelo baixo número de isolados utilizados ou pela análise realizada em conjunto com a espécie *G. mangiferae*. Muitas bandas podem ter sido ignoradas e não computadas na análise, fazendo com que a baixa variabilidade existente não fosse detectada.

Os isolados foram separados em diversos grupos e subgrupos, embora estes não tenham sido sustentados pela análise de *bootstrap*, provavelmente pelo baixo número de marcadores utilizados para um excessivo número de amostras. Com o objetivo de validar a variabilidade encontrada em *G. citricarpa* e verificar a estruturação populacional da espécie os isolados foram agrupados por características e analisados em 7 AMOVAs distintas (APÊNDICE 6 e TABELA 12). Foram avaliados como características a época de isolamento, o local de coleta, o tipo de sintoma da MPC encontrado no pomar, o hospedeiro, a variedade e o tecido no qual o fungo *G. citricarpa* foi isolado. A TABELA 12 e o APÊNDICE 6 apresentam os valores FST e FSC encontrados para cada análise de variância revelando a existência de variabilidade entre os isolados de *G. citricarpa*.

TABELA 12 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA MOLECULAR (AMOVA) DOS MARCADORES RAPD PARA *G. citricarpa* CONSIDERANDO 7 CARACTERÍSTICAS DISTINTAS

<b>Característica</b>	<b>FST</b>	<b>FSC</b>	<b>P-value</b>
Sintoma da MPC <sup>1</sup>	0.09427	0.9057	0.01881
Hospedeiro <sup>2</sup>	0.21607	0.7839	0.00000
Época de Isolamento <sup>3</sup>	0.18905	0.8109	0.00000
Local de coleta <sup>4</sup>	0.32101	0.6790	0.00000
Local de coleta/Brasil <sup>5</sup>	0.28515	0.7148	0.00000
Tecido <sup>6</sup>	0.06147	0.9385	0.00040
Variedade <sup>7</sup>	0.24072	0.7593	0.00000

NOTA: **FST**: Porcentagem da variação entre as populações. **FSC**: Porcentagem da variação dentro das populações. **P-value**: valor obtido por permutação que deve ser inferior a 0,01 ou 0,05 (1 ou 5% de probabilidade) para ser considerado significativo.

<sup>1</sup>A AMOVA para diferentes sintomas da MPC está representada pelas populações de isolados com Mancha Trincada, Mancha Preta, Mancha Virulenta, Mancha Sardenta, Mancha Oleosa e Falsa Melanose. <sup>2</sup>Hospedeiros: isolados oriundos de *Citrus reticulata*, *C. sinensis*, *C. limonia*, *C. latifolia* e *Citrus* sp.. <sup>3</sup>Época de Isolamento: 7 isolamentos realizados neste trabalho (QUADROS 5 e 6) e isolamentos anteriores realizados por Silvano (2008), por Carroll (QUADRO 1) e pelo Prof. Dr. Antonio de Goes (QUADRO 2). <sup>4</sup>Local de coleta: isolados provenientes de Cerro Azul, Dr. Ulisses e Paranaíba no Estado do Paraná; isolados provenientes de Conchal, Estiva Gerbi, Rincão, Descalvado, Bebedouro, Olímpia, José Bonifácio, Holambra, A.Brasiliense, Porto Ferreira, Rio Claro, Ibirá, Piratininga e Itápolis no Estado de São Paulo; e isolados provenientes da África do Sul, Japão, México e Brasil. <sup>5</sup>Local de coleta/Brasil: somente isolados oriundos do Brasil conforme descrição acima. <sup>6</sup>Tecido: isolados oriundos de fruto e de folha. <sup>7</sup>Variedade: isolados oriundos de Tangerina “Mexerica”, Tangerina “Montenegrina”, Tangerina “Ponkan”, Laranja “Pera”, “Pera Rio”, “Valência”, “Folha Murcha”, “Natal”, “Hamlim”, “Lima”, Limão “Cravo” e Limão “Siciliano”.

Em todas as AMOVAs realizadas a maior parte da variabilidade genética encontra-se distribuída dentro de cada população, ou seja, entre os indivíduos de cada população e não entre elas. Entretanto, existe uma variação significativa entre os grupos analisados com 21,61% (P=0.0) de variância entre os diferentes hospedeiros analisados, 18,91% (P=0.0) entre as diferentes épocas de isolamento e 24,1% (P=0.0) entre as diversas variedades avaliadas (TABELA 12). Nota-se ainda, uma variação significativa entre os grupos analisados que, apesar de baixa, não pode ser desprezada, como por exemplo, a variância de 9,43% (P=0.019) entre os

diferentes sintomas da Mancha Preta dos Citros e a variância de 6,15% ( $P=0.0004$ ) entre os indivíduos isolados de folhas e os isolados de frutos.

Comparando-se a procedência dos isolados, a variância encontrada entre os locais de coleta oriundos de diferentes regiões do Brasil, África do Sul, Japão e México (32,1%,  $P=0.0$ ), praticamente não diferiu da variância entre os isolados provenientes somente do Brasil (28,52%,  $P=0.0$ ). Estes resultados sugerem que existe grande fluxo gênico dentro da espécie *G. citricarpa*, e tal fluxo não está limitado ao Brasil.

Desta forma, a magnitude da variação observada entre os grupos é suficiente para sugerir que há estruturação insipiente das populações. Tal estruturação pode estar em andamento e o tempo decorrido após o isolamento das populações não seja suficiente para ser revelado por meio dos marcadores aqui utilizados.

No dendrograma representado na FIGURA 17 observam-se diversos conjuntos de isolados de *G. citricarpa* com 100% de similaridade genética. O maior deles representa 35,8% do total de isolados analisado (Grupo I, FIGURA 17). Estes isolados são provenientes de plantas dos municípios de Cerro Azul e Dr. Ulysses, que apresentam alta incidência da MPC. Com exceção de 4 isolados, todos são oriundos de lesão em frutos de tangerina “Ponkan” (FTP), tangerina “Mexerica” (FTMi) e tangerina “Montenegrina”(FTMO). Os isolados ECLi10, ECLi11, ECTP1 e ECTP14.3 foram obtidos de folhas aparentemente sadias de limão “Cravo” (ECLi) e tangerina “Ponkan” (ECTP), conforme metodologia de isolamento de fungos endofíticos. O fato dos isolados de *G. citricarpa* ECTP1 e ECTP14.3 terem sido isolados de folhas aparentemente sadias de tangerina “Ponkan” deve-se, provavelmente, a alta incidência da doença na região. Além disso, os isolados foram obtidos no mesmo pomar onde foram coletados os frutos com lesão (FTPs), e muitas plantas já apresentavam algum tipo de sintoma. Estes resultados indicam que o mesmo genótipo está colonizando hospedeiros, variedades e plantas diferentes de um mesmo pomar, corroborando com diversos autores, que relatam a baixa ou inexistente diversidade entre os isolados de *G. citricarpa* (BLANCO, 1999; CHRISTO, 2002; STRINGARI, 2004; MURAY, 2007; FELTRIN, 2008). E ainda, que o patógeno *G. citricarpa* pode ser encontrado colonizando os tecidos internos da planta ou em lesões da MPC em frutos.

Outros indivíduos apresentaram similaridade genética de 100% (Grupo II, FIGURA 17). Os isolados FTCA3 e FTP3.4 foram coletados em épocas e pomares



diferentes, no município de Cerro Azul-PR e ambos foram isolados de lesões em frutos de tangerina, sendo o FTCA3 de tangerina “Mexerica” e o FTP3.4 de tangerina “Ponkan”. O isolado ECTP3 obtido de tangerina “Ponkan” no mesmo município, mas em outro pomar, também apresentou 100% de similaridade com estes isolados. Entretanto, ECTP3 foi isolado de folha aparentemente sadia pela metodologia de isolamento de fungos endofíticos. Neste mesmo grupo estão os isolados IP-22.2, NC-5, NC-8 e a linhagem-referência 33/05 (BALDASSARI *et al.*, 2008). Todos foram isolados no município de Conchal-SP, em lesões da MPC em frutos de laranja, variedades Pera (IP-22.2, 33/05) e Natal (NC-5 e NC-8). Os isolados IP22.2, 33/05 e NC-5 foram obtidos de lesões características da mancha preta, enquanto que o isolado NC-8 foi obtido de lesão típica de mancha sardenta. Por outro lado, os isolados IP-5, IP-18.1, IP-23.2, NC-2, NC-25 e NC-30 (Grupo III, FIGURA 16) foram obtidos no município de Conchal – SP, em frutos de laranja “Pera” (IC) e “Natal” (NC) com sintomas da MPC, mas apresentam-se diferentes dos indivíduos NC-5 e NC-8 (Grupo II), isolados nas mesmas condições.

Analisando outros isolados procedentes de São Paulo (Grupo IV), alguns apresentaram similaridade genética de 100%, mesmo tendo sido isolados em localidades e variedades distintas (QUADRO 2, vide Materiais e Métodos). O isolado IV-10 foi obtido de lesão tipo mancha sardenta em fruto de laranja “Valência”, no município de Conchal, enquanto os isolados IE-24 e IE25 foram obtidos de lesão tipo mancha preta, em frutos de laranja “Folha Murcha”, no município de Estiva Gerbi. Desta forma, a expressão dos diferentes sintomas da doença Mancha Preta dos Citros não parece ser dependente do genótipo do patógeno.

De forma semelhante ao observado na FIGURA 17, no QUADRO 9 estão assinalados em laranja os isolados que apresentam o mesmo perfil de RAPD, porém foram isolados de hospedeiros, variedades e municípios distintos. Por outro lado, estão assinalados em azul, seis genótipos diferentes que foram isolados da mesma variedade de laranjeira, o que sugere que não há relação entre os genótipos do patógeno e da planta. Além disso, demonstra-se a existência de variabilidade genética entre os isolados de *G. citricarpa*, embora não tenha sido evidenciada por meio das sequências analisadas.

Isolados com 100% de similaridade	Hospedeiro / Variedade	Procedência	Sintoma
96 99	Laranja "Natal" Laranja "Natal"	Itápolis Holambra	Mancha oleosa Mancha trincada
IV-10 IE-24 IE-25	Laranja "Valência" Laranja "Folha Murcha" Laranja "Folha Murcha"	Conchal Estiva Gerbi Estiva Gerbi	Mancha sardenta Mancha preta Mancha preta
49 52 71	Limão "Cravo" Laranja "Valência" Laranja "Pera"	A. Brasiliense A. Brasiliense Ibirá	Mancha preta Mancha trincada Falsa melanose
14 60	Laranja "Natal" Laranja "Hamlim"	Conchal A. Brasiliense	Falsa melanose Mancha preta
72 83	Laranja Lima Laranja "Pera"	Rincão Ibirá	Falsa melanose Mancha virulenta
1 48	Laranja "Valência" Laranja "Natal"	Rincão Holambra	Mancha trincada Mancha trincada
19 82	Laranja "Natal" Limão "Cravo"	Olímpia A. Brasiliense	Mancha preta Mancha preta
59 61	Laranja "Natal" Laranja "Natal"	"Rio" Claro José Bonifácio	Mancha sardenta Mancha preta
111 126	Laranja "Natal" Laranja "Natal"	Descalvado Itápolis	Mancha sardenta Mancha preta

QUADRO 9 - HOSPEDEIRO, PROCEDÊNCIA E SINTOMA DOS ISOLADOS OBTIDOS NO ESTADO DE SÃO PAULO

NOTA: isolados cedidos gentilmente por Dr. Antonio de Goes (UNESP). Em **laranja**: mesmo genótipo colonizando hospedeiros e variedades distintas em municípios diferentes. Em **verde**: mesmo genótipo expressando o mesmo sintoma em variedades e localidades distintas. Em **azul**: genótipos diferentes colonizando a mesma variedade (laranja "Natal") em municípios distintos de São Paulo.

Outro dado relevante é a constatação da existência de isolados com mesmo genótipo colonizando plantas em São Paulo e na região do Vale do Ribeira, no Paraná. Isto sugere que medidas de controle utilizadas em São Paulo possam ser aplicadas no Estado do Paraná, salvaguardando, logicamente, as diferentes condições climáticas destas regiões. Ainda, demonstra a existência de fluxo gênico dentro do país, reforçando a necessidade de medidas para controle da disseminação do patógeno.

No grupo III encontram-se oito isolados (ECLi8, ECLaP, IP-5, IP-18.1, IP-23.2, NC-2, NC-25 e NC-30) apresentando 100% de similaridade genética. Os isolados ECLi8 e ECLaP foram obtidos de folhas aparentemente sadias de limão “Cravo” e laranja, respectivamente, através da metodologia de isolamento de fungos endofíticos. O isolado de limão “Cravo” é proveniente de uma região com alta incidência da MPC, no município de Cerro Azul - PR, enquanto o isolado obtido de laranjeira é oriundo da mesorregião Noroeste Paranaense, município de Paranavaí, onde a doença ainda não foi descrita. A constatação da existência de isolados de mesmo perfil de RAPD colonizando, de forma latente, os tecidos das plantas cítricas nesta localidade, é extremamente importante. Como a doença ainda não foi oficialmente relatada, medidas de controle preventivas devem ser iniciadas imediatamente, evitando a disseminação da doença nesta importante região citrícola no Paraná.

Segundo levantamento em todo país, divulgado recentemente pelo IBGE (2009), a Produção Agrícola Municipal (PAM) apontou o crescimento dos citros no Estado do Paraná como um destaque. Com 502,9 mil toneladas, a produção foi aferida em R\$ 149,90 milhões em 2007. Esse valor cresceu 23% em relação ao ano anterior, quando os citros foram avaliados em R\$ 121 milhões. Apesar da tradição do Vale do Ribeira, no município de Cerro Azul, os citros se destacaram mais ao norte e ao noroeste do Paraná, onde estão concentradas as indústrias de suco, sendo a laranja uma importante fonte de renda para os municípios de Paranavaí e Rolândia.

Em face ao expressivo aumento da cultura de citros nas regiões norte e noroeste do Paraná, sugere-se o imediato zoneamento regional dos pomares destas regiões para verificar a existência de pomares livres do patógeno, subsidiando informações para a criação de áreas livres da MPC no Paraná. Como a maior parte da produção destina-se a exportação para Comunidade Européia, onde seus países membros exigem tolerância zero à presença de sintomas da doença em frutos, enormes prejuízos podem ser evitados com o diagnóstico precoce dos pomares infectados.

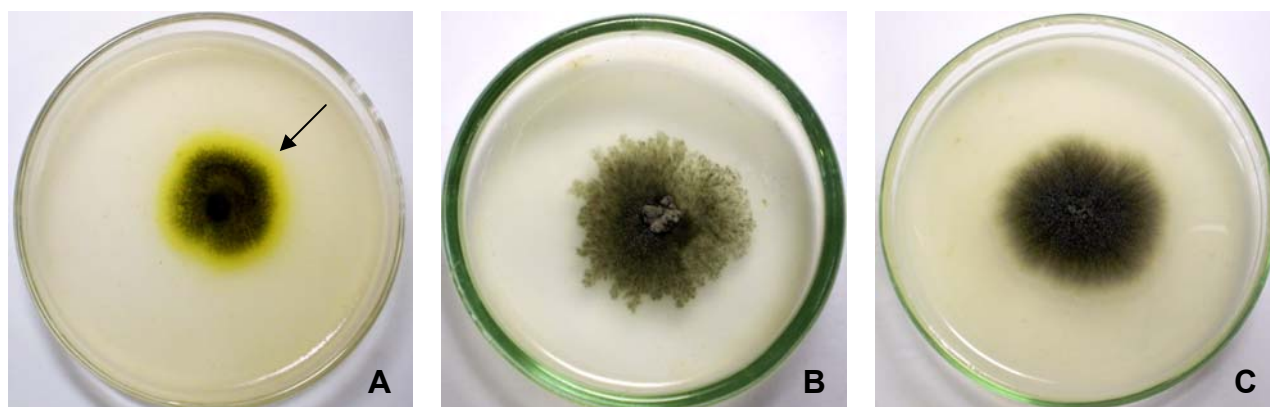
Como não foi possível a separação dos isolados em estudo em grupos distintos, com bom suporte de *bootstrap*, sugere-se que mais marcadores sejam empregados na técnica RAPD, ou ainda, que outros marcadores sejam utilizados, como por exemplo, o AFLP.

### 5.3 IDENTIFICAÇÃO POR MARCADOR MORFOLÓGICO

Com o objetivo de validar o marcador morfológico descrito por Baayen *et al.* (2002), para isolados oriundos do Brasil, 365 linhagens de *Guignardia* e *Phyllosticta* foram testadas (QUADROS 1 a 4, item Materiais e Métodos), sendo 195 isoladas de lesão da MPC e 170 do interior de folhas de citros e manga. Segundo Baayen *et al.* (2002), as linhagens de *G. citricarpa* podem ser diferenciadas das linhagens de *G. mangiferae* pela formação de um halo amarelo ao redor das colônias fúngicas, quando incubadas em meio Ágar-Aveia (item 4.2.2.), na ausência de luz e a 22° C.

Para o experimento foram utilizadas como controle as 6 linhagens referência de *G. citricarpa* e *G. mangiferae* (BALDASSARI *et al.*, 2008) e as 5 linhagens de *Phyllosticta spinarum* (QUADRO 1).

Corroborando os dados obtidos por Baayen *et al.* (2002), os controles de *G. citricarpa* (28/05, 32/05 e 33/05) apresentaram a formação de halo ao redor da colônia em todos os testes realizados (FIGURA 18A). Da mesma forma, nos controles de *G. mangiferae* (01/05, 19/05 e 22/05) não foi verificada a presença de halo ao redor das colônias (FIGURA 18B). As 5 linhagens de *Phyllosticta spinarum* também não apresentaram a formação de halo (FIGURA 18C).



A: Linhagem 33/05 B: Linhagem 19/05 C: Linhagem PR6

FIGURA 18 - IDENTIFICAÇÃO DE *G. citricarpa*, *G. mangiferae* E *Phyllosticta spinarum* PELO MARCADOR MORFOLÓGICO MEIO ÁGAR-AVEIA

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Linhagens incubadas em meio Ágar-Aveia (item 4.2.2), na ausência de luz a 22°C por 10 dias. Seta indica a formação de halo amarelo ao redor da colônia. **A** e **B**: linhagens com teste positivo (33/05) e negativo (19/05) de patogenicidade para MPC (BALDASSARI *et al.*, 2008). **C**: Linhagem de *Phyllosticta spinarum* utilizada como grupo externo.

Dentre as 365 linhagens de *Guignardia* e *Phyllosticta* analisadas, 57,8% apresentaram halo amarelo ao redor da colônia e 42,2% não apresentaram esta característica (TABELA 13).

TABELA 13 - FREQUÊNCIA DE *Guignardia* spp. E *Phyllosticta* sp. IDENTIFICADAS PELO MARCADOR MORFOLÓGICO MEIO ÁGAR-AVEIA

	Halo Positivo	Halo Negativo
<b>Lesão em fruto</b>	48,5	4,9
<b>Folha</b>	9,3	37,3
<b>Total<sup>1</sup> (%)</b>	57,8	42,2

FONTE: O autor (2009).

NOTA: <sup>1</sup>Porcentagem total de isolados identificados pelo marcador morfológico descrito por Baayen *et al.* (2002).

Seguindo a identificação de espécie sugerida por Baayen *et al.* (2002), 57,8% do total de linhagens testadas seriam *G. citricarpa* e 42,2% seriam *G. mangiferae*. Entretanto, quando estes dados foram confrontados com os obtidos por PCR *Multiplex* (FABRIS, 2009), por marcadores RAPD e pelo sequenciamento das regiões ITS e EF, algumas divergências foram encontradas (TABELA 14 e FIGURA 19).

TABELA 14 - FREQUÊNCIA DE *G. citricarpa*, *G. mangiferae* E *Phyllosticta* sp. IDENTIFICADAS POR MARCADORES MOLECULARES

	Halo Positivo	Halo Negativo	Total <sup>1</sup> (%)
<b><i>G. citricarpa</i></b>	57,8	4,4	62,2
<b><i>G. mangiferae</i></b>	0,0	29,6	29,6
<b><i>Phyllosticta</i> sp.</b>	0,0	8,2	8,2
	57,8	42,2	100,0

FONTE: O autor (2009).

NOTA: <sup>1</sup>Porcentagem total de isolados identificados por RAPD, PCR *Multiplex* e sequenciamento das regiões ITS e EF.

Foram identificados como *G. citricarpa* 62,2% dos isolados de *Guignardia* sp., divergindo do resultado baseado apenas no marcador morfológico (57,8%). Dezesesseis isolados (4,4%) classificados como *G. citricarpa* por marcadores moleculares, não apresentaram halo ao redor de suas colônias, como por exemplo, os isolados FTP11.3 e FTMi3.1 (FIGURA 7A e 8B, respectivamente). Assim, segundo a metodologia descrita por Baayen *et al.* (2002), estes isolados seriam erroneamente classificados como *G. mangiferae*.

