

VANESSA KAVA-CORDEIRO

Guignardia citricarpa, *G. mangiferae* E *Phyllosticta spinarum*:
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, SCARs E RNA DUPLA FITA.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração: Genética.

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo.
Co-orientadora: Profa. Dra. Chirlei Glienke de Blanco.

Curitiba
2004

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Kava-Cordeiro, Vanessa

Guignardia citricarpa, *G. mangiferae* e *Phyllosticta spinarum*: caracterização morfológica, SCARs e RNA dupla fita. – Curitiba, 2004.

xvii, 131f. : il. ; 30cm.

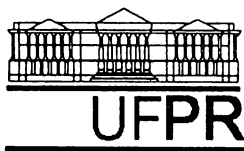
Orientador: João Lúcio de Azevedo

Co-orientadora: Chirlei Glienke de Blanco

Tese (doutorado) Universidade Federal do Paraná,
Setor de Ciências Biológicas.

1. Genética 2. RNA dupla fita 3. Guignardia 4.
Phyllosticta 5. Marcadores moleculares I. Título II. Azevedo,
João Lúcio III. Blanco, Chirlei Glienke de IV. Universidade
Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas.

CDD(20.ed.) 575



Ministério da Educação e Desporto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
Programa de Pós-Graduação em Genética

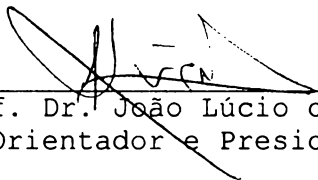
P A R E C E R

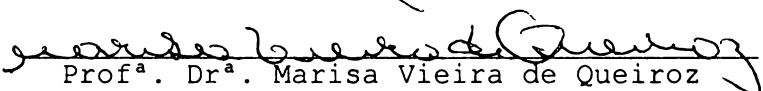
Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da defesa de tese de Doutorado, a que se submeteu **VANESSA KAVA-CORDEIRO**, para fins de adquirir o título de Doutora em Ciências Biológicas na área de Genética da Universidade Federal do Paraná, no Curso de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira à candidata o conceito **"A"**

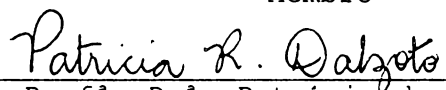
Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética
do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

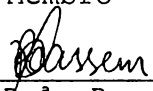
Curitiba, 12 de julho de 2004.

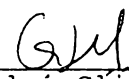
Banca Examinadora:

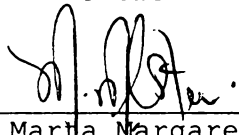

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo
Orientador e Presidente


Profª. Drª. Marisa Vieira de Queiroz
Membro


Profª. Drª. Patrícia do Rocio Dalzoto
Membro


Profª. Drª. Roseli Wassem
Membro


Profª. Drª. Chirlei Glienke de Blanco
Membro


Profª. Drª. Marta Margarete Cestari
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Genética

Visto:



“O jovem que quer ser cientista – e à ciência dedicar todo o seu tempo e amor – tem pelo menos três certezas: a de que morrerá um dia (como todo mundo), a de que não ficará rico (como quase todo mundo) e a de que se divertirá muito (como pouca gente)”.

Newton Freire-Maia

Aos meus filhos, JULIA e ANDRÉ,
com todo meu amor...
Ao CARLOS ANDRÉ,
meu grande amor...

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

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

Ao Professor Dr. João Lúcio de Azevedo, pela orientação, amizade e por seu exemplo como pesquisador e ser humano. O meu aprendizado durante este trabalho e também durante o meu mestrado, sob sua orientação, vai além do que é possível registrar com palavras em uma tese. Muito obrigada.

À Professora Dra. Chirlei Glienke de Blanco, pela co-orientação, pelas sugestões sempre proveitosas, pela sua amizade e por compartilhar comigo há muitos anos um ideal de crescimento do nosso LabGeM.

À Professora Dra. Roseli Wassem, pelas valiosas sugestões e pela amizade cada vez mais fortalecida com a nossa convivência.

À Professora Dra. Patrícia do Rocio Dalzoto, companheira de muitos momentos que edificaram uma amizade muito preciosa para mim.

À Professora Dra. Marisa Vieira de Queiroz pelos conselhos e sugestões, e, mais importante, por sua amizade de tantos anos.

À Professora Dra. Lygia Vitória Galli-Terasawa, por sua valiosa amizade e estímulo em todos os momentos.

À Professora Dra. Vânia Aparecida Vicente, do Departamento de Patologia Básica da UFPR, por suas sugestões e amizade.

À Professora Dra. Ida Chapaval Pimentel pelos conselhos sempre úteis e característicos de uma grande amiga.

À Professora Dra. Yvelise Maria Possiede, querida amiga e companheira em grandes momentos.

Ao Professor Elias Karam Jr. pela grande amizade e incentivo nos momentos importantes.

Ao Professor Dr. José Sebastião da Cunha Fernandes, coordenador do PPG-GEN da UFPR por ocasião do início deste trabalho, pelas sugestões como membro da comissão de avaliação deste trabalho, auxílio na parte estatística e amizade.

À Professora Dra. Margarete Cestari, coordenadora do PPG-GEN, UFPR, pela consideração e pela amizade.

Às queridas amigas Juliana Z. Ribeiro, Sônia Pillegi e Danyelle Stringari pela convivência sempre agradável no laboratório, pelo companheirismo e pela inestimável amizade.

Ao Professor MSc. Daniel de Christo, por bons momentos de convivência no LabGeM, amizade e algumas facilidades na parte técnica.

Aos estagiários do LabGeM, Maria Emília, Roberta, Grasi, Denny, Silvia e todos os estudantes pela ótima convivência.

À Caroline Lanzoni, pela revisão do “Abstract” e por bons momentos de convivência no fim deste trabalho.

À minha amiga Izolde Gaertner, pela amizade, ajuda técnica, e disponibilidade.

À Professora Dra. Eleidi Alice Chautard-Freire-Maia e ao Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza do Laboratório de Polimorfismos e Ligação da UFPR, pelo empréstimo de equipamentos, facilidades e grande amizade.

À Professora Dra. Maria Luiza Petzel-Erler, do Laboratório de Genética Molecular Humana e à doutoranda Karin Braun, por algumas facilidades concedidas durante este trabalho.