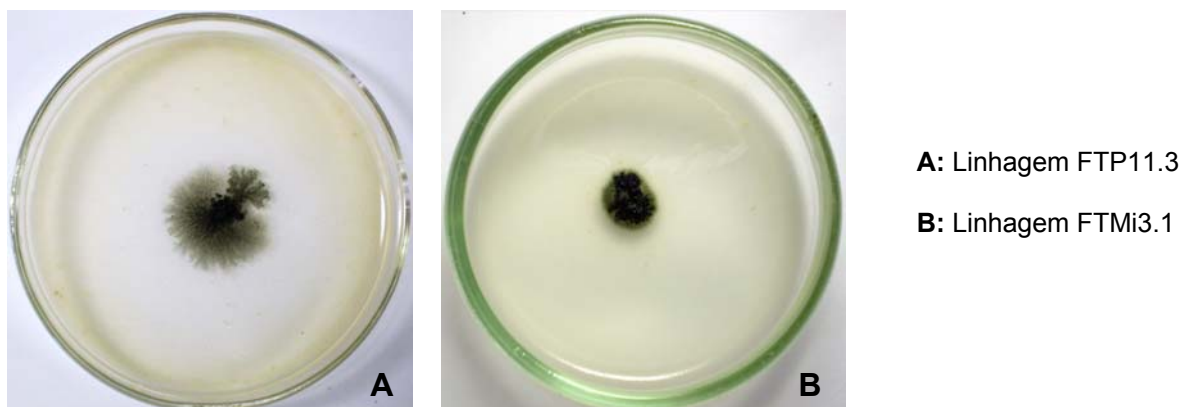
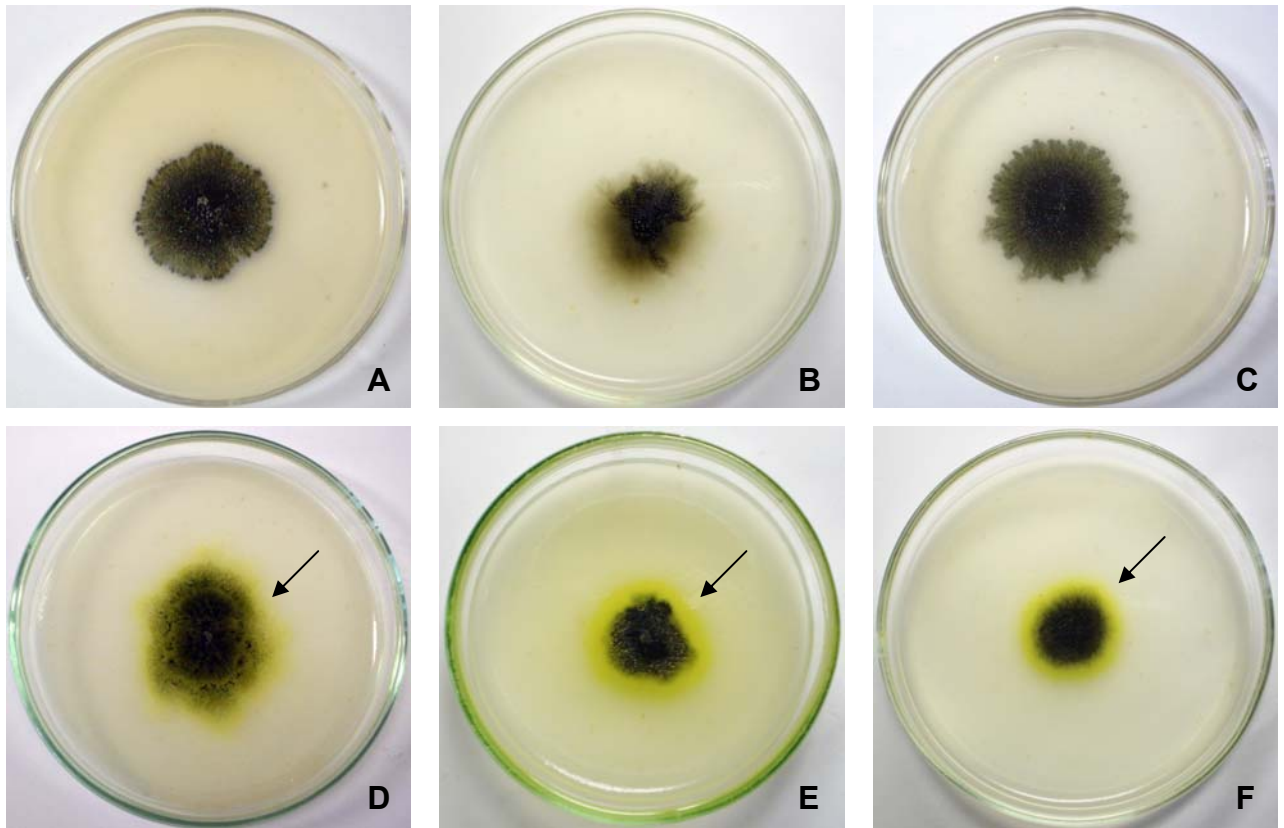


FIGURA 19 - ISOLADOS DE *G. citricarpa* COM RESULTADO FALSO-NEGATIVO PARA O MARCADOR MORFOLÓGICO MEIO ÁGAR-AVEIA

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Linhagens incubadas em meio Ágar-Aveia (item 4.2.2), na ausência de luz a 22°C por 10 dias. **A** e **B**: linhagens identificadas como *G. citricarpa* por PCR *Multiplex* (FABRIS, 2009), marcadores RAPD e pelo sequenciamento das regiões ITS e EF.

Entre os isolados identificados por marcadores moleculares como *G. mangiferae* e *Phyllosticta* sp. nenhum apresentou halo, corroborando os dados descritos por Baayen *et al.* (2002) (FIGURA 20 A, B e C). Da mesma forma, todos os isolados que apresentaram halo (92,9%) foram classificados como *G. citricarpa* pelos demais métodos testados (TABELA 15 e FIGURA 20 D, E e F).



**A:** ECLa7.5 **B:** FLA7.5 **C:** EM18.2

**D:** ECTMe3.3 **E:** FTCA3 **F:** FTP4.1

FIGURA 20 - ISOLADOS IDENTIFICADOS PELO MARCADOR MORFOLÓGICO MEIO ÁGAR- AVEIA E RATIFICADOS POR MARCADORES MOLECULARES

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Linhagens incubadas em meio Ágar-Aveia (item 4.2.2), na ausência de luz a 22°C por 10 dias. Setas indicam a presença de halo amarelo ao redor da colônia.

**A e B:** linhagens identificadas como *G. mangiferae*.

**C:** linhagem identificada como *Phyllosticta* sp.

**D, E, e F:** linhagens identificadas como *G.citricarpa*.

TABELA 15 - FREQUÊNCIA DE *G. citricarpa*, *G. mangiferae* E *Phyllosticta* sp. EM RELAÇÃO À PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE HALO

	<i>G. citricarpa</i> <sup>1</sup>	<i>G. mangiferae</i> <sup>1</sup>	<i>Phyllosticta</i> sp <sup>1</sup>
<b>Halo Positivo</b>	92,9	0,0	0,0
<b>Halo Negativo</b>	7,0	100,0	100,0
<b>Total (%)</b>	100,0	100,0	100,0

FONTE: O autor (2009).

NOTA: <sup>1</sup>Classificação obtida por marcadores moleculares.

Observando a frequência de *G. citricarpa* em relação à presença ou ausência de halo (TABELA 15) verifica-se que 7,0% dos isolados não apresentaram a formação de halo ao redor da colônia sendo considerados como falso-negativos. Baayen *et al.* (2002), observaram a formação do halo em 97,4% das linhagens de *G. citricarpa* e a sua ausência em apenas uma linhagem (2,6%).

Com o objetivo de sanar estas divergências e validar o teste descrito por Baayen *et al.* (2002) foi realizado o cálculo do valor preditivo para *G. citricarpa* [P(C/+)] e para *G. mangiferae* [P(M/-)] (FIGURA 21) . Os valores preditivos positivo e negativo foram definidos, respectivamente, como a probabilidade do isolado ser *G. citricarpa* dada a formação de halo e de ser *G. mangiferae* dada a ausência de formação de halo.

$$P(C/+) = [P(C).P(+/C)]/[P(C).P(+/C)+P(M).P(+/M)]$$

$$P(M/-) = [P(M).P(-/M)]/[P(M).P(-/M)+P(C).P(-/C)]$$

Em que:

P(C/+) = probabilidade de o isolado ser *G. citricarpa* dada a formação de halo

P(C) = frequência de isolados classificados como *G. citricarpa* por marcadores moleculares

P(+/C) = frequência de isolados com a formação de halo dentre os classificados como *G. citricarpa*

P(-/C) = frequência de isolados sem a formação de halo dentre os classificados como *G. citricarpa*

P(M/-) = probabilidade de o isolado ser *G. mangiferae* dada a não formação de halo

P(M) = frequência de isolados classificados como *G. mangiferae* por marcadores moleculares

P(+/M) = frequência de isolados com a formação de halo dentre os classificados como *G. mangiferae*

P(-/M) = frequência de isolados sem a formação de halo dentre os classificados como *G. mangiferae*

FIGURA 21 - FÓRMULA UTILIZADA PARA O CÁLCULO DO VALOR PREDITIVO PARA *G. citricarpa* E PARA *G. mangiferae*

Corroborando com os dados obtidos por Baayen *et al.* (2002) o valor preditivo para *G. citricarpa* calculado no presente trabalho, foi de 100%, ou seja, todos os isolados que apresentaram a formação de halo são *G. citricarpa*. Entretanto, o valor preditivo para *G. mangiferae* obtido neste estudo, que foi de 84%, mostrou-se inferior



ao calculado para os dados de Baayen *et al.* (2002), que corresponderam a 98%. Desta forma as linhagens que não apresentam halo, não podem ser classificadas seguramente como *G. mangiferae*, podendo algumas vezes, pertencer à espécie *G. citricarpa* (falso-negativos). Portanto, o método de distinção de espécie descrito por Baayen *et al.* (2002) pode ser validado exclusivamente para as linhagens com resultados positivos para o halo, sendo estas corretamente identificadas como *G. citricarpa*.

Outro dado relevante observado é a frequência das espécies isoladas em diferentes partes do hospedeiro (TABELA 16). A grande maioria das linhagens isoladas diretamente de lesões de MPC em frutos cítricos (97,9%), pertence à espécie *G. citricarpa*. Apenas quatro isolados (2,0%) foram identificados como *G. mangiferae* indicando que o fungo endofítico, embora em menor proporção, também pode ser encontrado em lesões da MPC, mas de maneira oportunista e não tendo relação com a etiologia da doença (BALDASSARI; WICKERT; GOES, 2008). Tal resultado reforça a necessidade da existência de métodos de diagnóstico do patógeno *G. citricarpa* em frutos, uma vez que o isolamento de fungo morfológicamente semelhante ao patógeno de lesões semelhantes a MPC não implica que o fruto esteja contaminado com *G. citricarpa*.

TABELA 16 - FREQUÊNCIA DE ISOLAMENTO DE *G. citricarpa*, *G. mangiferae* E *Phyllosticta* sp. DE FOLHAS ASSINTOMÁTICAS E FRUTOS COM SINTOMAS DA MPC

	Lesão em fruto	Interior da Folha
<i>G. citricarpa</i> <sup>1</sup>	97,9	21,2
<i>G. mangiferae</i> <sup>1</sup>	2,0	61,2
<i>Phyllosticta</i> sp <sup>1</sup>	0,0	17,6
<b>Total (%)</b>	100,0	100,0

FONTE: O autor (2009).

NOTA: <sup>1</sup>Classificação obtida por marcadores moleculares.

Do mesmo modo, a espécie endofítica *G. mangiferae* (61,2%) e o patógeno *G. citricarpa* (21,2%) podem ser encontrados colonizando o interior de folhas de

citros (TABELA 16). Entretanto, em folhas de manga apenas as espécies *G. mangiferae* e *Phyllosticta* sp. foram encontradas.

As linhagens classificadas como *Phyllosticta* sp. (17,6%), como citado anteriormente, são possivelmente uma nova espécie, isolada exclusivamente de folhas assintomáticas de manga. Estudos complementares como testes de patogenicidade poderão gerar informações mais consistentes e conclusivas.

## 6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- ✓ O fungo *Guignardia mangiferae* é comumente encontrado colonizando os tecidos internos de diversos hospedeiros e em menor frequência, de forma oportunista em lesões da MPC em frutos cítricos.
- ✓ O complexo *G. mangiferae* apresenta grande variabilidade genética e possivelmente compreende diferentes espécies ainda não resolvidas.
- ✓ O fungo *Guignardia citricarpa* pode ser encontrado nos tecidos internos de plantas cítricas e em lesões da MPC.
- ✓ Uma nova espécie do gênero *Phyllosticta*, com características morfológicas semelhantes a *G. mangiferae*, pode ser encontrada colonizando plantas de *Mangifera indica* nos Estados de São Paulo e Paraná.
- ✓ O patógeno *G. citricarpa* está presente de forma latente nos pomares da mesorregião Noroeste Paranaense, município de Paranavaí, onde a doença ainda não havia sido relatada.
- ✓ O marcador morfológico meio Ágar-Aveia, descrito por Baayen *et al.* (2002), pode ser utilizado na identificação de *G. citricarpa*, somente quando há a formação de halo amarelo ao redor das colônias.
- ✓ As regiões ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA e  $\alpha 1$  do fator de alongação da tradução, bem como os marcadores RAPD, são úteis na distinção entre as espécies *G. citricarpa*, *G. mangiferae*, *P. spinarum* e a espécie de *Phyllosticta* presente em *Mangifera indica* ainda não descrita.

- ✓ Os marcadores RAPD revelaram baixa variabilidade genética dentro da espécie *G. citricarpa*, enquanto que as regiões ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA e  $\alpha 1$  do fator de alongação da tradução não são informativas para análise da variabilidade genética intraespecífica.
- ✓ O mesmo genótipo de *G. citricarpa* pode ser encontrado colonizando hospedeiros, variedades e plantas diferentes de um mesmo pomar, ou de localidades distintas e pode ser isolado de lesões da MPC e do interior de folhas cítricas, demonstrando uma forte especificidade do patógeno com o hospedeiro e baixa variabilidade, sendo fundamental para estratégias de controle da doença.
- ✓ A variabilidade encontrada entre as linhagens de *G. citricarpa* por meio de marcadores RAPD, sugere que não há relação entre os genótipos do patógeno e as variedades cítricas. Da mesma forma, a expressão dos diferentes sintomas da Mancha Preta dos Citros não é dependente do genótipo do patógeno.
- ✓ O mesmo genótipo do fungo *G. citricarpa* presente no Estado de São Paulo pode ser encontrado na região do Vale do Ribeira - PR.

## RECOMENDAÇÕES

- ✓ A descoberta do patógeno *G. citricarpa*, ainda de forma latente, nos pomares da mesorregião Noroeste Paranaense, município de Paranaíba, sugere a implementação imediata de medidas de controle da MPC. Como a doença não havia sido relatada na região, ações preventivas devem ser adotadas a fim de conter a disseminação do patógeno.
- ✓ Como o mesmo genótipo do fungo *G. citricarpa* está presente nos Estado de São Paulo e Paraná, as medidas de controle amplamente empregadas no estado paulista podem ser otimizadas e aplicadas na região do Vale do Ribeira-PR.

## REFERÊNCIAS

ABECITRUS. **A história da Laranja**. Disponível em: <<http://www.abecitrus.com.br>>  
Acesso em 27 de maio de 2002.

ABECITRUS. **A história da Laranja**. Disponível em: <<http://www.abecitrus.com.br>>  
Acesso em 06 de abril de 2007.

ABECITRUS. **A história da Laranja**. Disponível em: <<http://www.abecitrus.com.br>>  
Acesso em 28 de setembro de 2008.

ABECITRUS. **Exportação de Laranja**. Disponível em: <<http://www.abecitrus.com.br>>  
Acesso em 05 de janeiro de 2009.

AGRIANUAL, 2005: **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP 2005, p.785.

ALBERTS, B.; LEWIS, J.; RALF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Molecular Biology of the Cell**. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Garland Publishing. 1994.

AL-SUBHI, .A.M. AL-ADAWI; A.O.; VAN WYK, DEADMAN; M.L.; WINGFIELD; M.J. *Ceratocystis omanensis*, a new species from diseased mango trees in Oman. **Mycological Research**, Cambridge, v.110, p.237 – 245, 2006.

ALFENAS, C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa. MG: Universidade Federal de Viçosa. 1991. 242 p.

ALVES, A.; CROUS, P.W.; CORREIA, A.; PHILLIPS, A.J.L. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. **Fungal Diversity**, Harbin, v.28:p.1-13, 2008.

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.

APPEL, D. J.; GORDON, T. R. Relationships Among Pathogenic and Nonpathogenic Isolates of *Fusarium oxysporum* Based on the Partil sequence of the Intergenic Spacer Region of the Ribosomal DNA. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St. Paul, v.9, n.2, p.125-138, 1996.

ARAUJO, W. L.; MACCHERONI Jr.; AGUILAR-VILDOSO, C. I; BARROSO, P. A. V.; SARRIDAKIS, H. O.; AZEVEDO, J. L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.47, n.3, p.229-236, 2001.

ARVENA-SACCÁ, R. Pústulas pretas sobre laranjas doces produzidas por *Phoma citricarpa*. **Revista Agrícola**, Piracicaba, v.15, p.468-475, 1940.

AZEVEDO, A. C. S.; FURLANETO, M. C.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; FUNGARO, M. H. P. Molecular Characterization of *Paecilomyces fumoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) Isolates. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.57, n.4, p.729-732, 2000.

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

AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Eds.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p.117-137.

BAAYEN, R. P.; BONANTS, P. J. M.; VERKLEY, G.; CARROLL, 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**, St. Paul, v.92, n.5, p.464-477, 2002.

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

BALDASSARI, R. B.; GOES, A.; SANTOS, J. M.; TIMOSSI, A. J. microscopia eletrônica de varredura de isolados de *Guignardia citricarpa* obtidos de plantas cítricas. **Summa Phytopatologica**, Jaboticabal, v.27, n.1, p.88-92, 2001.

BALDASSARI, R.B.; BRANDIMARTE, I.; ANDRADE, A.G. de; SOUZA, D.C.G. de; MORETTO, C.; GOES, A. Indução da expressão precoce de sintomas de *Guignardia citricarpa* em frutos de laranja "Pera"-Rio". **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, 29(2): 269-275. 2007.

BALDASSARI, R.B.; WICKERT, E.; GOES, A. Pathogenicity, colony morphology and diversity of isolates of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae* isolated from *Citrus* spp.. **European Journal of Plant Pathology**, 120: 103-110. 2008.

BATISTA, P.P.; SANTOS, J.F.; OLIVEIRA, N.T.; PIRES, A.P.; MOTTA, C.M.; LUNA-ALVES, E. A.L. Genetic characterization of Brazilian strains of *Aspergillus flavus* using DNA markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.7, n.3, p.706-717, 2008.

BECERRA V.; PAREDES M; MADARIAGA R.; BARIANA H. S.; MELLADO M.; ROJO C. High genetic diversity in Chilean populations of wheat yellow rust (*Puccinia striiformis* f. sp. tritici west.) assessed by RAPD and AFLP.

BELL, A. A.; WHEELER, M. H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.24, p.411-451, 1986. **Australian Journal of Agricultural Research**, Australia, v.58, n.6, pp. 525-531, 2007.

BERNSTEIN, M. E.; CARROLL, G. C. Internal fungi in old-growth Douglas fir foliage. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.55, n.6, p.644-653, 1977.

BHATTACHARYA, D; SUREK, B.; RuSING, M.; DAMBERGER, S; MELKONIAN, M. Group I introns are inherited through common ancestry in the nuclear-encoded rRNA of *Zygnematales* (*Charophyceae*) **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, v.91, p.9916-9920, 1994.

BIOSECURITY AUSTRALIA. **Provisional Final Import Risk Analysis Report for Fresh Mango Fruit from India**. Biosecurity Australia, Canberra, 2008. Disponível em: <http://www.biosecurityaustralia.gov.au> Acesso em 20 de janeiro de 2009.

BISSET, J.; PALM, M .E. Species of *Phyllosticta* on conifers. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.67, p.3378-3385, 1989.

BLANCO, C. ***Guignardia citricarpa* Kiely: Análise genética, cariotípica e interação com o hospedeiro**. Piracicaba, 1999. 200p. Tese (Doutorado – área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

BONANTS, P. J. M.; CARROLL, G. C.; de 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. 503-513, 2003.

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.

BRIDGE, P.D.; SPOONER, B.M.; ROBERTS, P.J. The Impact of Molecular Data in Fungal Systematics. **Advances in Botanical Research**, London, v. 42, p. 33-67, 2005.

BRUNS, T.D.; WHITE, T.J.; TAYLOR, J.W. Fungal molecular systematics. **Annual Review Ecology Systems**, Palo Alto, v. 22, p.525-564, 1991.



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.

CARBONE, I.; M. KOHN, M.L. A Method for Designing Primer Sets for Speciation Studies in Filamentous Ascomycetes, **Mycologia**, Lawrence, v.91, n.3 p.553-556, 1999.

CARROLL, G. C. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic 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.

CHRISTO, D. **Variabilidade Genética e Diferenciação Molecular de Isolados Endofíticos e Patogênicos de *Guignardia* spp. e *Phyllosticta* sp.** Curitiba, 2002. 78p. Dissertação (Mestrado em Genética) Setor de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Paraná.

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.

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.

COELHO, A.S.G. **BOOD**: avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap. Goiânia: UFG, 2005.

COSTA, H.; VENTURA, J.A.; ARLEU, R.J.; AGUILAR-VILDOSO, C.I. Ocorrência de pinta Preta (*Guignardia citricarpa*) em citros no Estado do Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 28: 205, 2003. Suplemento

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.

CROUS, P.W.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M.J.; RHEEDER, J.; MARASAS, W.F.O.; PHILLIPS, A.J.L.; ALVES, A.; BURGESS, T.; BARBER, P.; GROENEWALD, J.Z. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.55, p.235-253, 2006.

CROUS, P.W.; SAMSON, R.A. CBS Laboratory Manual for Fungal Biodiversity. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands. 223p. 2009.

CULTIVAR 2005. **Hortaliças e Frutas**. Disponível em <<http://revistacultivar.locaweb.com.br/>> v.21. Acesso em 17 de março de 2005.

CULTIVAR 2007. **Hortaliças e Frutas**. Disponível em <<http://www.cultivar.inf.br/>> v.42. Acesso em 06 de abril de 2007.

CULTIVAR 2008. **Hortaliças e Frutas**. Disponível em <<http://www.cultivar.inf.br/>>v.42. Acesso em dezembro de 2008.

DAS, I.K.; FAKRUDIN, B.; ARORA, D.K. RAPD cluster analysis and chlorate sensitivity of some Indian isolates of *Macrophomina phaseolina* from sorghum and their relationships with pathogenicity. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 163, n. 2, p. 215-224, 2008.

DAUCH, A. L.; WATSON, A. K.; JABAJI-HARE, S. H. Detection of the biocontrol agent *Colletotrichum coccodes* (183088) from the target weed velvetleaf and from soil by strain-specific PCR marker. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.55, p.51-64, 2003.

DE HOOG, G.S.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous basidiomycetes. **Mycoses**, v.41, p. 183-189, 1998.

DE HOOG, GS; VICENTE, V.; CALIGIORNE, R.B; KANTARGLIOCU, S.; TINTELNOT, K.; GERRITS VAN DEN ENDE AHG; HAASE, G. Species diversity and polymorphism in the *Exophiala spinifera* clade containing opportunistic black yeast-like fungi. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington v.41, p.4767-4778, 2003.

DE WET, J.; SLIPPERS, B.; PRELSIG, O.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. Phylogeny of the Botryosphaeriaceae reveals patterns of host association. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v.46, n.1, p.116-126, 2008.

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

DUONG, L.M.; CROUS, P.; LUMYONG, S.; HYDE, K.D. Phylogenetic relationships of *Guignardia* species. **Fungal Diversity**, Harbin, 2007 (in press).

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v.1, p.47-50, 2005.

EZRA, D.; STROBEL, G. A. Effects of substrate on the bioactivity of volatile antimicrobials produced by *Muscodor albus*. **Plant Science**, St. Paul, v. 165, p.913-922, 2003.

FABRIS, J. **Diagnóstico Molecular e Distribuição de *G. citricarpa* nos Estados do Paraná e São Paulo**. Curitiba, 2009. Dissertação (Mestrado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

FAO, 2005. Disponível em: <<https://www.fao.org.br/>> Acessado em maio de 2005.

FAO, 2006. Disponível em: <<https://www.fao.org.br/>> Acessado em dezembro de 2006.

FEAU, N.; HAMELIN, R.C.; VANDECASTEELE, C.; STANOSZ, G.R.; BERNIER, L. Genetic structure of *Mycosphaerella populoram* (Anamorph *Septoria musiva*) Populations in north-central and northeastern north America. **Phytopathology**, St. Paul, v.95, n.6, p.608-616, 2005.

FEICHTENBERGER, E. Mancha preta ou pinta preta dos citros. **Laranja & Cia**, Matão, v.43, p.10-11, 1996.

FEICHTENBERGER, E.; SPÓSITO, M.B. **Doenças fúngicas dos citros: manejo integrado**. Visão agrícola, v.2, p.44-47, 2004.

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

FELTRIN, L.J. **Validação de Marcador morfológico do fungo *Guignardia citricarpa***. Curitiba, Monografia – Universidade Federal do Paraná, 50p. 2008.

FERREIRA, M. E. Aplicação de Marcadores Moleculares no mapeamento genético de plantas. In: **III Curso de Marcadores Moleculares**, EMBRAPA/CENARGEN – Brasília, DF, 1994.

FISCHER, I.H.; TOFFANO, L.; LOURENÇO, S.A.; SPÓSITO, M.B.; AMORIM, L. Incidência de mancha preta em frutos cítricos em diferentes etapas de beneficiamento em *packinghouses* e na Ceagesp. **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.4, p.326-330, 2008.

FREAN, R. T. Physiological studies with *Guignardia citricarpa* Kiely, the cause of the black spot disease of citrus. South Afr. **Thai Journal of Agriculture Science**, Bangkok, v.9, p.777-793, 1966.

FUNDECITRUS. **Doenças e Pragas**. Disponível em:  
<<http://www.fundecitrus.com.br>> Acesso em 22 de maio de 2002.

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**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. cap.8, p.205-227.

FUTUYMA, D. J. **Biologia Evolutiva**. 2ª edição. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 1992.

GALVAN, G.A; KONING-BOUCOIRAN, C.F.S; KOOPMAN, W.J.M; BURGER-MEIJER, K.; GONZÁLEZ, P.H.; WAALWIJK, C.; KIK, C.; SCHOLTEN, O.E. Genetic variation among *Fusarium* isolates from onion, and resistance to *Fusarium* basal rot in related *Allium* species. **European Journal of Plant Pathology**. Netherlands, v.21, n.4, p.499-512, 2008

GAO Xiao-Xia; Zhou, H.; Xu, Dai-Ying; Yu, Chun-Hong; Chen, Yue-Qin; Qu, Liang-Hu. High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 249, p.255-266, 2005.

GHOSE, K; DEY, S; BARTON, H; GARY, J. L.; DEBABRATA, B. Differential profiling of selected defence-related genes induced on challenge with *Alternaria brassicicola* in resistant white mustard and their comparative expression pattern in susceptible India mustard. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v.9, n.6, p.763-775, 2008.

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

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

GOES, 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. v.18, p.318. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 1993.

GOES, A. Etiologia, aspectos epidemiológicos e controle de *Guignardia citricarpa*, agente causal da mancha preta do citros. 100 p. **Relatório técnico**. 2005.

GOMES, E. A.; KASUYA, M. C. M.; BARROS, E. G.; BORGES, A.C Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.25, n.4, p.477-483, 2002.

GOPAL, K.; SREENIVASULU, Y.; GOPI, V.; PRASADBABU, G.; KUMAR, T. B.; MADHUSUDHAN, P.; AHMED, S. K.; PALANIVEL, S. G. Genetic variability and relationships among seventeen *Trichoderma* isolates to control dry root rot disease using RAPD markers. **Zeitschrift für Naturforschung C- A Journal of Biosciences**, Tübingen, v. 63, n. 9-10, p. 740-746, 2008.

GRAUR, D.; LI, W. H. **Fundamentals of Molecular Evolution**. Second Edition, Sinauer Associates, 1999.

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.

HE, J.; XU, Z.; HUGHES, J. Analyses of soil fungal communities in adjacent natural forest and hoop pine plantation ecosystems of subtropical Australia using molecular approaches based on 18S rRNA genes. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.247, n.1, p.91-100, 2005.

HEGEDUS, D. D.; KHACHATOURIANS, G. G. Identification of molecular variants in mitochondrial DNAs of members of the genera *Beauveria*, *Verticillium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium*, and *Metarhizium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.59, n.12, p.4283-4288, 1993.

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

HOEKSTRA, E.S.; APTROOT, A. CBS Course of Mycology, 4<sup>th</sup> edition, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn/Delft, the Netherlands, 1988.

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

HYNES, S.S.; CHAUDHRY, O.; PROVIDENTI, M.A.; SMITH, M.L. Development of AFLP-derived, functionally specific markers for environmental persistence studies of fungal strains. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.52, n.5, p. 451-461, 2006.

IBGE. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em 03 de janeiro de 2009.

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.

INVASIVE. Disponível em: <<http://www.invasive.org>> Acesso em 02 de janeiro de 2009.

IPARDES. Disponível em: <<http://www.ipardes.gov.br>> Acesso em 03 de janeiro de 2009.

IRINYI L., KÖVICS G. J., ERZSÉBET, S. Classification of *Phoma* species using new phylogenetic marker. **Analele Universității din Oradea**, Fascicula: Protecția Mediului, vol. XII, 2007.

JAILLOUX, F. In vitro production of the teleomorph of *Guignardia bidwellii*, causal agent of black rot of grapevine. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.70, p. 254-257, 1991.

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.

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.159-63, 1988.

KAMGAN, N.G.; JACOBS, K.; DE BEER, Z.W.; WINGFIELD, M.J.; ROUX, J. *Ceratocystis* and *Ophiostoma* species including three new taxa, associated with wounds on native South African trees. **Fungal Diversity**, Harbin, v.29, p.37-59, 2008.

KAPLAN, N. L.; HUDSON, R. R. On the divergence of genes in multigene families. **Theoretical Population Biology**, New York, v.31, p.178-194, 1987.

KAVA-CORDEIRO, V. *Guignardia citricarpa*, *G. mangiferae* e *Phyllosticta spinarum*: **Caracterização Morfológica, SCARs e RNA Dupla Fita**. Curitiba, 2004. 131p. Tese (Doutorado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

KELLERMAN, C. R.; KOTZÉ, J. M. The black spot disease of citrus and its control in South Africa. **International Society of Citriculture**, California, v.3, p.992-996, 1977.



KIELY, T.B. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* n. sp.: The ascigerous stage of *Phoma citricarpa* McAlp. and its relation to black spot of citrus. **Proceedings of the Linnean Society of New South Wales**, Matraville, v.73, p.249-292, 1948.

KIM, G.H.; YUN, H.K.; CHOI, C.S.; PARK, J.H.; JUNG, Y.J.; PARK, K.S.; DANE, F.; KANG, K.K. Identification of AFLP and RAPD markers linked to anthracnose resistance in grapes and their conversion to SCAR markers. **Plant Breeding**, Berlin, v. 127, n.4, p.418-423, 2008.

KÓTZE, J. M. A strain of *Guignardia citricarpa*, the citrus black spot pathogen. Resistant to benomyl in Souyh Africa, **Plant Disease**, St. Paul, v.65, p.945, 1981.

KROON, L.P.N.M.; BAKKER, F.T.; VAN DEN BOSCH, G.B.M., BONANTS, P.J.M.; FLIERA, W.G. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Fungal Genetics and Biology**, Kansas City, v.41, p.766–782, 2004.

KUBO, Y.; TAKAMP, 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.

LAPPALAINEN, J. H.; YLI-MATTILA, T. Genetic diversity in Finland of the birch endophyte *Gnomonia setacea* as determined by RAPD-PCR markers. **Mycological Research**, Cambridge, v.103, n.3, p.328-332, 1999.

LARENA, I.; SALAZAR, O.; GONZÁLEZ, V.; JULIÁN, M. C.; RUBIO, V. Design of a *primer* for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.75, p.187-194, 1999.

LARRALDE-CORONA, C.P.; SANTIAGO-MENA M.R.; SIFUENTES-RINCON A.M.; RODRIGUEZ-LUNA I.C.; RODRIGUEZ-PEREZ M.A.; SHIRAI K.; NARVAEZ-ZAPATA J.A. Biocontrol potential and polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strains against *Macrophomina phaseolina* isolated from sorghum and common bean. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.80, n.1, p. 167-177, 2008.

LATCH, C. G. M.; CHRISTENSEN, M. J. Artificial infection of grasse with endophytes. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v.107, p.17-24, 1985.

LAZZIZERA, C.; FRISULLO, S.; ALVES, A.; PHILLIPS, A. J. L. Morphology, phylogeny and pathogenicity of *Botryosphaeria* and *Neofusicoccum* species associated with drupe rot of olives in southern Italy. **Plant Pathology**, v.57, p.948–956, 2008.

LEUCHTMANN, A.; PETRINI, O.; PETRINI, L.E.; CARROLL, G.C. Isozyme polymorphism in six endophytic *Phyllosticta* species. **Mycological Research**, Cambridge, v.96, p.287-295, 1992.

LI, H.B.; WU, X.Q.; PENG, H.Z.; FU, L.Z.; WEI, H.L.; WU, Q.Q.; JIN, Q.Y.; LI, N. New available SCAR markers: potentially useful in distinguishing a commercial strain of the superior type from other strains of *Lentinula edodes* in China. **Applied Genetics and Molecular Biotechnology**, Berlin, v.81, n.2, p.303-309, 2008.

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

McCUTCHEON, T.L.; CARROLL, G.C.; SCHWAB, S. Genotypic diversity in populations of a fungal endophyte from Douglas Fir. **Mycologia**, Lawrence, v.85, p.180-186, 1993.

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, 1964a.

McONIE, K. C. Source of inoculum of *Guignardia citricarpa*, the citrus black spot pathogen. **Phytopathology**, St. Paul, v.54, p.64-67, 1964b.

MEGNEGNEAU, P.; DEBETS, F.; HOCKSTRA, R. F. Genetic variability and relatedness in the complex group of black *Aspergilli* based on random amplification of polymorphic DNA. **Current Genetics**, Berlin, v.23, p.323-329, 1993.

MEHTA, Y. R. Genetic Diversity Among Isolates of *Stemphylium solana* from Cotton. **Fitopatologia Brasileira**, Brasilia, v.23, p. 703-709, 2001.

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

MICHELMORE, R.W.; HULBERT, S.H. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.25, p.383-404, 1987.

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.88, p.9828-3982, 1991.

MIDORIKAWA, G.E.; PINHEIRO, M.R.; VIDIGAL, B.S.; ARRUDA, M. C.; COSTA, F.F.; PAPPAS, G.J.JR.; RIBEIRO, S.G.; FREIRE, F.; MILLER, R.N. Characterization of *Aspergillus flavus* strains from Brazilian Brazil nuts and cashew by RAPD and ribosomal DNA analysis. **Letters in Applied Microbiology**, Bedford, v.47, n.1, p.12-18, 2008.

Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Disponível em: <http://www2.desenvolvimento.gov.br/arquivo/sdp/proAcao/forCompetitividade/impZonLivComercio/13citricosResumo.pdf>. Acesso em 20 de novembro de 2008.

MOUKHAMEDOV, R.; HU, X.; NAZAR, R. N.; ROBB, J. Use of Polymerase Chain Reaction-Amplified Ribossomal Intergenic Sequences for the Diagnosis of *Verticillium tricorpus*. **Phytopathology**, St. Paul, v.84, p.256-259, 1994.

MURAI, M. Y. **Estudo da variabilidade morfológica e genética de *Guignardia* spp. por meio de marcadores moleculares**. Monografia - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 46p., 2007

NARVÁEZ, R. C.; VALENZUELA, B. J.; MUÑOZ, S. C.; HINRICHSEN, R. P. Comparison of RAPD and AFLP as methods for genetic identification on *Vitis* based on the analysis of anonymous genomic sequences. **Agricultura Técnica**, Santiago, v.60, n.4, p.320-340, 2000.

NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION) **BLAST**. Disponível em : <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>> Acesso em dezembro de 2003.

NISHIO, T.; YOSHIKURA, T.; ITOH, H. Detection of *Methylobacterium* Species by 16S rRNA Gene-Targeted PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.4, p.1594-1597, 1997.

NSW Department of Primary Industries. Disponível em: <<http://www.dpi.nsw.gov.au/>> Acesso em 03 de janeiro de 2009.

NUNES, W. M. C. Ocorrência de pinta preta, causada por *Guignardia citricarpa*, em tangerineiras “Montenegrina” no sul do Paraná. **Summa Phytopathologica**. Botucatu, SP, v.32, n.3, p.295, julho/setembro, 2006.

NUTTALL, G.H.F. *Blood Immunity and Blood Relationship*. Cambridge University Press, Cambridge, 1904.

OKANE, I.; NAKAGINI, A.; ITO, T. Identity of *Guignardia* sp. inhabiting ericaceous plants. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 79, p.101-109, 2001.

OKANE, I.; LUMYONG, S.; NAKAGIRI, A. Extensive host range of an endophytic fungus, *Guignardia endophyllicola* (anamorph: *Phyllosticta capitalensis*). **The Mycological Society of Japan and Springer-Verlag**, Tokyo, v.44, p.353-363, 2003.

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, p.439-444, 2003.

PAQUIN, B.; SHUB, D.A. Introns: Group I Structure and Function. **Encyclopedia of Life Sciences**, Article Information, 2001.

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

PATHAN, A.A.K.;DEVI, K.U.; VOGEL, H., REINEKE, A. Analysis of differential gene expression in the generalist entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin grown on different insect cuticular extracts and synthetic medium through cDNA-AFLPs. **Fungal Genetics and Biology**, Kansas City, v.44, n.12, p. 1231–1241, 2007.

PAUL, I.; VAN JAARSVELD, A.S.; KORSTEN, L.; HATTINGH, V. The potential global geographical distribution of Citrus Black Spot caused by *Guignardia citricarpa* (Kiely): likelihood of disease establishment in the European Union. **Crop Protection**, Guildford, v.24, p.297–308, 2005.

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

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

PETRINI, O. Fungal endophytic of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S.S. (Eds). **Microbial ecology of leaves**. Springer Verlag, 1991, p.179-197.

PHONGPAICHIT, S.; RUNGJINDAMAI, N.; RUKACHAISIRIKUL, V.; SAKAYAROJ, J. Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. **FEMS Immunology Medical Microbiology**. United Kingdom, v.48, p.367–372, 2006.

PICARD, Y; ROUMAGNAC, P.; LEGRAND, D.; HUMEAU L.; ROBENE-SOUSTRADE, I.; CHIROLEU F.; GAGNEVIN L.; PRUVOST O. Polyphasic characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* associated with outbreaks of bacterial blight on three *Allium* species in the Mascarene archipelago. **Phytopathology**, St. Paul, v.98, n. 8, p.919-925, 2008.

PIPE, N. D.; CHANDLER, D.; BAINBRIDGE, B. W.; HEALE, J. B. Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal RNA gene complex of isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, Cambridge, v.99, n.4, p.485-491, 1995.

PONS, N. Estudio taxonomico de especies de *Phoma* y *Phyllosticta* sobre caña de azucar (*Saccharum* sp.) **Fitopatologia Venezoela**, 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.141-238, 1953.

PUNITHALINGAM, E. Studies on Sphaeropsidales in culture II. **Mycological Papers**, Oxon, v.136, p.1-9, 1974.

PUNITHALINGAM, E. The conidial appendage in *Phyllosticta* spp.. **Nova Hedwigia**, Berlin, v.36, p.151-175, 1982.

PUTERKA, G. J.; BLACK, W. C.; STEINER, W. M.; BURTON, R. L. Genetic variation and phylogenetic relationships among worldwide collections of the russian wheat aphid, *Duraphis noxia* (MORKVILKO), inferred from allozyme and RAPD-PCR markers. **Heredity**, London, 70:604-618. 1993.

RELATÓRIO TÉCNICO. **Etiologia, Aspectos Epidemiológicos e Controle de *Guignardia citricarpa* Agente Causal da Mancha Preta dos Citros.** Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2005.

RIGOTTI, S; HANNES, K. G.; VIRET, R.; VIRET, O. Characterization of molecular markers for specific sensitive detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. In strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) using PCR. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.209, n.2, p.169-174, 2002.

RIVEROS, F. B.; MUÑOZ, G.; GONZÁLEZ, L.; ROJAS, L.; ALVEREZ. M. A.; HINRICHSEN, P. R. Comparison between DNA and morphological analysis for identification of *Fusarium* species isolated from muskmelon (*Cucumis melo* L.) **Agricultura Técnica**, Santiago, v.61, n.3, p.281-293, 2001.