À Professora Dra. Maria da Graça Bicalho de Lacerda do Laboratório de Imunogenética da UFPR, e em especial, à Sônia e à Fernanda por permitirem a utilização de alguns equipamentos e sempre proporcionarem uma ótima convivência.

Ao Professor Juarez Gabardo, pelo auxílio com a parte estatística deste trabalho, pela sua amizade e pelo incentivo.

Aos Professores Dr. João Carlos Marques Magalhães, Dr. Ives José Sbalqueiro e Dr. Iglénir João Cavalli pela amizade, estímulo, confiança e por terem sido grandes exemplos quando foram meus professores.

Aos meus colegas Enilze, Erasto, Euclides, Lodércio, Marina, Mário, Nina, Remy, Rui e Valéria pela amizade e ótimos momentos de convivência.

Ao meu colega e amigo Arnaldo Meister Pimentel, pelos grandes momentos de convivência. Sentirei muita sua falta, com a volta às aulas...

À querida amiga Valéria Cristina Sallai Romeiro, secretária do Departamento de Genética, pela paciência e conselhos nos momentos de crise e também por compartilhar as alegrias dos bons momentos.

Ao amigo Jorge Cordeiro pela amizade, pela resolução sempre rápida de eventuais problemas e pela ótima convivência.

À Marli Américo, secretária do PPG-GEN, por sua disponibilidade na resolução de pendências ocasionais e amizade.

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

Ao grupo de Pesquisa de Fixação de Nitrogênio do Departamento de Bioquímica da UFPR, em especial ao Professor Dr. Emanuel de Souza pelas sugestões e muitas facilidades concedidas durante este trabalho.

À Professora Dra. Maria Benigna Martinelli de Oliveira e ao doutorando Humberto, do departamento de Bioquímica, pelo empréstimo e auxílio na utilização da ultracentrífuga.

Às bibliotecárias da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, especialmente à Telma, Marisa, Ruth e Isabela.

Às secretárias do Setor de Ciências Biológicas, em especial à Raquel e à Cláudia, pela simpatia e disponibilidade.

Ao Dr. Elliot Kitajima, do NEPA, ESALQ-USP, pelo auxílio com a microscopia eletrônica de transmissão.

Aos pesquisadores Carlos Vildoso Aguilar e Antônio de Góes pelo envio de linhagens de *Guignardia citricarpa*.

Aos meus queridos pais, Celso e Doroti, pelo amor, carinho e incentivo em todos os momentos.

Aos meus queridos Margit, Kanitar e Olga, pelo grande incentivo e por serem pessoas maravilhosas, com as quais eu tenho o privilégio de conviver.

Aos queridos Cintia, Gabriel, Rafaela e Celso Filho, pela importância imensurável que vocês tem para mim.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS E FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.....	4
3.2 O GÊNERO <i>Guignardia</i> Viala e Ravaz (anamorfo: <i>Phyllosticta</i> Pers. ex Desm.).....	9
3.3 MARCADORES MOLECULARES.....	13
3.3.1 RAPD.....	16
3.3.2 Diagnóstico molecular: SCARs e outros marcadores.....	20
3.4 RNA DUPLA FITA EM FUNGOS.....	21
3.5 BIBLIOTECA GENÔMICA.....	31
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 LINHAGENS UTILIZADAS.....	37
4.2 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS NOS MEIOS DE CULTURA	41
4.2.1 Meio Mínimo (MM) (PONTECORVO et al., 1953).....	41
4.2.2 Meio Completo (MC) (PONTECORVO et al., 1953, modificado por AZEVEDO; COSTA, 1973).....	41
4.2.3 Meio BDA.....	41
4.2.4 Meio V8 ("Campbell's Vegetable Juice").....	42
4.2.5 Meio LB.....	42
4.2.6 Meio LA.....	42
4.2.7 Meio TB / top agarose.....	42
4.2.8 Maltose 20% (Solução estoque).....	43
4.2.9 Solução de Vitaminas.....	43
4.3 SOLUÇÕES E TAMPÕES.....	43

4.3.1 Solução Salina.....	43
4.3.2 Solução de “Tween 80”.....	43
4.3.3 GET.....	44
4.3.4 Solução de Acetato de Potássio 3M (KOAc) pH 5,2.....	44
4.3.5 Tampão de Extração de DNA (RAEDER; BRODA, 1985).....	44
4.3.6 Clorofil.....	44
4.3.7 Clorofane.....	45
4.3.8 Tampão TE.....	45
4.3.9 Tampão TBE 5x (solução estoque).....	45
4.3.10 Solução de Brometo de Etídio.....	45
4.3.11 Tampão do fago.....	45
4.3.12 Tampão SM.....	46
4.3.13 Tampão de corrida (“gel loading buffer”).....	46
4.3.14 Solução EDTA 0,5M pH 8,0 (estoque).....	46
4.3.15 Solução Tris-HCl 1M pH 8,0 (estoque).....	46
4.3.16 RNase (USB).....	46
4.3.17 DNase (Gibco).....	47
4.3.18 Nuclease S1 (Gibco).....	47
4.3.19 Solução de Lise.....	47
4.4 PREPARO DE MATERIAL.....	48
4.4.1 Esterilização.....	48
4.4.2 Incubação.....	48
4.5 CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE ESPOROS EM DIFERENTES CONDIÇÕES E TESTES ESTATÍSTICOS.....	48
4.6 SEQUENCIAMENTO DOS MARCADORES DE RAPD.....	49
4.6.1 Transformação de <i>Escherichia coli</i>	49
4.6.2 Mini-Prep.....	50
4.6.3 Reação de sequenciamento.....	51
4.6.4 Purificação da reação de sequenciamento.....	51
4.6.5 Sequenciamento.....	52
4.6.6 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores.....	52

4.7 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS TOTAIS.....	53
4.7.1 Extração de DNA total (RAEDER; BRODA, 1985 modificado por GLIENKE, 1995).....	53
4.7.2 “Wizard® Genomic DNA Purification Kit” - Promega (modificado pela autora).....	54
4.8 RNA DUPLA FITA E PARTÍCULAS SEMELHANTES A VÍRUS.....	55
4.8.1 Identificação da presença de RNA dupla fita.....	55
4.8.2 Purificação parcial de partículas semelhantes a vírus (“VLPs - Virus-Like Particles”) (HOWITT et al., 1995).....	56
4.8.3 Microscopia eletrônica de transmissão – MET (HOWITT et al., 1995 com modificações).....	56
4.8.4 Ensaio de compatibilidade.....	57
4.9 SELEÇÃO DA LINHAGEM DE <i>G. citricarpa</i> PARA A BIBLIOTECA GENÔMICA.....	57
4.9.1 Caracterização por RAPD.....	57
4.9.2 Identificação por SCAR.....	58
4.10 BIBLIOTECA GENÔMICA DE <i>Guignardia citricarpa</i>	58
4.10.1 Extração de DNA total	58
4.10.2 Preparação dos insertos.....	59
4.10.3 Preparação do vetor.....	60
4.10.4 Empacotamento do fago.....	60
4.10.5 Preparação das células competentes e infecção com o bacteriófago LambdaGEM®-11.....	61
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
5.1 CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE ESPOROS.....	62
5.1.1 Crescimento radial.....	63
5.1.2 Esporulação.....	66
5.2 SEQÜENCIAMENTO E DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES.....	75
5.2.1 Fragmento 14E1 de <i>G. mangiferae</i>	76
5.2.2 Fragmento 14P3 de <i>G. citricarpa</i>	77

5.2.3 Fragmento 17P3 de <i>G. citricarpa</i>	78
5.3 RNA DUPLA FITA E PARTÍCULAS SEMELHANTES A VÍRUS.....	82
5.3.1 Identificação de RNA dupla fita.....	82
5.3.2 Partículas semelhantes a vírus (VLPs).....	89
5.3.3 Compatibilidade.....	90
5.4 BIBLIOTECA GENÔMICA.....	94
5.4.1 Seleção da linhagem de <i>G. citricarpa</i>	94
5.4.2 Construção da biblioteca genômica.....	96
6 CONCLUSÕES.....	98
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
APÊNDICES.....	117
ANEXO.....	130

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	FUNGOS FITOPATOGÊNICOS COM RNAdf.....	24
TABELA 2 –	HOSPEDEIRO, ANO E LOCAL DE ISOLAMENTO DAS LINHAGENS UTILIZADAS DE <i>Guignardia citricarpa</i>	38
TABELA 3 –	HOSPEDEIRO, ANO E LOCAL DE ISOLAMENTO DAS LINHAGENS UTILIZADAS DE <i>Guignardia mangiferae</i>	39
TABELA 4 –	HOSPEDEIRO, ANO E LOCAL DE ISOLAMENTO DAS LINHAGENS UTILIZADAS DE <i>Phyllosticta spinarum</i>	40
TABELA 5 –	MÉDIAS DOS CRESCIMENTOS RADIAIS (cm) DA LINHAGEM ECPR3 DE <i>P. spinarum</i> EM TODOS OS TRATAMENTOS.....	63
TABELA 6 –	MÉDIAS DOS CRESCIMENTOS RADIAIS (cm) DA LINHAGEM PC7LB8 DE <i>G. citricarpa</i> EM TODOS OS TRATAMENTOS.....	63
TABELA 7 –	MÉDIAS DA ESPORULAÇÃO ($\times 10^6$) DA LINHAGEM ECPR3 DE <i>P. spinarum</i> EM TODOS OS MEIOS.....	67
TABELA 8 –	MÉDIAS DA ESPORULAÇÃO ($\times 10^6$) DA LINHAGEM PC7LB8 DE <i>G. citricarpa</i> EM TODOS OS MEIOS.....	67
TABELA 9 –	LINHAGENS QUE APRESENTARAM RNAdf.....	83
TABELA 10 –	DADOS MORFOMÉTRICOS DE LINHAGENS DE <i>G.</i> <i>citricarpa</i> COM E SEM RNAdf	87

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	MORFOLOGIA DAS LINHAGENS PC7LB8 DE <i>G. citricarpa</i> E ECPR3 DE <i>P. spinarum</i> APÓS 14 DIAS DE CRESCIMENTO EM MC, V8 E BDA.....	62
FIGURA 2 -	MÉDIAS DOS CRESCIMENTOS RADIAIS DAS LINHAGENS ECPR3 DE <i>P. spinarum</i> E PC7LB8 DE <i>G. citricarpa</i> NOS DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, APÓS 14 DIAS.....	64
FIGURA 3 -	MÉDIAS DOS CRESCIMENTOS RADIAIS DAS LINHAGENS ECPR3 DE <i>P. spinarum</i> E PC7LB8 DE <i>G. citricarpa</i> NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE LUMINOSIDADE, APÓS 14 DIAS	65
FIGURA 4 -	COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO RADIAL DAS LINHAGENS ECPR3 DE <i>P. spinarum</i> E PC7LB8 DE <i>G. citricarpa</i> EM BDA, V8 E MC, APÓS 14 DIAS.....	65
FIGURA 5 -	MÉDIAS DAS TAXAS DE ESPORULAÇÃO DAS LINHAGENS ECPR3 DE <i>P. spinarum</i> E PC7LB8 DE <i>G. citricarpa</i> NOS DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, APÓS 14 DIAS.....	67
FIGURA 6 -	COMPARAÇÃO DA TAXA DE ESPORULAÇÃO DAS LINHAGENS ECPR3 DE <i>P. spinarum</i> E PC7LB8 DE <i>G. citricarpa</i> EM BDA, V8 E MC, APÓS 14 DIAS	68
FIGURA 7 -	MORFOLOGIA DE COLÔNIAS DE <i>Guignardia citricarpa</i> EM MC E BDA, APÓS 14 DIAS DE CRESCIMENTO.....	71
FIGURA 8 -	MORFOLOGIA DE COLÔNIAS DE <i>Guignardia mangiferae</i> EM MC E BDA, APÓS 14 DIAS DE CRESCIMENTO.....	72
FIGURA 9 -	MORFOLOGIA DE COLÔNIAS DE <i>Phyllosticta spinarum</i> EM MC E BDA, APÓS 14 DIAS DE CRESCIMENTO.....	73
FIGURA 10 -	ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS DE LINHAGENS DE <i>G. citricarpa</i> QUE APRESENTARAM BANDAS DE RNAdf.....	84