ROBBS, C. F. A mancha preta dos fungos cítricos (*Phyllosticta citricarpa*): ameaça a citricultura paulista. **Laranja**, Cordeirópolis, v.11, n.1, 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. CTAA-EMBRAPA**, v.19, p.1-5, 1995.

RODRIGUES, K. F.; SIEBER, T. N.; GRÜNIG, C. R.; HOLDENRIEDER, O. Characterization of *Guignardia mangiferae* isolated from tropical plants based on morphology, ISSR\_PCR amplifications and ITS-5,8S-ITS2 sequences. **Mycological Research**, Cambridge, v.108, n.1, p.45-52, 2004.

RODRIGUEZ, K.F.; SAMUELS, G.J. Fungal endophytes of *Spondias mombin* leaves in Brazil. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v.39, n.2, p.131-135, 1999.

ROHLF, F.J. **NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system.** New York, Exeter Publishing, 1988.

ROSENBERG, N.; NORDBORG, M. Genealogical Trees, Coalescent Theory and the Analysis of Genetic Polymorphisms. **Nature Reviews**, London, v.3, p.380-390, 2002.

SAAR, D. E.; POLANS, N. O.; SORENSSEN, P. D.; DUVALL, M. R. Angiosperm DNA Contamination by Endophytic Fungi: Detection and Methods of Avoidance. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v.19, p.249-260, 2001.

SAIKI, R. K.; SCARF, S.; FALOONA, F. A.; 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.

SAMUELS, 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.

SANTORO, P.H.; NEVES, P.M.; ALEXANDRE, T.M.; SARTORI, D.; ALVES, L.F.; FUNGARO, M.H. Selection of *Beauveria bassiana* isolates to control *Alphitobius diaperinus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Amsterdam, v.97, n.2, p.83-90, 2008.

SCHENA, L.; SIALER, M. F.; GALLITELLI, D. Molecular Detection of Strain I47 of *Aureobasidium pullulans*, a Biocontrol Agent of Postharvest Diseases. **Plant Disease**, St. Paul, v.86, n.1, p.54-56, 2002.

SCHOCH, C.L.; SHOEMAKER, R.A.; SEIFERT, K.A.; HAMBLETON, S.; SPATAFORA, J.W.; CROUS, P.W. A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. **Mycologia**, Lawrence, v.98; p.1041-1052, 2006.

SCHÜEPP, H. Untersuchungen über *Guignardia citricarpa* Kiely, den Erreger der schwarzfleckenkrankheit auf Citrus. **Phytopathology**, St. Paul, v.40, p. 258-271, 1961.



SEAB. **Produtores de laranja reúnem-se em Nova América da Colina**. Disponível em: < <http://www.seab.pr.gov.br/modules/noticias/article> > Acesso em dezembro de 2008.

SECEX. Disponível em <http://www2.desenvolvimento.gov.br/sitio/secex/> Acesso em 15 de janeiro de 2009.

SHARMA, K; MISHRA, A.K.; MISRA, R. Morphological, Biochemical and Molecular Characterization of *Trichoderma harzianum* Isolates for their Efficacy as Biocontrol Agents. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v.157, n.1, p.51-56, 2009.

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.

SHENOY, B.D.; JEEWON, R.; HYDE, K.A. Impact of DNA sequence-data on the taxonomy of anamorphic fungi. **Fungal Diversity**, Harbin, v.26, n.1, p.1-54, 2007.

SHERWOOD-PIKE, M.; STONE, J.K.; CARROLL, G. C. *Rhabdocline parkeri*, a ubiquitous foliar endophyte of Douglas-fir. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.64, p.1849-1855, 1986.

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.103, p.153-160, 1999.

SILVANO, C. **Investigação e caracterização de RNA dupla fita em *Guignardia citricarpa* e *Phyllosticta spinarum***. Curitiba, Monografia - Universidade Federal do Paraná, 2008.

SINGH, M.; CHAUDHARY, K.; BOORA, K.S. RAPD-based SCAR marker SCA 12 linked to recessive gene conferring resistance to anthracnose in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v.114, n.1, p.187-192, 2006.

SIVANESAN, A. **The bitunicate ascomycetes and their anamorphs.** J. Cramer., Germany, 1984. 701p.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy.** W.H. Freeman and Company, San Francisco, 1973, 573p.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry.** W.H. Freeman and Company, San Francisco, 3<sup>a</sup>.ed., 1995, 850p.

SOUBABÈRE O.; JORGE, V.; NOTTEGHEM, J. L.; LEBRUN, M. H.; THARREAU, D. Sequence characterized amplified region markers for the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.1, p.19-21, 2001.

SOUZA, A.Q.L; SOUZA, A.D.L.; ASTOLFI, S.; 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 Amazônica**, v.34, n.2, Manaus,2004.

SPÓSITO, N. B. **Mancha Preta ou Pinta Preta já atinge 29 municípios pulistas.** Disponível em: <[http://www.agrofito.com.br/ago/mancha\\_ago.html](http://www.agrofito.com.br/ago/mancha_ago.html)> Acesso em 18 de agosto de 1999.

STILES, C. M.; OLDEMNAS, P. V. Distribution of crawberry fruit-rotting fungi in New Jersey and evidence for nonspecific host resistance. **Phytopathology**, St. Paul, v.89, n.3, p.218-225, 1999.

STINSON, M.; ERZA, D.; HESS, W. M.; SEARS, J.; STROBEL, G. An endophytic *Gliocladium* sp. Of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. **Plant Science**, St. Paul, v165, p.913-922, 2003.

StLEGER, R.J.; ALLEE, L.L.; MAY, B.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. World wide distribution of genetic variation in *Beauveria* spp.. **Mycological Research**, Cambridge, v.6, p.1007-1015, 1992.

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, 1988.

STRINGARI, D. **Estudo da variabilidade genética de *Guignardia* spp. por meio de marcadores RAPD e sequências ITS**. Curitiba, 2004, 101p. Dissertação (Mestrado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

STRINGARI, D.; WACULICZ-ANDRADE, C.E. **Manual de Biologia Molecular em Plantas Arbóreas**. Paraná: CBAB. Cap.6, p.51-68, 2008.

STROBEL, A. G. Rainforest Endophytes and Bioactive Products. **Critical Reviews in Biotechnology**. Boca Raton, v.22, n.4, p.315-333, 2002.

STROBEL, A. G. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, Paris, v.5. p.535-544, 2003.

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.

TAMURA K, DUDLEY J, NEI M; KUMAR S. **MEGA4**: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.

TEJESVI, M.V.; KINI, K.R.; PRAKASH, H.S., SUBBIAH, V.; SHETTY, H.S. Genetic diversity and antifungal activity of species of *Pestalotiopsis* isolated as endophytes from medicinal plants. **Fungal Diversity**, Harbin, v. 24, p.37-54, 2007.

The British Society for Plant Pathology. Disponível em: <<http://www.bspp.org.uk>>  
Acesso em 03 de janeiro de 2009.

Toda Fruta. Disponível em: <<http://www.todafruta.com.br>> Acesso em 17 de maio de 2007.

TOOLEY, O. W.; BUNYARD, B. A.; CARRAS, M. M.; HAYZILOUKAS, E. Development of PCR *Primers* from Internal Transcribed Spacer Region 2 for Detection of *Phytophthora* Species Infecting Patatoes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.4, p.1467-1475, 1997.

TSAI, Y. P. Citrus Black Spot control in Taiwan. **International Society of Citriculture**, California, v.1, p.344-346, 1981.

ÚRBEZ-TORRES, J. R., LEAVITT, G. M., VOEGEL, T. M., AND GUBLER, W. D. Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp.. associated with grapevine cankers in California. **Plant Disease**, St. Paul, v.90, p.1490-1503, 2006.

VALA, D.G., SOLANKY, K.U., DESAI, V.D. AND JOSHI, H.U. Diseases of mango occurring in Gujarat state. **Acta Horticulturae** (II International Symposium on Mango), v.23, p.544-550, 1989.

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

VAN GENT-PELZER, M.P.E.; VAN BROUWERSHAVEN, I.R.; KOX, L.F.F.; BONANTS, P.J.M. A TaqMan PCR method for routine diagnosis of the quarantine fungus *Guignardia citricarpa* on citrus fruit. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v.155, n.6, p.357 – 363, 2007.

VIAUD, M.; COUTEAUDIER, Y.; LEVIS, C.; RIBA, G. Genome organization in *Beauveria bassiana*: eletrophoretic karyotype, gene mapping, and telomeric fingerprinting. **Fungal Genetics and Biology**, Kansas City, v.20, p.175-183, 1996.

WANG, G.; WHITTAM, T. S.; BERG, C. M.; BERG, D. E. RAPD (arbitrary *primer*) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.21, p.5930-5933, 1993.

WATSON, J. D.; GILMAN, M.; WITKOSWSKI, J.; ZOLLER, M. **Recombinant DNA**. 2<sup>rd</sup> ed. New York: Freeman and Company. 1992.

WELSH, J., McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, p.7213-7218, 1990.

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.

WHITE Jr, J. F.; COLE, G. T. Endophyte-host associations in forage grasses. V. Ocorrence of fungal endophytes in certain species of *Bromus* and *Poa*. **Mycologia**, Lawrence, v.78, n.5, p.846-850, 1986.

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.

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

WILLIAMS, J. G. K.; HANAFEY, M. K.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzymology**, San Diego, v.218, p.704-740, 1993.

WILSON, A. D.; CLEMENTE, S. L.; KAISER, W. J. Survey and detention of endophytic fungi in *Lolium* germ plasm by direct staining and aphyi assays. **Plant Disease**, St. Paul, v.75, p.169-173, 1991.

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.

WULANDARI, N.F.; TO-ANUN, C.; HYDE, K.D.; DUONG, L.M. DE GRUYTER, J.; MEFFERT, J.P.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. *Phyllosticta citriasiana* sp. nov., the cause of Citrus tan spot of *Citrus maxima* in Asia. **Fungal Diversity**, Harbin, v.34:, p.23-39, 2009.

YAMADA, T.; TAMURA, K.; AIMI, T.; SONGSRI, P. Self-splicing group I introns in eukaryotic viruses. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.22, n.13, 1994.

YAP, I. V.; NELSON, R. J. **Winboot**: A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendograms. **IRRI discussion paper**, n.14, 1996. 22p.

ZHOU, S.G.; STANOSZ, G.R. Primers for amplification of mt SSU rDNA, and a phylogenetic study of *Botryosphaeria* and associated anamorphic fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v.105, n.9, p.1033-1044, 2001.

## APÊNDICES

### APÊNDICE 1 - NATUREZA E FREQUÊNCIA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DO GÊNERO *Phyllosticta* OBTIDOS NO ISOLAMENTO II (Continua)

Planta	Natureza	Nº de fragmentos	Nº total de isolados <sup>(1)</sup>	Frequência (%)
1	assintomática	24	0	0
2	assintomática	24	6	25,0
3	assintomática	24	0	0
4	assintomática	24	6	25,0
5	assintomática	24	3	12,5
6	assintomática	12	6	50,0
6	com sintoma	12	7	58,3
7	assintomática	24	1	4,2
8	assintomática	24	0	0
9	assintomática	24	1	4,2
10	assintomática	12	1	8,3
10	com sintoma	12	1	8,3
11	assintomática	24	2	8,3
12	assintomática	24	0	0
13	com sintoma	30	0	0
14	assintomática	24	0	0
15	assintomática	24	4	16,6
16	assintomática	24	4	16,6
17	assintomática	12	4	33,3
17	com sintoma	18	11	61,1
18	assintomática	24	0	0
19	assintomática	24	0	0
20	assintomática	24	0	0
21	assintomática	12	0	0
21	com sintoma	12	4	33,3
22	com sintoma	24	1	4,2
23	assintomática	24	5	20,8

APÊNDICE 1 - NATUREZA E FREQUÊNCIA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DO GÊNERO *Phyllosticta* OBTIDOS NO ISOLAMENTO II (Conclusão)

Planta	Natureza	Nº de fragmentos	Nº total de isolados (1)	Frequência (%)
24	assintomática	24	9	37,5
25	assintomática	24	0	0
26	assintomática	24	4	16,6
27	assintomática	24	2	8,3
28	assintomática	24	1	4,2
29	assintomática	24	5	20,8
30	com sintoma	30	6	20,0
31	assintomática	12	1	8,3
31	com sintoma	12	3	25,0
32	com sintoma	12	10	83,3
33	assintomática	6	0	0
<b>Total</b>		<b>780</b>	<b>108</b>	<b>13,8</b>

NOTA: <sup>1</sup>Número correspondente a todos os isolados de *Guignardia* sp./*Phyllosticta* sp. que apareceram na placa, e não o que efetivamente foi isolado. Frequência calculada de acordo com Souza *et al.* (2004).



APÊNDICE 2 - NATUREZA E FREQUÊNCIA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DO GÊNERO *Phyllosticta* OBTIDOS NO ISOLAMENTO III

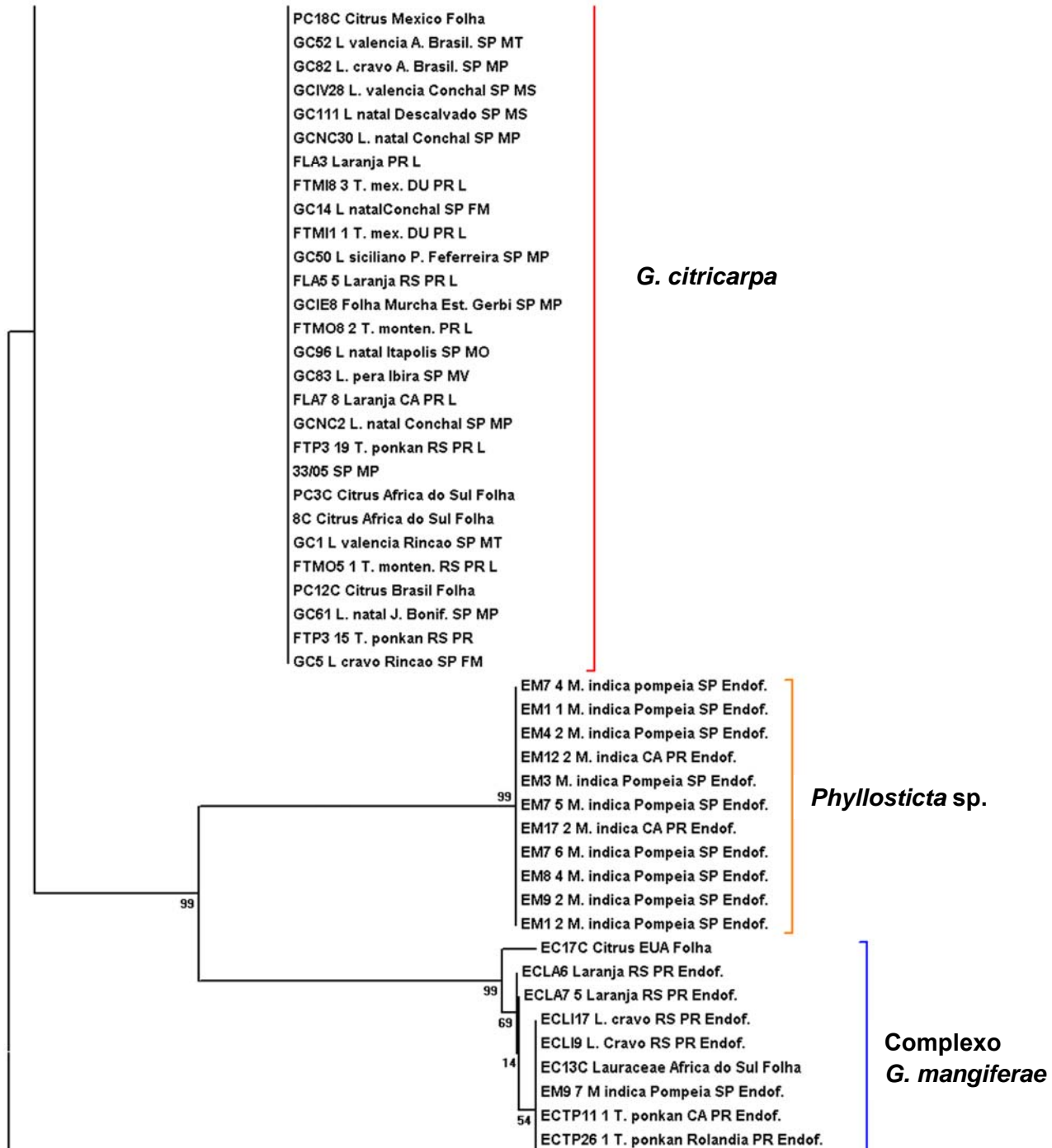
Planta	Natureza	Nº de fragmentos	Nº total de isolados <sup>(1)</sup>	Frequência (%)
1	com sintoma	30	1	3,3
2	com sintoma	30	2	6,7
3	com sintoma	24	6	25,0
4	assintomática	30	0	0
5	com sintoma	18	1	5,5
6	com sintoma	18	0	0
6	assintomática	12	1	8,3
7	com sintoma	18	2	11,1
8	com sintoma	30	11	36,0
9	com sintoma	30	3	10,0
10	com sintoma	30	5	16,7
<b>Total</b>		<b>270</b>	<b>32</b>	<b>11,8</b>

NOTA: <sup>1</sup>Número correspondente a todos os isolados de *Guignardia* sp./*Phyllosticta* sp. que apareceram na placa, e não o que efetivamente foi isolado. Frequência calculada de acordo com Souza *et al.* (2004).

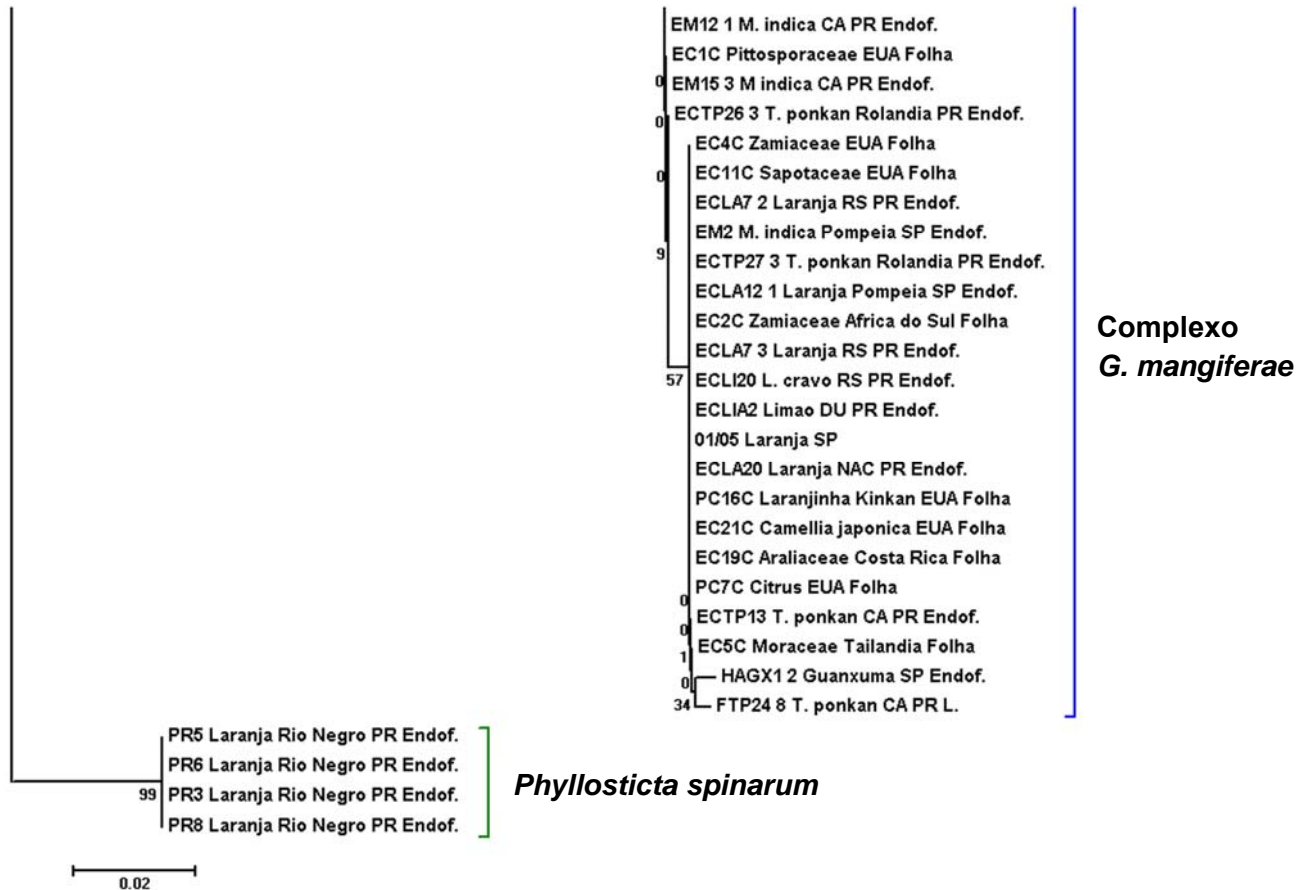
APÊNDICE 3 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DETALHADA OBTIDA COM AS SEQUÊNCIAS ITS1-5.8S-ITS2 DO rDNA E  $\alpha 1$  DO FATOR DE ELONGAÇÃO  
(Continua)