FIGURA 11 -	ÁCIDOS NUCLEÍCOS TOTAIS DE LINHAGENS DE <i>P. spinarum</i> e <i>G. mangiferae</i> QUE APRESENTARAM BANDAS DE RNAdf.....	84
FIGURA 12 -	ÁCIDOS NUCLEÍCOS TOTAIS DE <i>G. mangiferae</i> , <i>G. citricarpa</i> E DE <i>P. spinarum</i> TRATADOS COM RNase, DNase E NUCLEASE S1.....	86
FIGURA 13 -	PARTÍCULAS SEMELHANTES A VÍRUS DAS LINHAGENS ECPR8 DE <i>Phyllosticta spinarum</i> E PC IAC19/02 DE <i>Guignardia citricarpa</i>	90
FIGURA 14 -	COMPATIBILIDADE DE <i>P. spinarum</i> E <i>G. citricarpa</i> APÓS 14 DIAS DE CRESCIMENTO EM MC.....	92
FIGURA 15 -	PADRÃO DE BANDAS DE RAPD DE LINHAGENS DE <i>G. citricarpa</i> E <i>G. mangiferae</i>	95
FIGURA 16 -	AMPLIFICAÇÃO DE <i>G. citricarpa</i> , <i>G. mangiferae</i> E <i>P. spinarum</i> COM OS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES GCP1 E GCP2.....	95

RESUMO

***Guignardia citricarpa*, *G. mangiferae* E *Phyllosticta spinarum*: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, SCARS E RNA DUPLA FITA.**

Autora: Vanessa Kava-Cordeiro

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

O fungo *Guignardia citricarpa* vem sendo identificado como causador da Mancha Preta de Citros (MPC). Espécies relacionadas, como *G. mangiferae* e *Phyllosticta spinarum*, também vêm sendo isoladas de citros, geralmente de forma assintomática, não sendo associadas à doença. Este trabalho teve como objetivo principal contribuir para o conhecimento da biologia destas três espécies de fungos. Para a caracterização morfológica de dez linhagens de *G. citricarpa*, dez de *G. mangiferae* e cinco de *P. spinarum* foram utilizados dois meios de cultura: Meio Completo (MC) e Batata Dextrose Agar (BDA). Diferentes condições de cultivo foram utilizadas para otimizar a produção de micélio (crescimento radial) e de esporos em uma linhagem de *G. citricarpa* e em uma de *P. spinarum*. Foram utilizados MC, meio V8 e BDA, em duas condições de luminosidade: 12 ou 24 horas de luz. Foi observado que o MC proporcionou um crescimento radial 20% maior que o segundo melhor meio (V8) para as duas linhagens e que com fotoperíodo de 12 horas o crescimento radial foi 14% maior para *G. citricarpa* e 26% maior para *P. spinarum*. A melhor produção de esporos para a linhagem de *P. spinarum* foi obtida com o meio BDA (37% superior a do V8, o segundo melhor meio) e para a linhagem de *G. citricarpa* foi com o MC seguido com mínima diferença pelo BDA. Linhagens de *G. citricarpa*, *G. mangiferae* e *P. spinarum* foram investigadas com o objetivo de identificar RNA dupla fita e partículas semelhantes a vírus. Das 22 linhagens de *G. citricarpa* investigadas, nove apresentaram uma banda de RNAdf com o mesmo tamanho (3100pb). Uma linhagem desta espécie foi submetida à microscopia eletrônica de transmissão (MET) e partículas semelhantes a vírus de aproximadamente 40 nm foram identificadas. Estas linhagens devem estar infectadas com vírus da família Totiviridae. Dados morfométricos obtidos anteriormente e morfológicos foram utilizados para comparação de linhagens com

RNA_{df} e sem RNA_{df}. Quanto à morfologia, taxa de crescimento e tamanho de conídios e espermácios, não foram observadas diferenças entre os dois grupos, porém, a produção de conídios foi maior para o grupo com RNA_{df}. Das 22 linhagens de *G. mangiferae* analisadas, apenas uma apresentou duas bandas de RNA_{df} (2700pb e 1500pb). É provável que esta linhagem esteja infectada com um vírus da família Partitiviridae. Das cinco linhagens de *P. spinarum* investigadas, quatro linhagens apresentaram duas ou três bandas de RNA_{df} (1800pb a 1000pb). Uma linhagem desta espécie foi submetida à MET e partículas virais de aproximadamente 30 nm foram identificadas. Com base nestes resultados, sugere-se que estas linhagens estão infectadas com vírus das famílias Partitiviridae e/ou Chrysoviridae. Três marcadores moleculares obtidos anteriormente por RAPD, sendo um para *G. mangiferae* e os outros dois para *G. citricarpa*, foram seqüenciados. A partir das seqüências obtidas, oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados com a finalidade de converter estes marcadores em SCARs. Também foi feita uma seleção por meio de RAPD e PCR de uma linhagem de *G. citricarpa* para a construção de uma biblioteca genômica.

ABSTRACT

***Guignardia citricarpa*, *G. mangiferae* AND *Phyllosticta spinarum*: MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION, SCARS AND DOUBLE STRAND RNA**

Author: Vanessa Kava-Cordeiro

Adviser: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

The fungus *Guignardia citricarpa* has been identified as the pathogen of the Citrus Black Spot disease. Related species such as *G. mangiferae* and *Phyllosticta spinarum* have also been isolated from citrus, usually as a symptomless presence, thus not being associated with the disease. The main objective of this research was to contribute to the biological knowledge of these three species of fungi. A morphological characterization of ten strains of *G. citricarpa*, ten strains of *G. mangiferae* and five strains of *P. spinarum* was made using two growth media: Complete Medium (CM) and Potato Dextrose Agar (PDA). Different cultivation conditions, combining three growth media (CM, V8 and PDA) in two luminosity standards (12 or 24 hours of light), were used to optimize the production of mycelium and spores in a strain of *G. citricarpa* and in a strain of *P. spinarum*. It was observed that the CM medium provided for both strains a mycelium radial growth 20% higher than that of the second best medium (V8). The radial growth achieved with 12 hours of light was 14% higher for *G. citricarpa* and 26% higher for *P. spinarum*. The best production of spore for *P. spinarum* was obtained with PDA medium (37% higher than that of V8, the second best medium). For the strain of *G. citricarpa* the best result was found with CM closely followed by PDA. Strains of *G. citricarpa*, *G. mangiferae* and *P. spinarum* were investigated with the purpose of identifying double-stranded RNA and virus-like particles. Among the 22 strains of *G. citricarpa* analyzed, nine presented a unique dsRNA segment with the same size (3100bp). A strain of this species was submitted to transmission electronic microscopy (TEM) and virus-like particles of approximately 40 nm were identified. Based on these results, it was possible to suggest that these strains are infected with a Totiviridae family virus. Morphological and previously obtained morphometrical data were used to compare strains with dsRNA and without dsRNA. Differences in morphology,

growth rate and size of conidia and spermatia were not observed between these two groups, although, the production of conidia was higher in the dsRNA group. From the 22 analyzed strains of *G. mangiferae*, only one contained two bands of dsRNA (2700bp and 1500bp). This strain is probably infected with a virus from the Partitiviridae family. Among the five investigated strains of *P. spinarum*, four strains contained two or three bands of dsRNA (1800bp to 1000bp). A strain of this species was submitted to transmission electronic microscopy (TEM) and virus-like particles of approximately 30 nm were identified. Based on these results, it is suggested that these strains are infected with viruses of the Partitiviridae and/or Chrysoviridae families. Three earlier obtained RAPD markers, one of which was from *G. mangiferae* and the others being from *G. citricarpa*, were sequenced. From the resulting sequences, primers were designed to convert these markers in SCARs. A strain of *G. citricarpa* was also selected through RAPD and PCR data, with the purpose of building a genomic library.

1 INTRODUÇÃO

Fungos endofíticos são diferentes dos fungos fitopatogênicos, pois, embora encontrados no interior de plantas durante todo seu ciclo de vida ou em parte dele, aparentemente não causam danos ao hospedeiro. Considera-se que entre estes fungos e seus hospedeiros existe uma relação mutualística ou simbiótica neutra. Os fungos endofíticos podem ser identificados por exame microscópico do tecido vegetal, pois são geralmente intercelulares, ou podem ser isolados em meios de cultura.

Vários fungos já foram identificados como endofíticos em cerca de três décadas de pesquisas nesta área, incluindo numerosas espécies de ascomicetos e deuteromicetos, alguns basidiomicetos e também poucos representantes dos oomicetos. Alguns destes fungos são, aparentemente, bem adaptados ao modo de vida endofítico e podem ser rotineiramente isolados de vários hospedeiros diferentes. Outros são isolados apenas ocasionalmente e a sua ocorrência como endófitos parece ser secundária com relação a uma outra forma de existência, como o caso de alguns fungos saprófitas.

Dentre os fungos de isolamento freqüente, destaca-se o gênero *Phyllosticta*, que geralmente corresponde à forma imperfeita do ascomiceto *Guignardia*. A separação de espécies em *Phyllosticta* é baseada principalmente no hospedeiro do qual foi isolado e, em menor grau, em características morfológicas dos picnídios, conídios e micélio. Na taxonomia deste fungo, a importância da especificidade com o hospedeiro tem sido superestimada, pois, somente uma pequena fração de fitopatogênicos é realmente específica a um hospedeiro. Assim, existe uma dificuldade muito grande em se classificar isolados deste gênero. Fungos do gênero *Guignardia* vêm sendo associados a várias doenças vegetais, inclusive à Mancha Preta de Citros (MPC). Linhagens deste gênero também vêm sendo isoladas do interior de tecidos de várias espécies de citros sem a MPC, ou seja, em plantas assintomáticas, sendo então denominadas de endofíticas. Atualmente, com base principalmente em dados obtidos com o uso de marcadores moleculares (RAPD e seqüências ITS), tem se demonstrado que estas linhagens pertencem a diferentes espécies deste gênero. Por outro lado, várias outras espécies de fungos endofíticos já foram relacionadas taxonomicamente a patógenos virulentos do mesmo

hospedeiro. O isolamento de fungos endofíticos pertencentes a espécies historicamente patogênicas tem levado ao uso do termo “endofitismo” como sinônimo de latência, presumindo que alterações nas condições microambientais levariam ao surgimento de sintomas, sugerindo assim transições entre os estados endofítico e patogênico. Este pode ser o caso em alguns sistemas planta-microrganismos, mas com certeza não constitui uma regra.

Várias estratégias de biologia molecular vêm sendo empregadas com o objetivo de diferenciar linhagens de fungos fitopatogênicos de linhagens de fungos endofíticos, pertencentes à mesma espécie ou não. A partir de técnicas como RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”) e AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”) marcadores moleculares vêm sendo obtidos com o objetivo de identificar linhagens, espécies e também gêneros de vários fungos. Estes marcadores de diagnóstico são, em geral, seqüenciados e oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) são desenhados para amplificar exclusivamente estas seqüências. Desta forma, são criados SCARs (“Sequence Characterized Amplified Region”) que proporcionam um diagnóstico rápido e preciso para detectar a presença destes fungos.

A presença de RNAs dupla fita em fungos tem sido relacionada a diversas alterações fenotípicas nos seus hospedeiros. Em fungos fitopatogênicos, vários autores tem relacionado a existência destes elementos com virulência alterada, em geral, reduzida. A existência destas micoviroses nestes fungos também vem sendo relacionada com outras alterações morfológicas, como variações nas taxas de crescimento e reprodução destes fungos.

A construção de uma biblioteca genômica permite que toda a informação genética de um organismo seja estudada, contanto que todo o genoma do indivíduo esteja representado. Com a biblioteca genômica de um organismo, abrem-se inúmeras perspectivas de investigação, isolamento e seqüenciamento de genes e até de genomas completos. Recentemente o genoma do fungo *Neurospora crassa* foi completamente seqüenciado, contribuindo para o conhecimento desta espécie e, por comparação de seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos, com outras espécies de fungos filamentosos.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal contribuir para o conhecimento da biologia dos fungos *Guignardia citricarpa*, *G. mangiferae* e *Phyllosticta spinarum* e como objetivos específicos:

- Otimizar as condições para a produção de esporos e o crescimento radial nos fungos *G. citricarpa* e *P. spinarum*.
- Obter SCARs para o diagnóstico das espécies de *G. citricarpa* e *G. mangiferae* pelo seqüenciamento de marcadores moleculares obtidos anteriormente por RAPD.
- Investigar e caracterizar RNAdf e partículas virais em linhagens de *G. citricarpa*, *G. mangiferae* e *P. spinarum* e averiguar a influência destes elementos em características morfológicas de *G. citricarpa*.
- Selecionar uma linhagem de *G. citricarpa* para a construção de uma biblioteca genômica.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS E FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Microrganismos capazes de colonizar tecidos internos de um vegetal foram denominados de endofíticos pela primeira vez por De Bary em 1866 (STONE, 1988). CARROLL (1988) restringiu o uso do termo endofítico para organismos que causam colonizações assintomáticas, excluindo deste conceito fungos patogênicos e fungos mutualísticos tais como os fungos micorrízicos. PETRINI (1991) propôs que a definição de Carroll fosse expandida para incluir todos os organismos que fossem capazes de colonizar os tecidos internos dos vegetais, sem causar um dano aparente.