APÊNDICE 3 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DETALHADA OBTIDA COM AS SEQUÊNCIAS ITS1-5.8S-ITS2 DO rDNA E  $\alpha 1$  DO FATOR DE ELONGAÇÃO (Continuação)



APÊNDICE 3 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DETALHADA OBTIDA COM AS SEQUÊNCIAS ITS1-5.8S-ITS2 DO rDNA E  $\alpha 1$  DO FATOR DE ELONGAÇÃO (Conclusão)



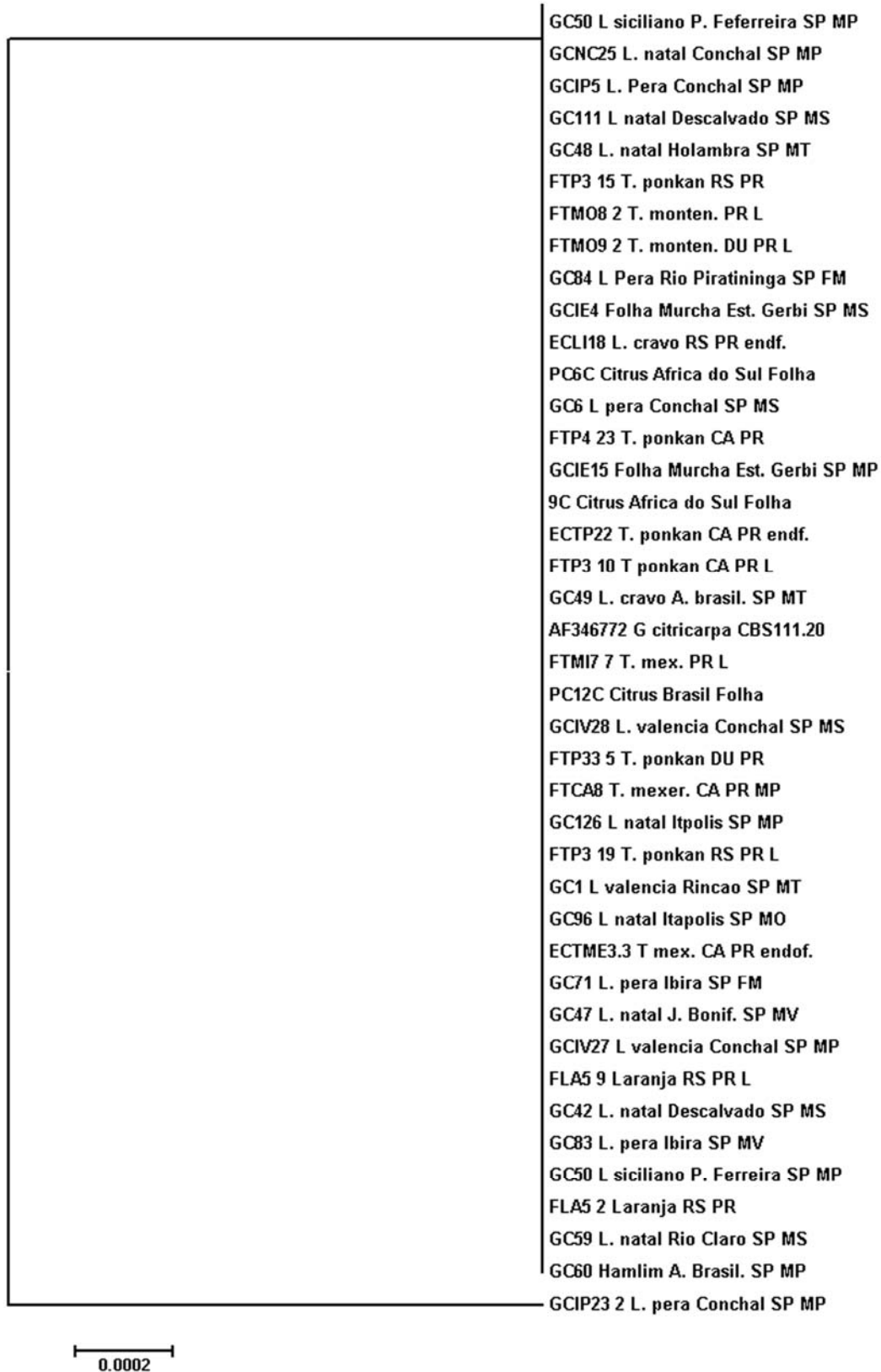
FONTE: O autor (2009).

NOTA: Árvore filogenética com 124 isolados obtida pelo método de distância por Neighbor-Joining. 76 isolados foram classificados como *G. citricarpa*, 33 como *G. mangiferae*, 11 como *Phyllosticta* sp. e 4 *P. spinarum* como grupo externo.

APÊNDICE 4 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DETALHADA DAS LINHAGENS DE *G. citricarpa* OBTIDA COM A SEQUÊNCIA ITS1-5.8S-ITS2 DO rDNA (Continua)

FLA5 5 Laranja RS PR L  
 FLA7 8 Laranja CA PR L  
 PC18C Citrus Mxico Folha  
 FTM11 1 T. mex. DU PR L  
 FTCA6 T. mex. CA PR L  
 FTM02 3 T. monten. RS PR L  
 GC14 L natalConchal SP FM  
 AF374371 *G. citricarpa* isolado 87  
 GCIE25 Folha Murcha Est. Gerbi SP MP  
 GCIE8 Folha Murcha Est. Gerbi SP MP  
 GC52 L valencia A. Brasil. SP MT  
 FTM01 1 T. monten. RS PR  
 ECTP7 T ponkan CA PR endof.  
 FTM18 3 T. mex. DU PR L  
 GCIV26 L valencia Conchal SP MS  
 33/05 SP MP  
 GC5 L cravo Rincao SP FM  
 FLA7 3 Laranja CA PR L  
 FTCA1 T. mexerica CA PR L  
 GC126 L natal Itapolis SP MP  
 GC82 L. cravo A. Brasil. SP MP  
 FTM05 1 T. monten. RS PR L  
 PC3C Citrus Africa do Sul Folha  
 FTP32 7 T. ponkan PR MP  
 FLA11 1 3052 bp  
 GCNC2 L. natal Conchal SP MP  
 GCNC30 L. natal Conchal SP MP  
 GCIV10 L valencia Conchal SP MS  
 GC61 L. natal J. Bonif. SP MP  
 8C Citrus Africa do Sul Folha  
 FTP1 3 T. ponkan PR L  
 GCIP22 2 L. pera Conchal SP MP  
 GC8 L. natal Descalvado SP FM  
 FLA3 Laranja PR L  
 GC105 T. cravo Campinas SP MS  
 PC15C Citrus Japao Folha  
 PC18C Citrus Mexico Folha  
 32/05 SP L

APÊNDICE 4 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DETALHADA DAS LINHAGENS DE *G. citricarpa* OBTIDA COM A SEQUÊNCIA ITS1-5.8S-ITS2 DO rDNA (Conclusão)



NOTA: Árvore filogenética com 79 isolados obtida pelo método de distância por *Neighbor-Joining*. **AF346772**: linhagem de *G. citricarpa* depositada no *Genbank*.

APÊNDICE 5 - IDENTIFICAÇÃO POR PCR *MULTIPLEX*, RAPD, MARCADOR MORFOLÓGICO (HALO), HOSPEDEIRO E ORIGEM DOS ISOLADOS DE *Guignardia* spp. E *Phyllosticta* spp. (Continua)

FONTE: O autor (2009). **N.R.**: não realizado.

Linhagem	Aveia	PCR	RAPD	Sequenciamento	Hospedeiro	Tecido	Origem
FTCA 1	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Mexerica"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTCA 3	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Mexerica"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTCA 4	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Mexerica"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTCA 6	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Mexerica"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTCA 8	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Mexerica"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTCA 10	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Mexerica"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTCA 11	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Mexerica"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 1.2	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 1.3	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 1.4	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 1.5	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 1.5	N.R.	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 1.6	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 1.9	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 1.10	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 2.1	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 3.3	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 3.4	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 3.5	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 3.6	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 3.7	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR

APÊNDICE 5 - IDENTIFICAÇÃO POR PCR *MULTIPLEX*, RAPD, MARCADOR MORFOLÓGICO (HALO), HOSPEDEIRO E ORIGEM DOS ISOLADOS DE *Guignardia* spp. E *Phyllosticta* spp. (Continuação)

FONTE: O autor (2009). **N.R.**: não realizado.

Linhagem	Aveia	PCR	RAPD	Sequenciamento	Hospedeiro	Tecido	Origem
FTP 3.8	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 3.9	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 3.10 m1	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 3.10 m3	+	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 3.11	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 3.12	-	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 3.13	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 3.15	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 3.16	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 3.17	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 3.19	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 3.21	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 3.23	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 3.24	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 3.25	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 3.27	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 3.27	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 3.29	+	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 4.3	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 4.8	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 4.11	-	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 4.21	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR



APÊNDICE 5 - IDENTIFICAÇÃO POR PCR MULTIPLEX, RAPD, MARCADOR MORFOLÓGICO (HALO), HOSPEDEIRO E ORIGEM DOS ISOLADOS DE *Guignardia* spp. E *Phyllosticta* spp. (Continuação)

FONTE: O autor (2009).

Linhagem	Aveia	PCR	RAPD	Sequenciamento	Hospedeiro	Tecido	Origem
FTP 4.23	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 4.36	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 5.1	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 5.4	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 6.2	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 6.3	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 6.4	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 6.12	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 6.14	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 6.15	-	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 6.33	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 6.35	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 7.1	-	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 7.2	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 7.4	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 7.8	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 7.13	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 8.2	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 10.1	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 10.2	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 11.3	-	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 11.5	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR

APÊNDICE 5 - IDENTIFICAÇÃO POR PCR MULTIPLEX, RAPD, MARCADOR MORFOLÓGICO (HALO), HOSPEDEIRO E ORIGEM DOS ISOLADOS DE *Guignardia* spp. E *Phyllosticta* spp. (Continuação)

FONTE: O autor (2009).

Linhagem	Aveia	PCR	RAPD	Sequenciamento	Hospedeiro	Tecido	Origem
FTP 11.5	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 11.7	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 11.8	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 12.1	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 12.4	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 12.6	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 13.1	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 13.2	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 14.1	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 14.2	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 14.3	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 15.1	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 15.2	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 15.5	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 16.2	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 17.1	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 17.3	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 17.7	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 18	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 19.1	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 19.6	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 20.3	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR

APÊNDICE 5 - IDENTIFICAÇÃO POR PCR MULTIPLEX, RAPD, MARCADOR MORFOLÓGICO (HALO), HOSPEDEIRO E ORIGEM DOS ISOLADOS DE *Guignardia* spp. E *Phyllosticta* spp. (Continuação)

FONTE: O autor (2009). **N.R.**: não realizado.

Linhagem	Aveia	PCR	RAPD	Sequenciamento	Hospedeiro	Tecido	Origem
FTP 20.4	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 21.1	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 21.8	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 21.12	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 21.16	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 21.17	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 22.4	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 22.8	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 23.5	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 24.5	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 24.8	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 24.9	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 24.14	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 24.16	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 25.3	+	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 25.5	+	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 25.6	-	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 25.14	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 25.16	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 25.19	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 26.2	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 27.1	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR

APÊNDICE 5 - IDENTIFICAÇÃO POR PCR MULTIPLEX, RAPD, MARCADOR MORFOLÓGICO (HALO), HOSPEDEIRO E ORIGEM DOS ISOLADOS DE *Guignardia* spp. E *Phyllosticta* spp. (Continuação)

FONTE: O autor (2009)

Linhagem	Aveia	PCR	RAPD	Sequenciamento	Hospedeiro	Tecido	Origem
FTP 27.2	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 27.3	-	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 28	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 29.2	-	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 29.6	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 30.2	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 30.4	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTP 31	-	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTP 32.5	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTP 32.6	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTP 32.7	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTP 33.1	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTP 33.4	-	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTP 33.5	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTP 33.8	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTP 33.14	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTP 33.15	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTP 33.16	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTP 34	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FLA 1	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja	Fruto	Cerro Azul - PR
FLA 3	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja	Fruto	Cerro Azul - PR
FLA 4	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja	Fruto	Cerro Azul - PR

APÊNDICE 5 - IDENTIFICAÇÃO POR PCR MULTIPLEX, RAPD, MARCADOR MORFOLÓGICO (HALO), HOSPEDEIRO E ORIGEM DOS ISOLADOS DE *Guignardia* spp. E *Phyllosticta* spp. (Continuação)

FONTE: O autor (2009). **N.R.**: não realizado.

Linhagem	Aveia	PCR	RAPD	Sequenciamento	Hospedeiro	Tecido	Origem
FLA 5.2	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja	Fruto	Cerro Azul - PR
FLA 5.3	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja	Fruto	Cerro Azul - PR
FLA 5.4	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja	Fruto	Cerro Azul - PR
FLA 5.5	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja	Fruto	Cerro Azul - PR
FLA 5.7	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja	Fruto	Cerro Azul - PR
FLA 5.9	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja	Fruto	Cerro Azul - PR
FLA 6.2	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja	Fruto	Cerro Azul - PR
FLA 6.3	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja	Fruto	Cerro Azul - PR
FLA 7.3	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja	Fruto	Cerro Azul - PR
FLA 7.5	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Laranja	Fruto	Cerro Azul - PR
FLA 7.6	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja	Fruto	Cerro Azul - PR
FLA 7.8	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja	Fruto	Cerro Azul - PR
FLA 7.10	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja	Fruto	Cerro Azul - PR
FLA 9.2	-	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja	Fruto	Cerro Azul - PR
FLA 9.3	+	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja	Fruto	Cerro Azul - PR
FLA 10.1	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja	Fruto	Cerro Azul - PR
FLA 10.2	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja	Fruto	Cerro Azul - PR
FLA 11.1	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja	Fruto	Cerro Azul - PR
FTMi 1.1	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Mexerica"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTMi 2.1	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Mexerica"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTMi 2.4	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Mexerica"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTMi 2.5	-	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Mexerica"	Fruto	Dr. Ulysses - PR

APÊNDICE 5 - IDENTIFICAÇÃO POR PCR MULTIPLEX, RAPD, MARCADOR MORFOLÓGICO (HALO), HOSPEDEIRO E ORIGEM DOS ISOLADOS DE *Guignardia* spp. E *Phyllosticta* spp. (Continuação)

FONTE: O autor (2009)

Linagem	Aveia	PCR	RAPD	Sequenciamento	Hospedeiro	Tecido	Origem
FTMi 3.1	-	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Mexerica"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTMi 4.1	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Mexerica"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTMi 5.1	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Mexerica"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTMi 5.4	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Mexerica"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTMi 5.6	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Mexerica"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTMi 5.7	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Mexerica"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTMi 5.10	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Mexerica"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTMi 5.11	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Mexerica"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTMi 6.2	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Mexerica"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTMi 6.3	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Mexerica"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTMi 7.2	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Mexerica"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTMi 7.3	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Mexerica"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTMi 7.4	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Mexerica"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTMi 7.5	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Mexerica"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTMi 7.7	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Mexerica"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTMi 8.1	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Mexerica"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTMi 8.3		<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Mexerica"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FLP 1.1	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja Pera	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FLP 1.2	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja Pera	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTMO 1.1	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Montenegrina"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTMO 1.2	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Montenegrina"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTMO 1.3	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Montenegrina"	Fruto	Cerro Azul - PR

APÊNDICE 5 - IDENTIFICAÇÃO POR PCR *MULTIPLEX*, RAPD, MARCADOR MORFOLÓGICO (HALO), HOSPEDEIRO E ORIGEM DOS ISOLADOS DE *Guignardia* spp. E *Phyllosticta* spp. (Continuação)

FONTE: O autor (2009). **N.R.**: não realizado.

Linhagem	Aveia	PCR	RAPD	Sequenciamento	Hospedeiro	Tecido	Origem
FTMO 2.2	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Montenegrina"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTMO 2.3	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Montenegrina"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTMO 3.1	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Montenegrina"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTMO 3.2	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Montenegrina"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTMO 4.1	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Montenegrina"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTMO 5.1	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Montenegrina"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTMO 5.2	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Montenegrina"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTMO 5.3	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Montenegrina"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTMO 5.4	+	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Montenegrina"	Fruto	Cerro Azul - PR
FTMO 6.1	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Montenegrina"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTMO 6.2	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Montenegrina"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTMO 7.1	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Montenegrina"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTMO 7.4	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Montenegrina"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTMO 7.7	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Montenegrina"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTMO 8.1	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Montenegrina"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTMO 8.2	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Montenegrina"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTMO 8.3	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Montenegrina"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTMO 9.2	-	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Montenegrina"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTMO 10.2	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Montenegrina"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTMO 10.4	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Montenegrina"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTMO 11.1	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Montenegrina"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTMO 11.3	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Montenegrina"	Fruto	Dr. Ulysses - PR

APÊNDICE 5 - IDENTIFICAÇÃO POR PCR *MULTIPLEX*, RAPD, MARCADOR MORFOLÓGICO (HALO), HOSPEDEIRO E ORIGEM DOS ISOLADOS DE *Guignardia* spp. E *Phyllosticta* spp. (Continuação)

FONTE: O autor (2009).

Linhagem	Aveia	PCR	RAPD	Sequenciamento	Hospedeiro	Tecido	Origem
FTMO 12.1	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Montenegrina"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
FTMO 12.2	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Montenegrina"	Fruto	Dr. Ulysses - PR
HA AF 1	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Apaga-Fogo	Folha	Rincão - SP
HAGX 1.1	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Guanxuma	Folha	Rincão - SP
HAPP 3	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Picão-Preto	Folha	Rincão - SP
ECTP 1	-	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 2	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 3	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 5	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 6.2	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 6.3	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 7	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 8.1	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 8.2	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 8.5	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 8.6	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 8.7	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 9	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 11.1	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 11.3	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 11.4	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 12.3	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR



APÊNDICE 5 - IDENTIFICAÇÃO POR PCR *MULTIPLEX*, RAPD, MARCADOR MORFOLÓGICO (HALO), HOSPEDEIRO E ORIGEM DOS ISOLADOS DE *Guignardia* spp. E *Phyllosticta* spp. (Continuação)

FONTE: O autor (2009). **N.R.**: não realizado.

Linhagem	Aveia	PCR	RAPD	Sequenciamento	Hospedeiro	Tecido	Origem
ECTP 12.4	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 13	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 14.3	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 15.1	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 15.2	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 15.4	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 15.6	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 15.7	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 16.1	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 16.2	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 16.3	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 17.1	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 17.2	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 18	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 19.3	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 21.1	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 21.2	+	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 22	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 23 m1	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 23 m4	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cerro Azul - PR
ECTP 24	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Dr. Ulysses - PR
ECTP 25	-	N.R.	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Dr. Ulysses - PR

APÊNDICE 5 - IDENTIFICAÇÃO POR PCR *MULTIPLEX*, RAPD, MARCADOR MORFOLÓGICO (HALO), HOSPEDEIRO E ORIGEM DOS ISOLADOS DE *Guignardia* spp. E *Phyllosticta* spp. (Continuação)

FONTE: O autor (2009).

Linhagem	Aveia	PCR	RAPD	Sequenciamento	Hospedeiro	Tecido	Origem
ECTP 26.1	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cambé - PR
ECTP 26.3	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cambé - PR
ECTP 26.4	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cambé - PR
ECTP 26.5	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cambé - PR
ECTP 26.8	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cambé - PR
ECTP 26.9	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cambé - PR
ECTP 26.10	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cambé - PR
ECTP 27.1	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cambé - PR
ECTP 27.2	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cambé - PR
ECTP 27.3	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cambé - PR
ECTP 27.5	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cambé - PR
ECTP 27.7	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Ponkan"	Folha	Cambé - PR
ECLi 3	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Limão "Cravo"	Folha	Cerro Azul - PR
ECLi 5	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Limão "Cravo"	Folha	Cerro Azul - PR
ECLi 8	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Limão "Cravo"	Folha	Cerro Azul - PR
ECLi 9	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Limão "Cravo"	Folha	Cerro Azul - PR
ECLi 10	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Limão "Cravo"	Folha	Cerro Azul - PR
ECLi 11	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Limão "Cravo"	Folha	Cerro Azul - PR
ECLi 13	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Limão "Cravo"	Folha	Cerro Azul - PR
ECLi 14	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Limão "Cravo"	Folha	Cerro Azul - PR
ECLi 16	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Limão "Cravo"	Folha	Cerro Azul - PR
ECLi 17	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Limão "Cravo"	Folha	Cerro Azul - PR

APÊNDICE 5 - IDENTIFICAÇÃO POR PCR *MULTIPLEX*, RAPD, MARCADOR MORFOLÓGICO (HALO), HOSPEDEIRO E ORIGEM DOS ISOLADOS DE *Guignardia* spp. E *Phyllosticta* spp. (Continuação)

FONTE: O autor (2009). **N.R.**: não realizado.