A presença dos endofíticos pode ser demonstrada tanto por exame microscópico do tecido vegetal como também por isolamento em meios de cultivo. Para o isolamento é necessário que o tecido tenha sua superfície esterilizada e então fragmentos deste tecido são colocados em meio de cultura e incubados (MOORE-LANDECKER, 1996). REISSINGER, VILICH e SIKORA (2001) testaram algumas técnicas de esterilização de superfície com plantas axênicas, livres de microrganismos, que tinham sido propositadamente infectadas com duas espécies de *Chaetomium*. Os autores concluíram que algumas técnicas de esterilização de superfície podem prejudicar a detecção de fungos endofíticos que estão dentro da epiderme da planta.

PETRINI (1986) encontrou fungos endofíticos em todas as espécies vegetais estudadas e concluiu que todas as plantas vivas podem, potencialmente, ser hospedeiras destes fungos.

Embora as interações entre vegetais e endofíticos na maioria dos casos ainda seja uma incógnita, em alguns casos foram encontradas interações que levam a um melhor desempenho das plantas (CLAY, 1987). LATCH e CHRISTENSEN (1985) relataram um maior número de ramificações do caule e um aumento da área foliar em gramíneas, infectadas artificialmente com endofíticos. Também já foram observados casos de plantas com maior tolerância ao ataque de insetos (CARROLL; CARROLL, 1978; CLAY, 1987; CLEMENTE et al., 1990; CARROLL 1988),

resistência a doenças e parasitas (WHITE Jr.; COLE, 1985; WHITE Jr.; COLE, 1986; CLARK; MILLER; WHITNEY, 1989; CALHOUN et al., 1992), resistência a nemátodos (WILSON; CLEMENTE; KAISER, 1991) e antiherbivoria pela produção de toxinas (WHITE JR.; COLE, 1985).

Recentemente, RUDGERS, KOSLOW e CLAY (2004) comprovaram que mesmo fungos endofíticos que aparentemente mantinham uma relação simbiótica neutra com seus hospedeiros, na verdade contribuíam significativamente com a dinâmica populacional do seu ecossistema.

Alguns trabalhos de melhoramento genético em fungos endofíticos já foram descritos ou pelo menos tiveram seu potencial considerado. MURRAY, LATCH e SCOTT (1992) transformaram o fungo endofítico *Acremonium*, isolado de *Lolium perenne*, e após reintrodução do fungo na planta, verificaram a expressão do gene de interesse. Alguns autores também relataram o potencial que fungos endofíticos apresentam para incompatibilizar o desenvolvimento de patógenos (WHITE JR.; COLE, 1985; CLARK; MILLER; WHITNEY, 1989; CALHOUN et al., 1992, ARNOLD et al., 2003).

A indução de resistência em plantas refere-se às alterações que ocorrem na planta, após esta ter entrado em contato com um patógeno em potencial. Essas mudanças dependem do reconhecimento entre o patógeno e o hospedeiro e podem ocorrer de forma localizada ou sistêmica. A indução de resistência em plantas é uma resposta comum também à presença de microrganismos não patogênicos e se torna mais efetiva quando da inoculação de plantas com isolados não-patogênicos ou hipovirulentos, antes da inoculação do patógeno ou concomitante a ela. Uma vez que a resistência foi induzida, a planta expressa diferentes respostas de defesa (CASSIOLATO; SOUZA, 2000).

Um modelo de controle biológico de um fungo fitopatogênico que ataca uma grande variedade de plantas é o que vem sendo feito com *Rhizoctonia solani* por isolados de *Rhizoctonia* spp não-patogênicos ou hipovirulentos. Neste caso, os possíveis modos de ação para a indução de resistência seriam a competição por sítios de infecção ou por indução de fitoalexinas. Um dos problemas para este tipo de controle biológico ocorre quando isolados não-patogênicos ou hipovirulentos do fungo crescem relativamente mais devagar que as linhagens virulentas. Este fato tem sido verificado em *Rhizoctonia* spp e uma das formas utilizadas para contornar

este problema tem sido a utilização de sementes já colonizadas pela linhagem não-patogênica ou hipovirulenta enquanto a linhagem patogênica encontra-se naturalmente no solo (CASSIOLATO; SOUZA, 2000).

Outros autores também sugerem a utilização de endofíticos como micoherbicidas no controle de ervas daninhas (CERKAUSKAS, 1988; CLAY, 1989).

A possibilidade de exploração de fungos endofíticos como produtores de metabólitos para diversos fins foi aventada por alguns pesquisadores e comprovada em certos casos. FISHER, ANSON e PETRINI (1984) detectaram atividade antibiótica em 10 dos 24 isolados de fungos endofíticos obtidos de cinco espécies de Ericaceae. Os fungos produziram os metabólitos quando cultivados em culturas líquidas em agitação. Entre os 10 isolados, cinco apresentaram atividades antifúngicas e antibacterianas ao mesmo tempo. FISHER, ANSON e PETRINI (1986) ensaiaram 25 isolados dos hospedeiros *Ulex europeus* e *U. gallii* e encontraram atividade antibiótica em quatro destes isolados. Os isolados de *Coniothyrium* spp apresentaram atividade antibiótica contra uma ampla faixa de bactérias.

Um exemplo de aplicação biotecnológica de um fungo endofítico é o que ocorre com o *Taxomyces andreanae*. Este fungo é isolado de *Taxus brevifolia*, árvore de crescimento lento e de grande importância para a produção de taxol, um promissor agente no tratamento de tumores de mama e ovário. Com uma produtividade bastante baixa pela planta, a descoberta da produção de taxol também pelo fungo abriu novas perspectivas de obtenção desta droga, para uso em tratamentos de tumores (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993).