Linhagem	Aveia	PCR	RAPD	Sequenciamento	Hospedeiro	Tecido	Origem
ECLi 18	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Limão "Cravo"	Folha	Cerro Azul - PR
ECLi 19	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Limão "Cravo"	Folha	Cerro Azul - PR
ECLi 20	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Limão "Cravo"	Folha	Cerro Azul - PR
ECLi 21	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Limão "Cravo"	Folha	Cerro Azul - PR
ECLi 22 m5	+	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Limão "Cravo"	Folha	Cerro Azul - PR
ECLi 22 m12	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Limão "Cravo"	Folha	Cerro Azul - PR
ECLi 22 m13	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Limão "Cravo"	Folha	Cerro Azul - PR
ECLi 25	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Limão "Cravo"	Folha	Cerro Azul - PR
ECLa 3.2	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Laranja	Folha	Cerro Azul - PR
ECLa 4.1	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Laranja	Folha	Cerro Azul - PR
ECLa 4.2	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Laranja	Folha	Cerro Azul - PR
ECLa 5	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja	Folha	Cerro Azul - PR
ECLa 6	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Laranja	Folha	Cerro Azul - PR
ECLa 7.1	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Laranja	Folha	Cerro Azul - PR
ECLa 7.2	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Laranja	Folha	Cerro Azul - PR
ECLa 7.3	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Laranja	Folha	Cerro Azul - PR
ECLa 7.4	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Laranja	Folha	Cerro Azul - PR
ECLa 7.5	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Laranja	Folha	Cerro Azul - PR
ECLa 7.6	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Laranja	Folha	Cerro Azul - PR
ECLa 7.7	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Laranja	Folha	Cerro Azul - PR
ECLa 9.1	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Laranja	Folha	Cerro Azul - PR
ECLa 9.2	-	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja	Folha	Cerro Azul - PR

APÊNDICE 5 - IDENTIFICAÇÃO POR PCR MULTIPLEX, RAPD, MARCADOR MORFOLÓGICO (HALO), HOSPEDEIRO E ORIGEM DOS ISOLADOS DE *Guignardia* spp. E *Phyllosticta* spp. (Continuação)

FONTE: O autor (2009). NOTA: **N.A.**: não amplificou. **N.R.**: não realizado.

Linagem	Aveia	PCR	RAPD	Sequenciamento	Hospedeiro	Tecido	Origem
ECLa 9.3	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja	Folha	Cerro Azul - PR
ECLa 9.4	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Laranja	Folha	Cerro Azul - PR
ECLa 10	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Laranja	Folha	Pompéia - SP
ECLa 11	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Laranja	Folha	Pompéia - SP
ECLa 12.1	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Laranja	Folha	Pompéia - SP
ECLa 12.2	-	N.R	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Laranja	Folha	Pompéia - SP
ECLa 13	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Laranja	Folha	Pompéia - SP
ECLa 14	-	N.R	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Laranja "Folha Murcha"	Folha	Nova América da Colina-PR
ECLa 15	-	N.R	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Laranja "Folha Murcha"	Folha	Nova América da Colina-PR
ECLa 16.1	-	N.R	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Laranja "Folha Murcha"	Folha	Nova América da Colina-PR
ECLa 16.2	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Laranja "Folha Murcha"	Folha	Nova América da Colina-PR
ECLa 18	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Laranja "Folha Murcha"	Folha	Nova América da Colina-PR
ECLa 19	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Laranja "Folha Murcha"	Folha	Nova América da Colina-PR
ECLa 20	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Laranja "Folha Murcha"	Folha	Nova América da Colina-PR
EM 1.1	-	Inconclusivo	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Phyllosticta</i> sp.	Manga	Folha	Pompéia - SP
EM 1.2	-	Inconclusivo	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Phyllosticta</i> sp.	Manga	Folha	Pompéia - SP
EM 2	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Manga	Folha	Pompéia - SP
EM 3	-	N/A	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Phyllosticta</i> sp.	Manga	Folha	Pompéia - SP
EM 4.1	-	N/A	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Phyllosticta</i> sp.	Manga	Folha	Pompéia - SP
EM 4.2	-	N/A	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Phyllosticta</i> sp.	Manga	Folha	Pompéia - SP
EM 4.3	-	N/A	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Phyllosticta</i> sp.	Manga	Folha	Pompéia - SP
EM 5	-	N/A	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Phyllosticta</i> sp.	Manga	Folha	Pompéia - SP

APÊNDICE 5 - IDENTIFICAÇÃO POR PCR *MULTIPLEX*, RAPD, MARCADOR MORFOLÓGICO (HALO), HOSPEDEIRO E ORIGEM DOS ISOLADOS DE *Guignardia* spp. E *Phyllosticta* spp. (Continuação)

FONTE: O autor (2009). NOTA: **N.A.**: não amplificou. . **N.R.**: não realizado.

Linhagem	Aveia	PCR	RAPD	Sequenciamento	Hospedeiro	Tecido	Origem
EM 6	-	Inconclusivo	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Phyllosticta</i> sp.	Manga	Folha	Pompéia - SP
EM 7.1	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Manga	Folha	Pompéia - SP
EM 7.3	-	Inconclusivo	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Phyllosticta</i> sp.	Manga	Folha	Pompéia - SP
EM 7.4	-	N/A	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Phyllosticta</i> sp.	Manga	Folha	Pompéia - SP
EM 7.5	-	N/A	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Phyllosticta</i> sp.	Manga	Folha	Pompéia - SP
EM 7.6	-	N/A	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Phyllosticta</i> sp.	Manga	Folha	Pompéia - SP
EM 8.1	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Manga	Folha	Pompéia - SP
EM 8.2	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Manga	Folha	Pompéia - SP
EM 8.3	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Manga	Folha	Pompéia - SP
EM 8.4	-	N/A	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Phyllosticta</i> sp.	Manga	Folha	Pompéia - SP
EM 8.5	-	N/A	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Phyllosticta</i> sp.	Manga	Folha	Pompéia - SP
EM 9.1	-	N/A	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Phyllosticta</i> sp.	Manga	Folha	Pompéia - SP
EM 9.2	-	N/A	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Phyllosticta</i> sp.	Manga	Folha	Pompéia - SP
EM 9.3	-	N/A	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Phyllosticta</i> sp.	Manga	Folha	Pompéia - SP
EM 9.4	-	N/A	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Phyllosticta</i> sp.	Manga	Folha	Pompéia - SP
EM 9.5	-	N/A	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Phyllosticta</i> sp.	Manga	Folha	Pompéia - SP
EM 9.6	-	N/A	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Phyllosticta</i> sp.	Manga	Folha	Pompéia - SP
EM 9.7	-	<i>G. mangiferae</i>	Inconclusivo	<i>G. mangiferae</i>	Manga	Folha	Pompéia - SP
EM 11.4	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Manga	Folha	Cerro Azul - PR
EM 12.1	-	N.R	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Manga	Folha	Cerro Azul - PR
EM 12.2	-	N/A	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Phyllosticta</i> sp.	Manga	Folha	Cerro Azul - PR
EM 13.1	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Manga	Folha	Cerro Azul - PR

APÊNDICE 5 - IDENTIFICAÇÃO POR PCR *MULTIPLEX*, RAPD, MARCADOR MORFOLÓGICO (HALO), HOSPEDEIRO E ORIGEM DOS ISOLADOS DE *Guignardia* spp. E *Phyllosticta* spp. (Continuação)

FONTE: O autor (2009). NOTA: **N.A.**: não amplificou. **N.R.**: não realizado.

Linhagem	Aveia	PCR	RAPD	Sequenciamento	Hospedeiro	Tecido	Origem
EM 13.2	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Manga	Folha	Cerro Azul - PR
EM 13.3	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Manga	Folha	Cerro Azul - PR
EM 14.1	-	N.R	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Manga	Folha	Cerro Azul - PR
EM 14.2	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Manga	Folha	Cerro Azul - PR
EM 14.3	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Manga	Folha	Cerro Azul - PR
EM 15.2	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Manga	Folha	Cerro Azul - PR
EM 15.3	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Manga	Folha	Cerro Azul - PR
EM 17.2	-	N/A	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Phyllosticta</i> sp.	Manga	Folha	Cerro Azul - PR
EM 18.1	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Manga	Folha	Cerro Azul - PR
EM 18.2	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Manga	Folha	Cerro Azul - PR
EM 18.4	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Manga	Folha	Cerro Azul - PR
EM 19	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Manga	Folha	Cerro Azul - PR
EM 15.4	-	N/A	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Phyllosticta</i> sp.	Manga	Folha	Cerro Azul - PR
EM 15.5	-	N/A	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Phyllosticta</i> sp.	Manga	Folha	Cerro Azul - PR
EM 16.1	-	N/A	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Phyllosticta</i> sp.	Manga	Folha	Cerro Azul - PR
EM 16.5	-	N/A	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Phyllosticta</i> sp.	Manga	Folha	Cerro Azul - PR
EM 16.10	-	N/A	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Phyllosticta</i> sp.	Manga	Folha	Cerro Azul - PR
EM 17.4	-	N/A	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Phyllosticta</i> sp.	Manga	Folha	Cerro Azul - PR
EM 17.6	-	N/A	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Phyllosticta</i> sp.	Manga	Folha	Cerro Azul - PR
EM 18.5	-	N/A	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Phyllosticta</i> sp.	Manga	Folha	Cerro Azul - PR
ECTMe 2.1	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Mexerica"	Folha	Dr. Ulysses - PR
ECTMe 3.3	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Mexerica"	Folha	Dr. Ulysses - PR

APÊNDICE 5 - IDENTIFICAÇÃO POR PCR *MULTIPLEX*, RAPD, MARCADOR MORFOLÓGICO (HALO), HOSPEDEIRO E ORIGEM DOS ISOLADOS DE *Guignardia* spp. E *Phyllosticta* spp. (Continuação)

FONTE: O autor (2009). NOTA: **N.R.**: não realizado.

Linhagem	Aveia	PCR	RAPD	Sequenciamento	Hospedeiro	Tecido	Origem
ECTMe 3.4	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Mexerica"	Folha	Dr. Ulysses - PR
ECTMe 4.1	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Mexerica"	Folha	Dr. Ulysses - PR
ECTMe 9.2	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Mexerica"	Folha	Rolândia - PR
ECTMe 9.4	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Mexerica"	Folha	Rolândia - PR
ECTMe 9.6	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Mexerica"	Folha	Rolândia - PR
ECTMe 9.7	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Mexerica"	Folha	Rolândia - PR
ECTMe 9.8	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Mexerica"	Folha	Rolândia - PR
ECTMe 9.9	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Mexerica"	Folha	Rolândia - PR
ECTMe 9.10	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Mexerica"	Folha	Rolândia - PR
ECTMe 9.11	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Mexerica"	Folha	Rolândia - PR
ECTMe 9.12	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Mexerica"	Folha	Rolândia - PR
ECTMe 9.13	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Mexerica"	Folha	Rolândia - PR
ECTMe 9.14	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Tangerina "Mexerica"	Folha	Rolândia - PR
ECLiA 1.1	-	N.R	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Lima Ácida "Tahiti"	Folha	Cerro Azul - PR
ECLiA 1.2	-	N.R	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Lima Ácida "Tahiti"	Folha	Cerro Azul - PR
ECLiA 2	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Lima Ácida "Tahiti"	Folha	Cerro Azul - PR
ECLiA 3	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Lima Ácida "Tahiti"	Folha	Cerro Azul - PR
ECLaP	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja	Folha	Paranaíba - PR
EC1C	N.R.	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Pittosporaceae	Folha	EUA
EC2C	N.R.	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Zamiaceae	Folha	África do Sul
PC3C	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>Citrus</i> sp.	Folha	África do Sul
EC4C	N.R.	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Zamiaceae	Folha	EUA

APÊNDICE 5 - IDENTIFICAÇÃO POR PCR *MULTIPLEX*, RAPD, MARCADOR MORFOLÓGICO (HALO), HOSPEDEIRO E ORIGEM DOS ISOLADOS DE *Guignardia* spp. E *Phyllosticta* spp. (Continuação)

FONTE: O autor (2009). NOTA: **N.R.:** não realizado.

Linhagem	Aveia	PCR	RAPD	Sequenciamento	Hospedeiro	Tecido	Origem
EC5C	N.R.	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Moraceae	Folha	Tailândia
PC6C	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>Citrus</i> sp.	Folha	África do Sul
PC7C	N.R.	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>Citrus</i> sp.	Folha	EUA
PC8C	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>Citrus</i> sp.	Folha	África do Sul
PC9C	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>Citrus</i> sp.	Folha	África do Sul
PC10C	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>Citrus</i> sp.	Folha	África do Sul
EC11C	N.R.	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Sapotaceae	Folha	EUA
PC12C	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>Citrus</i> sp.	Folha	Brasil
EC13C	N.R.	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Lauraceae	Folha	África do Sul
EC14C	N.R.	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Araliaceae	Folha	África do Sul
PC15C	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>Citrus</i> sp.	Folha	Japão
EC16C	N.R.	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Laranjinha Kinkan	Folha	EUA
EC17C	N.R.	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>Citrus</i> sp.	Folha	EUA
PC18C	N.R.	2 bandas	N.R.	<i>G. mangiferae</i>	<i>Citrus</i> sp.	Folha	México
EC19C	N.R.	N.R	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Araliaceae	Folha	Costa Rica
EC20C	N.R.	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Rubiaceae	Folha	EUA
EC21C	N.R.	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>Camellia japonica</i>	Folha	EUA
B1515	N.R.	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Goiaba	Folha	Distrito Federal
IP-5	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja Pera	Fruto	Conchal - SP
IP-18.1	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja Pera	Fruto	Conchal - SP
IP -23.2	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja Pera	Fruto	Conchal - SP
IP -22.2	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja Pera	Fruto	Conchal - SP



APÊNDICE 5 - IDENTIFICAÇÃO POR PCR *MULTIPLEX*, RAPD, MARCADOR MORFOLÓGICO (HALO), HOSPEDEIRO E ORIGEM DOS ISOLADOS DE *Guignardia* spp. E *Phyllosticta* spp. (Continuação)

FONTE: O autor (2009). NOTA: **N.R.**: não realizado.

Linhagem	Aveia	PCR	RAPD	Sequenciamento	Hospedeiro	Tecido	Origem
IV-10	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Valência"	Fruto	Conchal - SP
IV-26	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Valência"	Fruto	Conchal - SP
IV-27	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Valência"	Fruto	Conchal - SP
IV-28	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Valência"	Fruto	Conchal - SP
IE-4	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Folha Murcha"	Fruto	Estiva Gerbi - SP
IE-8	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Folha Murcha"	Fruto	Estiva Gerbi - SP
IE-15	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Folha Murcha"	Fruto	Estiva Gerbi - SP
IE-19	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Folha Murcha"	Fruto	Estiva Gerbi - SP
IE-24	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Folha Murcha"	Fruto	Estiva Gerbi - SP
IE-25	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Folha Murcha"	Fruto	Estiva Gerbi - SP
IE-32	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Folha Murcha"	Fruto	Estiva Gerbi - SP
NC-2	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Natal"	Fruto	Conchal - SP
NC-5	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Natal"	Fruto	Conchal - SP
NC-8	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Natal"	Fruto	Conchal - SP
NC-25	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Natal"	Fruto	Conchal - SP
NC-30	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Natal"	Fruto	Conchal - SP
1	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Valência"	Fruto	Rincão - SP
5	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Limão "Cravo"	Fruto	Rincão - SP
6	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja Pera	Fruto	Conchal - SP
8	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Natal"	Fruto	Descalvado - SP
14	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Natal"	Fruto	Conchal - SP
18	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Valência"	Fruto	Bebedouro - SP

APÊNDICE 5 - IDENTIFICAÇÃO POR PCR *MULTIPLEX*, RAPD, MARCADOR MORFOLÓGICO (HALO), HOSPEDEIRO E ORIGEM DOS ISOLADOS DE *Guignardia* spp. E *Phyllosticta* spp. (Continuação)

FONTE: O autor (2009). NOTA: **N.R.**: não realizado.

Linhagem	Aveia	PCR	RAPD	Sequenciamento	Hospedeiro	Tecido	Origem
19	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Natal"	Fruto	Olímpia - SP
37	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Natal"	Fruto	Itápolis - SP
42	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Natal"	Fruto	Descalvado - SP
47	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Natal"	Fruto	José Bonifácio - SP
48	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Natal"	Fruto	Holambra - SP
49	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Limão "Cravo"	Fruto	A.Brasiliense - SP
50	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Limão "Siciliano"	Fruto	Porto Ferreira - SP
52	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Valência"	Fruto	A.Brasiliense - SP
59	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Natal"	Fruto	"Rio" Claro - SP
60	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Hamlim"	Fruto	A.Brasiliense - SP
61	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Natal"	Fruto	José Bonifácio - SP
62	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Valência"	Fruto	Rincão - SP
71	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja Pera	Fruto	Ibirá - SP
72	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja Lima	Fruto	Rincão - SP
82	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Limão "Cravo"	Fruto	A. Brasileira - SP
83	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja Pera	Fruto	Ibirá - SP
84	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Pera-Rio"	Fruto	Piratininga - SP
87	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Natal"	Fruto	Descalvado - SP
91	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Limão "Cravo"	Fruto	A. Brasileira - SP
94	N.R.	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Laranja "Natal"	Fruto	Tambaú - SP
96	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Natal"	Fruto	Itápolis - SP
99	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Natal"	Fruto	Holambra - SP

APÊNDICE 5 - IDENTIFICAÇÃO POR PCR *MULTIPLEX*, RAPD, MARCADOR MORFOLÓGICO (HALO), HOSPEDEIRO E ORIGEM DOS ISOLADOS DE *Guignardia* spp. E *Phyllosticta* spp. (Conclusão)

FONTE: O autor (2009). NOTA: **N.R.**: não realizado.

Linhagem	Aveia	PCR	RAPD	Sequenciamento	Hospedeiro	Tecido	Origem
105	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Tangerina "Cravo"	Fruto	Campinas - SP
111	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Natal"	Fruto	Descalvado - SP
123	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Natal"	Fruto	José Bonifácio - SP
126	N.R.	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja "Natal"	Fruto	Itápolis - SP
01/05	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Lima Ácida "Tahiti"	Fruto	Conchal - SP
19/05	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Lima Ácida "Tahiti"	Folha	Conchal - SP
22/05	-	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>	Lima Ácida "Tahiti"	Fruto	Conchal - SP
28/05	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Lima Ácida "Tahiti"	Folha	Conchal - SP
32/05	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Lima Ácida "Tahiti"	Fruto	Conchal - SP
33/05	+	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. citricarpa</i>	Laranja Pera "Rio"	Fruto	Conchal - SP
ECPR 3	-	N.R.	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>P. spinarum</i>	Limão	Folha	"Rio" Negro - PR
ECPR 5	-	N.R.	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>P. spinarum</i>	Limão	Folha	"Rio" Negro - PR
ECPR 6	-	N.R.	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>P. spinarum</i>	Limão	Folha	"Rio" Negro - PR
ECPR 8	-	N.R.	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>P. spinarum</i>	Limão	Folha	"Rio" Negro - PR
ECPR 10	-	N.R.	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>P. spinarum</i>	Limão	Folha	"Rio" Negro - PR

APÊNDICE 6 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA MOLECULAR (AMOVA) DOS MARCADORES RAPD PARA *G. citricarpa* CONSIDERANDO 7 CARACTERÍSTICAS DISTINTAS (Continua)

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among populations	5	21.480	0.26264 Va	9.43
Within populations	42	105.978	2.52328 Vb	90.57
Total	47	127.458	2.78592	
Fixation Index	FST :	0.09427		
Significance tests (10100 permutations)				
Va and FST : P(rand. value > obs. value) = 0.01881				
P(rand. value = obs. value) = 0.00000				
P-value = 0.01881+-0.00149				

Nota: A AMOVA para diferentes sintomas da MPC está representada pelas populações de isolados com Mancha Trincada, Mancha Preta, Mancha Virulenta, Mancha Sardenta, Mancha Oleosa e Falsa Melanose.