Além de fungos, bactérias também são encontradas com frequência colonizando tecidos vegetais saudáveis. GILLIS et al. (1989) demonstraram a ocorrência de bactérias endofíticas em cana-de-açúcar, e que estas, por serem fixadoras de nitrogênio, trazem benefícios para a planta. FAHEY (1988) apresentou o primeiro relato de aproveitamento de um organismo endofítico geneticamente modificado com a bactéria *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*, isolada do xilema de uma planta não cultivada. Esta bactéria foi transformada com o gene da endotoxina delta de *Bacillus thuringiensis* e introduzida em plantas de milho, para o controle da broca do colmo. ARAÚJO et al. (2001) descreveram várias espécies de bactérias e fungos endofíticos isolados de citros relacionando a frequência destes isolados e, por meio

de dados obtidos *in vitro*, apresentaram modos de interação destas bactérias com o fungo *Guignardia citricarpa*.

A utilização de plantas transgênicas tem gerado debates no mundo inteiro a respeito dos riscos destas para o meio ambiente e também para o ser humano. Porém, até recentemente, parecia não haver nenhuma preocupação com os microrganismos presentes nestas plantas. AZEVEDO e ARAÚJO (2003) em extensa revisão sobre o tema demonstram que parece ocorrer pouca ou nenhuma consequência para os microrganismos endofíticos o fato de estarem presentes em uma planta transgênica. Neste mesmo trabalho, os autores apresentam dados que mostram pequenas alterações na população de endófitos de *Citrus sinensis* previamente inoculado com uma bactéria geneticamente modificada.

Os modelos de interação fungo endofítico e planta certamente ainda não são totalmente conhecidos, mas vários fatores envolvidos na colonização da planta devem ser comuns com linhagens fitopatogênicas. O sucesso da penetração na planta hospedeira pela maioria dos fungos, patogênicos ou não, 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 a ação mecânica do apressório (HOWARD; FERRARI, 1989; BOURETT; HOWARD, 1990). O tratamento de conídios com inibidores de síntese de melanina como Triciclazol e Piroquilon, resulta na produção de apressórios não pigmentados e não funcionais, acarretando a incapacidade do fungo penetrar na planta (WOLOSHUK; SISLER, 1982; BELL; WHEELER, 1986; DEAN, 1997).

Diferentes estratégias estão sendo utilizadas para identificar a rota de infecção de fungos fitopatogênicos. MAOR et al. (1998) desenvolveram um protocolo de transformação para o fungo *Cochliobolus heterostrophus*, patogênico de milho, utilizando como marcador o gene GFP ("Green Fluorescent Protein"). Os autores utilizaram uma linhagem de *C. heterostrophus* transformada para infectar uma planta sadia e acompanhar o desenvolvimento da infecção. SOLOMON, TAN e OLIVER (2003) em recente revisão sobre o tema, ressaltaram que o sucesso nas etapas de infecção e colonização por fungos fitopatogênicos depende das habilidades do fungo

em utilizar as fontes de nutrientes disponíveis na planta, penetrar nesta planta e também evitar os mecanismos de defesa da planta. Estes autores propuseram um modelo com três estágios, relacionando a fase da infecção e os nutrientes mais consumidos pelo fungo em cada fase. O primeiro e o segundo estágios são bem definidos e compreendem as fases de penetração e colonização do hospedeiro, respectivamente. O terceiro estágio, que corresponde à produção de esporos, é sugerido neste trabalho, pois o consumo de nutrientes ocorre de uma forma diferenciada dos estágios anteriores. Estudos com alguns fungos, mutantes para determinadas vias metabólicas, mostraram que estes fungos devem apresentar diferentes estratégias de infecção e colonização, já que mantiveram seu potencial patogênico. Outros mutantes, porém, perderam a sua patogenicidade. Os autores concluíram que apesar do modelo proposto, talvez este não seja representativo e cada caso deve ser analisado separadamente.

A patogenicidade de um fungo é controlada por diversos genes, sendo que alguns deles podem exercer uma função principal sem a qual o fungo é incapaz de reconhecer, penetrar ou colonizar o hospedeiro. Estes genes são denominados de genes de patogenicidade. Outros genes, por sua vez, são capazes de desencadear um processo de resistência no hospedeiro o que pode resultar em linhagens avirulentas, mesmo com genes de patogenicidade presentes nestas linhagens. Estes genes, denominados genes de avirulência, têm na interação planta-patógeno efeitos específicos a um determinado cultivar. O modelo básico de compatibilidade prediz que uma interação gene a gene desenvolve-se como uma resposta à pressão seletiva no hospedeiro após a compatibilidade básica ser atingida pelo patógeno, via produção de fatores de patogenicidade (DE WIT, 1992). A pressão de seleção resulta na evolução de resistência hipersensitiva raça-específica, que é ativada pelo produto de um gene de avirulência do fungo (o elicitor raça-específico), após interação com um receptor que seria o provável produto de um gene de resistência na planta (DE WIT, 1997).

Vários genes de avirulência já foram identificados em diversos sistemas, como: tomate e *Cladosporium fulvum*, no qual um gene, o *avr-9*, foi clonado (DE WIT et al., 1993); arroz e *Magnaporthe grisea* no qual já foram descritos quatro genes de avirulência (VALENT; CHUMLEY, 1991) e em alface e *Bremia lactucae*, em que treze genes *avr* foram identificados (JUDELSON; MICHELMORE, 1989).

Vários pesquisadores têm se dedicado ao estudo de correlações entre variações na patogenicidade, marcadores moleculares e compatibilidade vegetativa de isolados de espécies fúngicas. WRIGHT et al. (1996) encontraram uma alta correlação entre agrupamentos obtidos com dados de patogenicidade, compatibilidade vegetativa e marcadores RAPD em *Fusarium oxysporum*. Até então, a classificação de *F. oxysporum* em *formae speciales* e raças era feita de acordo com o hospedeiro e o cultivar, respectivamente. Este modelo de classificação ainda é adotado para a maioria dos fungos fitopatogênicos.