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among populations	4	68.600	0.43550 Va	21.61
Within populations	283	447.170	1.58011 Vb	78.39
Total	287	515.771	2.01561	
Fixation Index	FST :	0.21607		
Significance tests (10100 permutations)				
Va and FST : P(rand. value > obs. value) = 0.00000				
P(rand. value = obs. value) = 0.00000				
P-value = 0.00000+-0.00000				

Nota: A AMOVA para diferentes hospedeiros está representada pelas populações de isolados oriundos de *Citrus reticulata*, *C. sinensis*, *C. limonia*, *C. latifolia* e *Citrus* sp..

APÊNDICE 6 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA MOLECULAR (AMOVA) DOS MARCADORES RAPD PARA *G. citricarpa* CONSIDERANDO 7 CARACTERÍSTICAS DISTINTAS (Continuação)

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among populations	8	94.003	0.35241 Va	18.91
Within populations	278	420.254	1.51171 Vb	81.09
Total	286	514.258	1.86412	
Fixation Index	FST :	0.18905		
Significance tests (10100 permutations)				
Va and FST : P(rand. value > obs. value) = 0.00000				
P(rand. value = obs. value) = 0.00000				
P-value = 0.00000+-0.00000				

Nota: A AMOVA para diferentes épocas de isolamentos está representada pelas populações dos 7 isolamentos realizados neste trabalho (QUADROS 5 e 6) e isolamentos anteriores realizados por Silvano (2008), por Carroll (QUADRO 1) e pelo Prof. Dr. Antonio de Goes (QUADRO 2).

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among populations	20	140.759	0.66383 Va	32.10
Within populations	266	373.499	1.40413 Vb	67.90
Total	286	514.258	2.06797	
Fixation Index	FST :	0.32101		
Significance tests (10100 permutations)				
Va and FST : P(rand. value > obs. value) = 0.00000				
P(rand. value = obs. value) = 0.00000				
P-value = 0.00000+-0.00000				

Nota: A AMOVA para diferentes locais de coleta está representada pelas populações de isolados provenientes de Cerro Azul, Dr. Ulisses e Paranavaí no Estado do Paraná; isolados provenientes de Conchal, Estiva Gerbi, Rincão, Descalvado, Bebedouro, Olímpia, José Bonifácio, Holambra, A.Brasiliense, Porto Ferreira, Rio Claro, Ibirá, Piratininga e Itápolis no Estado de São Paulo; e isolados provenientes da África do Sul, Japão, México e Brasil.

APÊNDICE 6 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA MOLECULAR (AMOVA) DOS MARCADORES RAPD PARA *G. citricarpa* CONSIDERANDO 7 CARACTERÍSTICAS DISTINTAS (Continuação)

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among populations	17	115.029	0.56359 Va	28.52
Within populations	264	372.999	1.41288 Vb	71.48
Total	281	488.028	1.97647	
Fixation Index	FST :	0.28515		
Significance tests (10100 permutations)				
Va and FST : P(rand. value > obs. value) = 0.00000				
P(rand. value = obs. value) = 0.00000				
P(rand. value >= obs. value) = 0.00000+-0.00000				

Nota: A AMOVA para diferentes locais de coleta está representada pelas populações de isolados oriundos somente do Brasil conforme descrição acima.

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among populations	1	10.238	0.11578 Va	6.15
Within populations	286	505.533	1.76760 Vb	93.85
Total	287	515.771	1.88338	
Fixation Index	FST :	0.06147		
Significance tests (10100 permutations)				
Va and FST : P(rand. value > obs. value) = 0.00040				
P(rand. value = obs. value) = 0.00000				
P-value = 0.00040+-0.00019				

Nota: A AMOVA para diferentes tecidos está representada pelas populações de isolados oriundos de fruto e de folha.

APÊNDICE 6 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA MOLECULAR (AMOVA) DOS MARCADORES RAPD PARA *G. citricarpa* CONSIDERANDO 7 CARACTERÍSTICAS DISTINTAS (Conclusão)

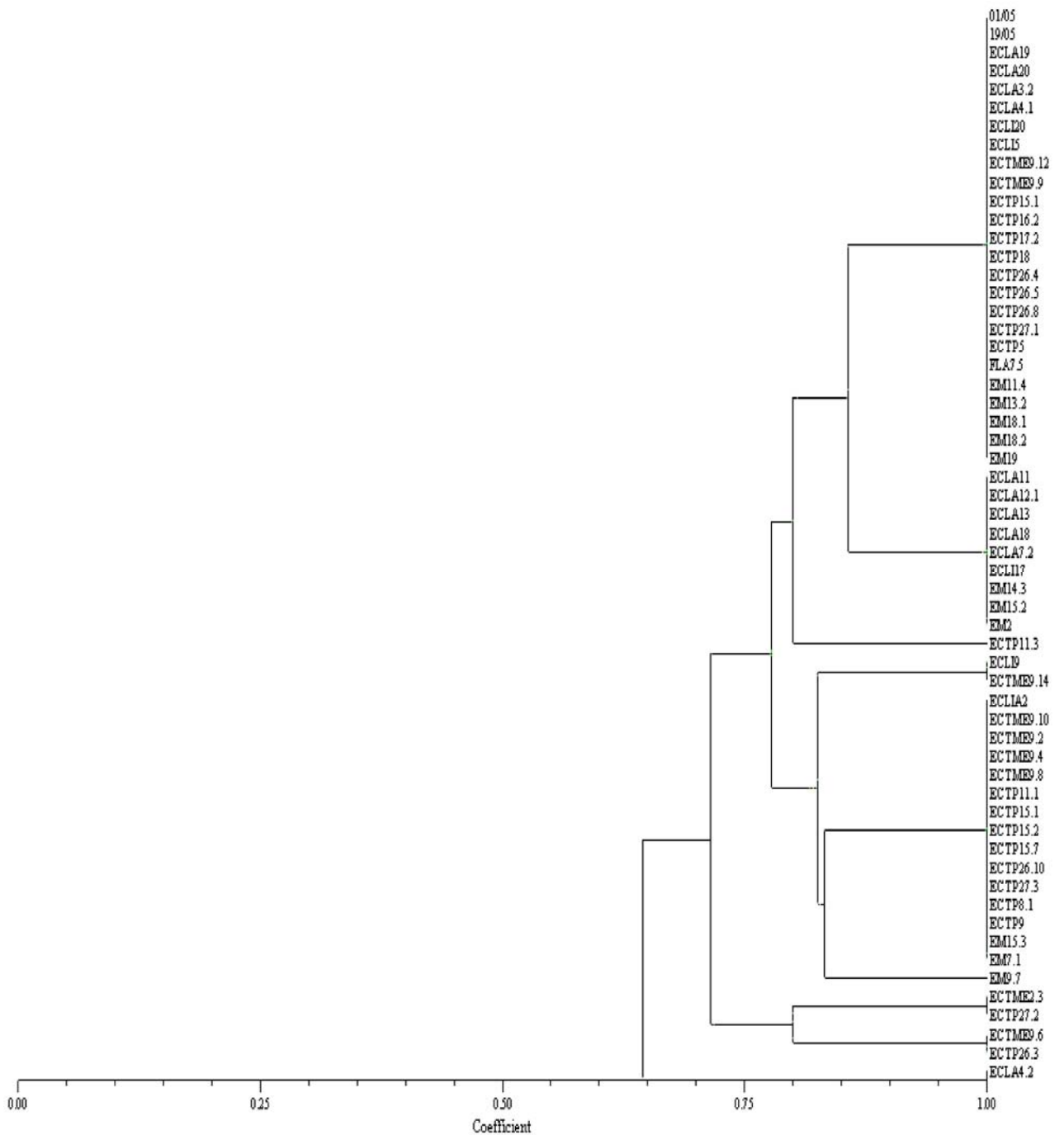
Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among populations	14	119.730	0.45994 Va	24.07
Within populations	273	396.041	1.45070 Vb	75.93
Total	287	515.771	1.91064	
Fixation Index	FST :	0.24072		
Significance tests (10100 permutations)				
Va and FST : P(rand. value > obs. value) = 0.00000				
P(rand. value = obs. value) = 0.00000				
P-value = 0.00000+-0.00000				

Nota: A AMOVA para diferentes variedades está representada pelas populações de isolados oriundos de Tangerina "Mexerica", Tangerina "Montenegrina", Tangerina "Ponkan", Laranja "Pera", "Pera Rio", "Valência", "Folha Murcha", "Natal", "Hamlim", "Lima", Limão "Cravo" e Limão "Siciliano".

**ANEXOS**



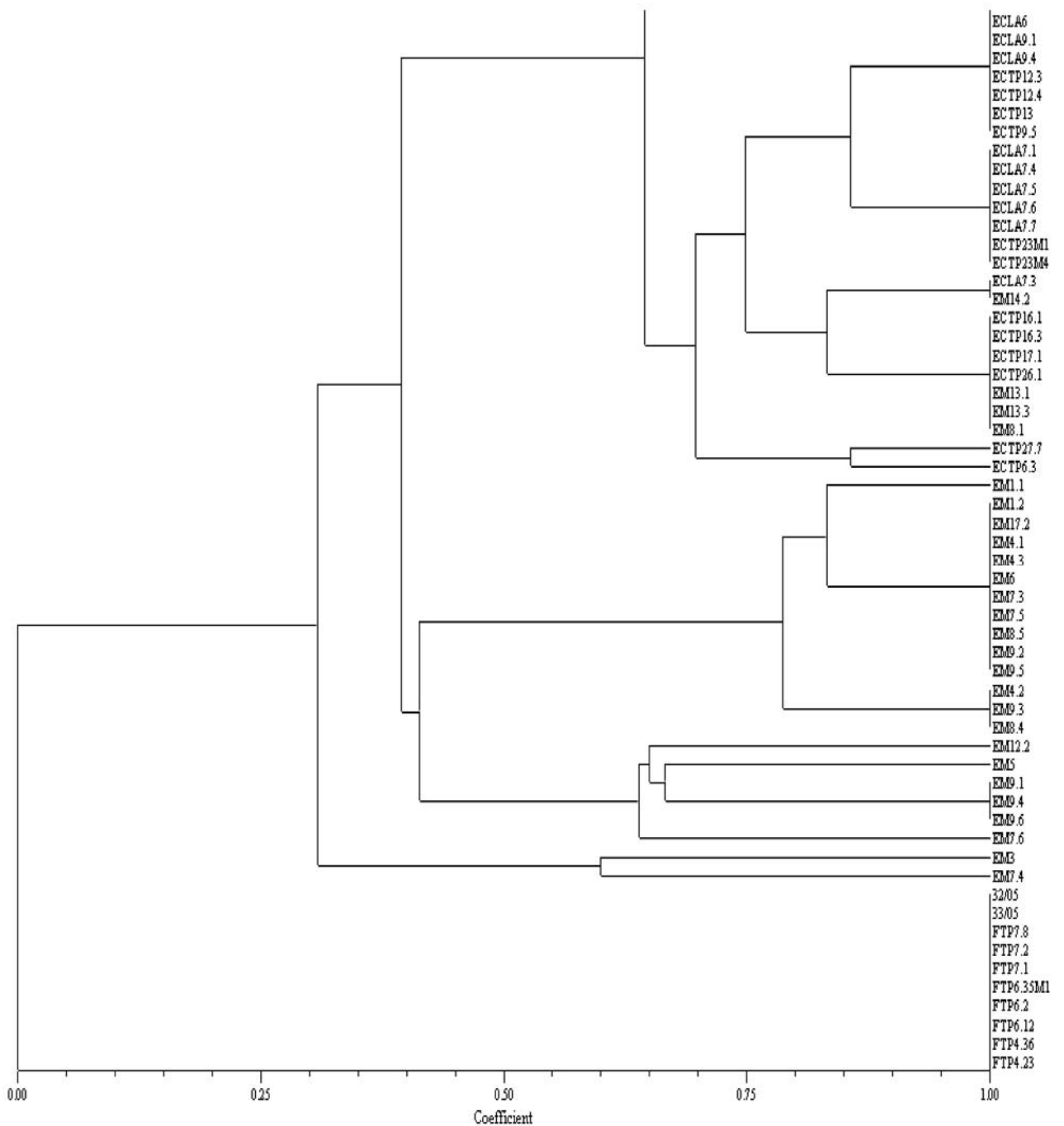
ANEXO 1 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE AS LINHAGENS DE *Guignardia* spp. E *Phyllosticta* sp. (Continua)



FONTE: Feltrin (2008).

NOTA: Dendrograma gerado a partir da similaridade genética de *G. citricarpa* obtida por marcadores RAPD (*primer* OPX11), utilizando-se o coeficiente de Jaccard. As mesmas linhagens foram utilizadas no presente trabalho e estão descritas nos QUADROS 1, 3 e 4

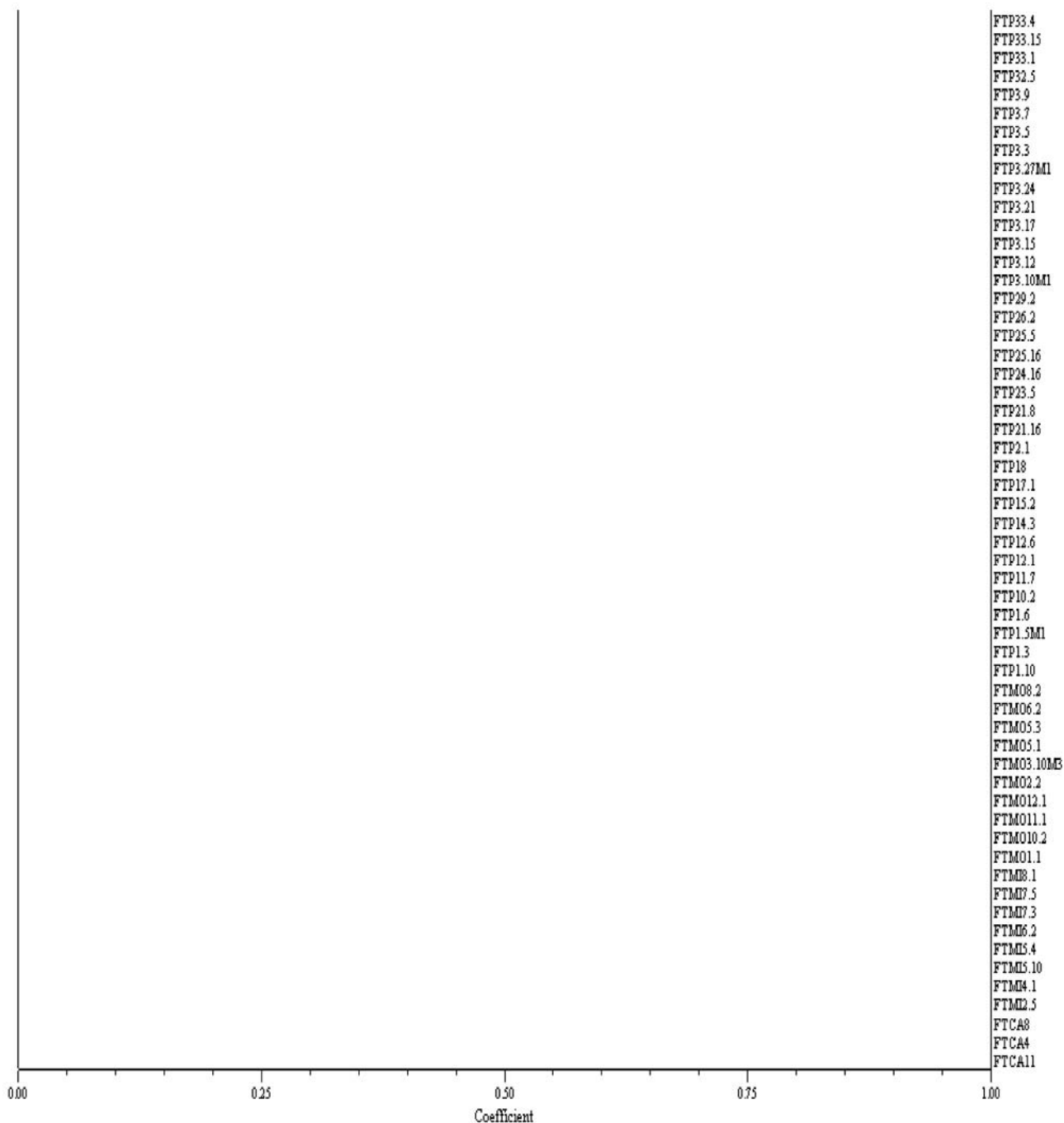
ANEXO 1 – DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE AS LINHAGENS DE *Guignardia* spp. E *Phyllosticta* sp. (Continuação)



FONTE: Feltrin (2008).

NOTA: Dendrograma gerado a partir da similaridade genética de *G. citricarpa* obtida por marcadores RAPD (*primer* OPX11), utilizando-se o coeficiente de Jaccard. As mesmas linhagens foram utilizadas no presente trabalho e estão descritas nos QUADROS 1, 3 e 4.

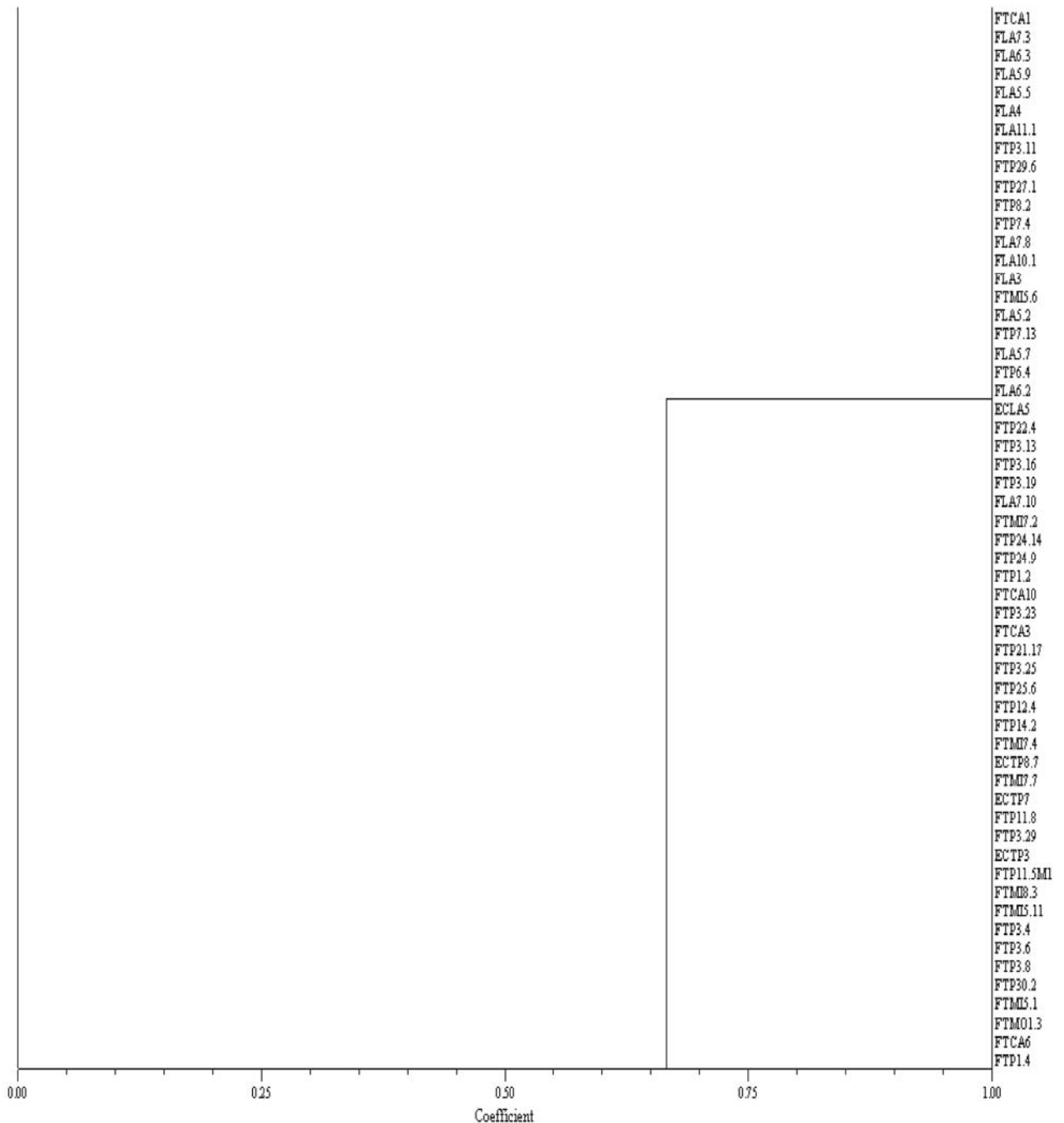
ANEXO 1 – DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE AS LINHAGENS DE *Guignardia* spp. E *Phyllosticta* sp. (Continuação)



FONTE: Feltrin (2008).

NOTA: Dendrograma gerado a partir da similaridade genética de *G. citricarpa* obtida por marcadores RAPD (*primer* OPX11), utilizando-se o coeficiente de Jaccard. As mesmas linhagens foram utilizadas no presente trabalho e estão descritas nos QUADROS 1, 3 e 4.

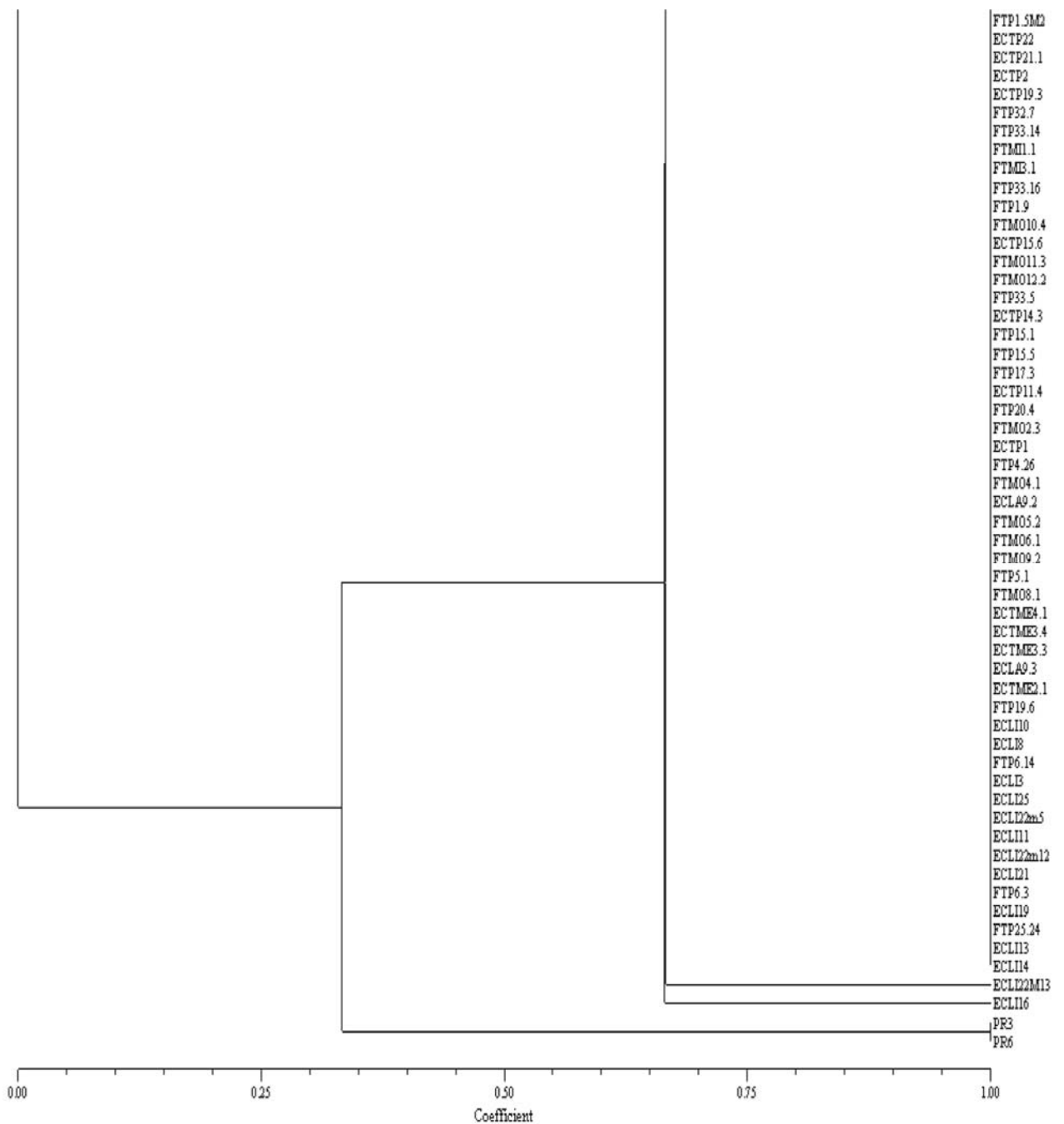
ANEXO 1 – DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE AS LINHAGENS DE *Guignardia* spp. E *Phyllosticta* sp. (Continuação)



FONTE: Feltrin (2008).

NOTA: Dendrograma gerado a partir da similaridade genética de *G. citricarpa* obtida por marcadores RAPD (*primer* OPX11), utilizando-se o coeficiente de Jaccard. As mesmas linhagens foram utilizadas no presente trabalho e estão descritas nos QUADROS 1, 3 e 4.

ANEXO 1 – DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE AS LINHAGENS *Guignardia* spp. E *Phyllosticta* sp. (Continuação)



FONTE: Feltrin (2008).

NOTA: Dendrograma gerado a partir da similaridade genética de *G. citricarpa* obtida por marcadores RAPD (*primer* OPX11), utilizando-se o coeficiente de Jaccard. As mesmas linhagens foram utilizadas no presente trabalho e estão descritas nos QUADROS 1, 3 e 4.

ANEXO 2 - NOMENCLATURA DOS ISOLADOS DE *Guignardia* spp. E *Phyllosticta* sp. UTILIZADA EM PUBLICAÇÕES (Continua)

Nomenclatura	Isolado	Nomenclatura	Isolado	Nomenclatura	Isolado
LGMF1	01/05	LGMF45	FTMi 1.1	LGMF89	FTMO 11.1
LGMF2	19/05	LGMF46	FTMi 2.1	LGMF90	FTMO 11.3
LGMF3	22/05	LGMF47	FTMi 2.4	LGMF91	FTMO 12.1
LGMF4	28/05	LGMF48	FTMi 2.5	LGMF92	FTMO 12.2
LGMF5	32/05	LGMF49	FTMi 3.1	LGMF93	FTP 1.2
LGMF6	33/05	LGMF50	FTMi 4.1	LGMF94	FTP 1.3
LGMF7	ECPR 3	LGMF51	FTMi 5.1	LGMF95	FTP 1.4
LGMF8	ECPR 5	LGMF52	FTMi 5.4	LGMF96	FTP 1.5
LGMF9	ECPR 6	LGMF53	FTMi 5.6	LGMF97	FTP 1.6
LGMF10	ECPR 8	LGMF54	FTMi 5.7	LGMF98	FTP 1.9
LGMF11	ECPR 10	LGMF55	FTMi 5.10	LGMF99	FTP 1.10
LGMF13	ECLaP	LGMF56	FTMi 5.11	LGMF100	FTP 2.1
LGMF14	FLA 1	LGMF57	FTMi 6.2	LGMF101	FTP 3.3
LGMF15	FLA 3	LGMF58	FTMi 6.3	LGMF102	FTP 3.4
LGMF16	FLA 4	LGMF59	FTMi 7.2	LGMF103	FTP 3.5
LGMF17	FLA 5.2	LGMF60	FTMi 7.3	LGMF104	FTP 3.6
LGMF18	FLA 5.3	LGMF61	FTMi 7.4	LGMF105	FTP 3.7
LGMF19	FLA 5.4	LGMF62	FTMi 7.5	LGMF106	FTP 3.8
LGMF20	FLA 5.5	LGMF63	FTMi 7.7	LGMF107	FTP 3.9
LGMF21	FLA 5.7	LGMF64	FTMi 8.1	LGMF108	FTP 3.10
LGMF22	FLA 5.9	LGMF65	FTMi 8.3	LGMF109	FTP 3.10
LGMF24	FLA 6.2	LGMF66	FTMO 1.1	LGMF110	FTP 3.11
LGMF23	FLA 6.3	LGMF67	FTMO 1.2	LGMF111	FTP 3.12
LGMF25	FLA 7.3	LGMF68	FTMO 1.3	LGMF112	FTP 3.13
LGMF26	FLA 7.5	LGMF69	FTMO 2.2	LGMF113	FTP 3.15
LGMF27	FLA 7.6	LGMF70	FTMO 2.3	LGMF114	FTP 3.16
LGMF28	FLA 7.8	LGMF71	FTMO 3.1	LGMF115	FTP 3.17
LGMF29	FLA 7.10	LGMF72	FTMO 3.2	LGMF116	FTP 3.19
LGMF30	FLA 9.2	LGMF73	FTMO 4.1	LGMF117	FTP 3.21
LGMF1	01/05	LGMF74	FTMO 5.1	LGMF118	FTP 3.23
LGMF31	FLA 9.3	LGMF75	FTMO 5.2	LGMF119	FTP 3.24
LGMF32	FLA 10.1	LGMF76	FTMO 5.3	LGMF120	FTP 3.25
LGMF33	FLA 10.2	LGMF77	FTMO 5.4	LGMF121	FTP 3.27
LGMF34	FLA 11.1	LGMF78	FTMO 6.1	LGMF122	FTP 3.27
LGMF35	FLP 1.1	LGMF79	FTMO 6.2	LGMF123	FTP 3.29
LGMF36	FLP 1.2	LGMF80	FTMO 7.1	LGMF124	FTP 4.3
LGMF37	FTCA 1	LGMF81	FTMO 7.4	LGMF125	FTP 4.8
LGMF38	FTCA 3	LGMF82	FTMO 7.7	LGMF126	FTP 4.11
LGMF39	FTCA 4	LGMF83	FTMO 8.1	LGMF127	FTP 4.21
LGMF40	FTCA 6	LGMF84	FTMO 8.2	LGMF128	FTP 4.23
LGMF41	FTCA 8	LGMF85	FTMO 8.3	LGMF129	FTP 4.36
LGMF42	FTCA 9	LGMF86	FTMO 9.2	LGMF130	FTP 5.1
LGMF43	FTCA 10	LGMF87	FTMO 10.2	LGMF131	FTP 5.4
LGMF44	FTCA 11	LGMF88	FTMO 10.4	LGMF132	FTP 6.2

ANEXO 2 - NOMENCLATURA DOS ISOLADOS DE *Guignardia* spp. E *Phyllosticta* sp. UTILIZADA EM PUBLICAÇÕES (Continuação)

Nomenclatura	Isolado	Nomenclatura	Isolado	Nomenclatura	Isolado
LGMF133	FTP 6.3	LGMF177	FTP 22.4	LGMF221	ECLa 7.4
LGMF134	FTP 6.4	LGMF178	FTP 22.8	LGMF222	ECLa 7.5
LGMF135	FTP 6.12	LGMF179	FTP 23.5	LGMF223	ECLa 7.6
LGMF136	FTP 6.14	LGMF180	FTP 24.5	LGMF224	ECLa 7.7
LGMF137	FTP 6.15	LGMF181	FTP 24.8	LGMF225	ECLa 9.1
LGMF138	FTP 6.33	LGMF182	FTP 24.9	LGMF226	ECLa 9.2
LGMF139	FTP 6.35	LGMF183	FTP 24.14	LGMF227	ECLa 9.3
LGMF140	FTP 7.1	LGMF184	FTP 24.16	LGMF228	ECLa 9.4
LGMF141	FTP 7.2	LGMF185	FTP 25.3	LGMF229	ECLa 10
LGMF142	FTP 7.3	LGMF186	FTP 25.5	LGMF230	ECLa 11
LGMF143	FTP 7.4	LGMF187	FTP 25.6	LGMF231	ECLa 12.1
LGMF144	FTP 7.8	LGMF188	FTP 25.14	LGMF232	ECLa 12.2
LGMF145	FTP 7.13	LGMF189	FTP 25.16	LGMF233	ECLa 13
LGMF146	FTP 8.2	LGMF190	FTP 25.19	LGMF234	ECLa 14
LGMF147	FTP 10.2	LGMF191	FTP 25.24	LGMF235	ECLa 15
LGMF148	FTP 11.3	LGMF192	FTP 26.2	LGMF236	ECLa 16.1
LGMF149	FTP 11.5	LGMF193	FTP 27.1	LGMF237	ECLa 16.2
LGMF150	FTP 11.7	LGMF194	FTP 27.2	LGMF238	ECLa 18
LGMF151	FTP 11.8	LGMF195	FTP 27.3	LGMF239	ECLa 19
LGMF152	FTP 12.1	LGMF196	FTP 28	LGMF240	ECLa 20
LGMF153	FTP 12.4	LGMF197	FTP 29.2	LGMF241	ECLi 3
LGMF154	FTP 12.6	LGMF198	FTP 29.6	LGMF242	ECLi 5
LGMF155	FTP 13.1	LGMF199	FTP 30.2	LGMF243	ECLi 8
LGMF156	FTP 13.2	LGMF200	FTP 30.4	LGMF244	ECLi 9
LGMF157	FTP 14.1	LGMF201	FTP 31	LGMF245	ECLi 10
LGMF158	FTP 14.2	LGMF202	FTP 32.5	LGMF246	ECLi 11
LGMF159	FTP 14.3	LGMF203	FTP 32.6	LGMF247	ECLi 13
LGMF160	FTP 15.1	LGMF204	FTP 32.7	LGMF248	ECLi 14
LGMF161	FTP 15.2	LGMF205	FTP 33.1	LGMF249	ECLi 16
LGMF162	FTP 15.5	LGMF206	FTP 33.4	LGMF250	ECLi 17
LGMF163	FTP 16.2	LGMF207	FTP 33.5	LGMF251	ECLi 18
LGMF164	FTP 17.1	LGMF208	FTP 33.8	LGMF252	ECLi 19
LGMF165	FTP 17.3	LGMF209	FTP 33.14	LGMF253	ECLi 20
LGMF166	FTP 17.7	LGMF210	FTP 33.15	LGMF254	ECLi 21
LGMF167	FTP 18	LGMF211	FTP 33.16	LGMF255	ECLi 22
LGMF168	FTP 19.1	LGMF212	FTP 34	LGMF256	ECLi 22
LGMF169	FTP 19.6	LGMF213	ECLa 3.2	LGMF257	ECLi 22
LGMF170	FTP 20.3	LGMF214	ECLa 4.1	LGMF258	ECLi 25
LGMF171	FTP 20.4	LGMF215	ECLa 4.2	LGMF259	ECLiA 2
LGMF172	FTP 21.1	LGMF216	ECLa 5	LGMF260	ECLiA 1.2
LGMF173	FTP 21.8	LGMF217	ECLa 6	LGMF261	ECLiA 1.1
LGMF174	FTP 21.12	LGMF218	ECLa 7.1	LGMF262	ECLiA 3
LGMF175	FTP 21.16	LGMF219	ECLa 7.2	LGMF263	ECTMe 2.1
LGMF176	FTP 21.17	LGMF220	ECLa 7.3	LGMF264	ECTMe 3.3

ANEXO 2 - NOMENCLATURA DOS ISOLADOS DE *Guignardia* spp. E *Phyllosticta* sp. UTILIZADA EM PUBLICAÇÕES (Continuação)

Nomenclatura	Isolado	Nomenclatura	Isolado	Nomenclatura	Isolado
LGMF265	ECTMe 3.4	LGMF311	ECTP 21.2	LGMF355	EM 9.7
LGMF266	ECTMe 4.1	LGMF312	ECTP 22	LGMF356	EM 11.4
LGMF267	ECTMe 9.2	LGMF313	ECTP 23	LGMF358	EM 12.1
LGMF268	ECTMe 9.4	LGMF314	ECTP 23	LGMF357	EM 12.2
LGMF269	ECTMe 9.6	LGMF315	ECTP 24	LGMF359	EM 13.1
LGMF270	ECTMe 9.7	LGMF316	ECTP 25	LGMF360	EM 13.2
LGMF271	ECTMe 9.8	LGMF317	ECTP 26.1	LGMF361	EM 13.3
LGMF272	ECTMe 9.9	LGMF318	ECTP 26.3	LGMF362	EM 14.1
LGMF273	ECTMe 9.10	LGMF319	ECTP 26.4	LGMF363	EM 14.2
LGMF274	ECTMe 9.11	LGMF320	ECTP 26.5	LGMF364	EM 14.3
LGMF275	ECTMe 9.12	LGMF321	ECTP 26.8	LGMF365	EM 15.2
LGMF276	ECTMe 9.13	LGMF322	ECTP 26.9	LGMF366	EM 15.3
LGMF277	ECTMe 9.14	LGMF323	ECTP 26.10	LGMF367	EM 15.4
LGMF278	ECTP 1	LGMF324	ECTP 27.1	LGMF368	EM 15.5
LGMF279	ECTP 2	LGMF325	ECTP 27.2	LGMF369	EM 16.1
LGMF280	ECTP 3	LGMF326	ECTP 27.3	LGMF370	EM 16.5
LGMF281	ECTP 5	LGMF327	ECTP 27.4	LGMF371	EM 16.10
LGMF282	ECTP 6.3	LGMF328	ECTP 27.5	LGMF372	EM 17.2
LGMF283	ECTP 7	LGMF329	ECTP 27.7	LGMF373	EM 17.4
LGMF284	ECTP 8.1	LGMF330	EM 1.1	LGMF374	EM 17.6
LGMF285	ECTP 8.2	LGMF331	EM 1.2	LGMF375	EM 18.1
LGMF286	ECTP 8.5	LGMF332	EM 2	LGMF376	EM 18.2
LGMF287	ECTP 8.7	LGMF333	EM 3	LGMF377	EM 18.4
LGMF288	ECTP 9	LGMF334	EM 4.1	LGMF378	EM 18.5
LGMF291	ECTP 11.1	LGMF335	EM 4.2	LGMF379	EM 19
LGMF292	ECTP 11.3	LGMF336	EM 4.3	LGMF380	1
LGMF293	ECTP 11.4	LGMF337	EM 5	LGMF381	5
LGMF294	ECTP 12.3	LGMF338	EM 6	LGMF382	6
LGMF295	ECTP 12.4	LGMF339	EM 7.1	LGMF383	8
LGMF296	ECTP 13	LGMF340	EM 7.3	LGMF384	14
LGMF297	ECTP 14.3	LGMF341	EM 7.4	LGMF385	18
LGMF298	ECTP 15.1	LGMF342	EM 7.5	LGMF386	19
LGMF299	ECTP 15.2	LGMF343	EM 7.6	LGMF387	37
LGMF300	ECTP 15.4	LGMF344	EM 8.1	LGMF388	42
LGMF301	ECTP 15.6	LGMF345	EM 8.2	LGMF389	47
LGMF302	ECTP 15.7	LGMF346	EM 8.3	LGMF390	48
LGMF303	ECTP 16.1	LGMF347	EM 8.4	LGMF391	49
LGMF304	ECTP 16.2	LGMF348	EM 8.5	LGMF392	50
LGMF305	ECTP 16.3	LGMF349	EM 9.1	LGMF393	52
LGMF306	ECTP 17.1	LGMF350	EM 9.2	LGMF394	59
LGMF307	ECTP 17.2	LGMF351	EM 9.3	LGMF395	60
LGMF308	ECTP 18	LGMF352	EM 9.4	LGMF396	61
LGMF309	ECTP 19.3	LGMF353	EM 9.5	LGMF397	62
LGMF310	ECTP 21.1	LGMF354	EM 9.6	LGMF398	71



ANEXO 2 - NOMENCLATURA DOS ISOLADOS DE *Guignardia* spp. E *Phyllosticta* sp. UTILIZADA EM PUBLICAÇÕES (Conclusão)

Nomenclatura	Isolado	Nomenclatura	Isolado
LGMF399	72	LGMF426	IV-28
LGMF400	82	LGMF427	NC-2
LGMF401	83	LGMF428	NC-25
LGMF402	84	LGMF429	NC-30
LGMF403	87	LGMF430	NC-5
LGMF404	91	LGMF431	NC-8
LGMF405	94	LGMF432	EC1C
LGMF406	96	LGMF433	EC2C
LGMF407	99	LGMF434	PC3C
LGMF408	105	LGMF435	EC4C
LGMF409	111	LGMF436	EC5C
LGMF410	123	LGMF437	PC6C
LGMF411	126	LGMF438	PC7C
LGMF412	IE-4	LGMF439	PC8C
LGMF413	IE-15	LGMF440	PC9C
LGMF414	IE-19	LGMF441	PC10C
LGMF415	IE-24	LGMF442	EC11C
LGMF416	IE-25	LGMF443	PC12C
LGMF417	IE-32	LGMF444	EC13C
LGMF418	IE-8	LGMF445	EC14C
LGMF419	IP-22.2	LGMF446	PC15C
LGMF420	IP-23.2	LGMF447	EC16C
LGMF421	IP-18.1	LGMF448	EC17C
LGMF422	IP-5	LGMF449	PC18C
LGMF423	IV-26	LGMF450	EC19C
LGMF424	IV-10	LGMF451	EC20C
LGMF425	IV-27	LGMF452	EC21C