Recentemente, BLANCO (1999) identificou um marcador molecular do tipo RAPD exclusivo de linhagens patogênicas de citros do fungo *Guignardia citricarpa*. A banda foi recuperada do gel, clonada e sequenciada. Esta seqüência aparentemente não é codificadora e, a partir dela, foi desenhado um par de oligonucleotídeos iniciadores para amplificar esta seqüência por PCR. Desta forma, linhagens de *Guignardia citricarpa* podem ser identificadas e também com a utilização destes oligonucleotídeos iniciadores, existe a possibilidade de um diagnóstico rápido de plantas infectadas com linhagens patogênicas deste fungo, mesmo antes do aparecimento das lesões que caracterizam a doença. Outra consideração importante da autora a respeito da diferenciação de linhagens endofíticas (não patogênicas) e linhagens patogênicas de *Guignardia* spp é baseada em agrupamentos obtidos a partir de dados gerados por RAPD. O fato de linhagens endofíticas isoladas de citros agruparem juntamente com linhagens patogênicas de goiabeira (*G. psidii*) levou à sugestão de que estes endofíticos não são patógenos latentes do hospedeiro de onde foram isolados e sim patógenos de outras espécies vegetais, incapazes de causar doenças no hospedeiro de onde foram isolados.

3.2 O GÊNERO *Guignardia* Viala e Ravaz (anamorfo: *Phyllosticta* Pers. ex Desm.)

O gênero *Guignardia*, descrito em 1892 por Viala e Ravaz, compreende as formas teleomórfas de espécies de *Phyllosticta* e de alguns outros gêneros relacionados de fungos imperfeitos geralmente saprófitas ou semiparasitas de folhas (SIVANESAN, 1984).

Diversos autores isolaram espécies de *Phyllosticta* de plantas aparentemente saudáveis, descrevendo-as como endofíticas (CARROLL; CARROLL, 1978; PETRINI, 1986; LEUCHTMANN et al., 1992; GLIENKE, 1995; PENNA, 2000). No entanto existe um grande número de relatos citando este gênero como fitopatogênico de diversas culturas com grande importância econômica como arroz (SUGHA; SINGH; SHARMA, 1986), cana-de-açúcar (PONS, 1990), tabaco (PATEL; PATEL; TILVA, 1988) e eucalipto (CROUS et al., 1993) e também frutíferas como abacate e tomate (BAKER, 1938), manga e mamão (McMILLAN JR., 1986), uva (IBRAHIM; BAYCA, 1989), e principalmente em citros (McONIE, 1964a, 1964b; HERBERT; GRECH, 1985; JOHNSTON; FULLERTON, 1988).

A separação de espécies em *Phyllosticta* é baseada principalmente no hospedeiro de onde é isolado e, menor importância é dada a características como sintomatologia e estruturas morfológicas (picnídio, conídio e micélio) (VAN DER AA, 1973). Com o avanço das técnicas de biologia molecular, vem sendo possível traçar um perfil mais preciso na caracterização destas espécies e várias classificações estão sendo revistas.

OKANE, NAKAGIRI e ITO (2001) isolaram fungos do gênero *Guignardia* (anamorfo: *Phyllosticta*) de folhas saudáveis de plantas da família Ericaceae. Morfologicamente, o anamorfo *Phyllosticta*, apresentou-se muito semelhante à espécie *P. capitalensis* P. Henn., conhecido como patogênico de orquídeas. Dados de seqüenciamento de regiões ITS1 e ITS2 ("internal transcribed spacer regions of ribosomal DNA"), incluindo 5,8S rDNA, demonstraram a identidade dos isolados com *P. capitalensis*. Com estes resultados, os autores descreveram o endofítico ascomiceto como a nova espécie *Guignardia endophyllicola* cujo anamorfo correspondente é *Phyllosticta capitalensis*. Previamente descrito apenas como patógeno de orquídeas, este fungo foi comprovadamente identificado como endofítico de plantas da família Ericaceae. Também PANDEY, REDDY e SURYANARAYANAN (2003) caracterizaram linhagens de *Phyllosticta* isoladas de folhas de árvores tropicais por meio de análise de ITS-RFLP e seqüenciamento de regiões ITS e identificaram estes isolados como *P. capitalensis*. Desta forma, comprovam que este fungo, apesar de inicialmente descrito como patógeno de orquídeas, pode ser encontrado como endofítico de várias espécies vegetais.

O fungo *Guignardia citricarpa* Kiely (anamorfo: *Phyllosticta citricarpa* (McAlp.) Van Der Aa) é um Ascomiceto da ordem Dothideales, família Dothideaceae. Possui estroma plectenquimatoso, pseudotécio globoso a subgloboso medindo 125 a 360 µm de diâmetro contendo um poro de 14 a 16 µm e paredes espessas com 20 a 22 µm. Seu asco apresenta forma de clava, arredondado na extremidade superior e é bitunicado. Contém oito ascósporos unicelulares, hialinos, ligeiramente cinzentos, rombóides, contendo grânulos e um grande vacúolo central. Os ascósporos são cobertos com um quepe gelatinoso nas extremidades, medindo 8-17 x 3,3-8 µm. Segundo SIVANESAM (1984) pseudoparáfises são encontradas em pseudotécios maduros. De acordo com JOHNSTON e FULLERTON (1988), as formas anamorfa e teleomorfa 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 µm de diâmetro, com parede marrom escura e células pseudoparenquimatosas. O micélio escuro é submerso, formando uma crosta plectenquimatosa. As células conidiogênicas são cilíndricas, com cerca de 4 a 8 µm por 2 a 3,5 µm. O conídio é unicelular, ovóide, elíptico ou subgloboso, algumas vezes clavado quando jovem. Possui uma base truncada contendo gútulas e um apêndice apical de 5 a 15 µm de comprimento característico de espécies de *Phyllosticta*, que é facilmente perdido. Também apresenta uma membrana gelatinosa recobrimdo os conídios, que serve de proteção contra o ressecamento durante a dispersão (PUNITHALINGAM, 1982).

O estado de microconídio descrito por VAN DER AA (1973) ocorre tanto em cultura *in vitro* como no hospedeiro e freqüentemente se desenvolve simultaneamente com a fase imperfeita do fungo. Possui corpos de frutificação semelhantes àqueles da 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.

Em recente trabalho, BAAYEN et al. (2002) compararam dezenas de linhagens patogênicas e endofíticas de *Guignardia* spp e *G. citricarpa* isoladas de diferentes espécies vegetais de diversas regiões da Ásia, África, Austrália e América. Foram utilizados dados morfológicos e também moleculares (seqüências ITS e AFLP). Os dados morfológicos obtidos estão de acordo com os descritos por McONIE (1964a) onde linhagens patogênicas apresentam crescimento lento em comparação com linhagens endofíticas, que apresentam crescimento mais rápido e fácil produção de peritécio e ascósporos em meio de cultura. Com os dados moleculares foi possível agrupar os isolados estudados em quatro grupos. Os grupos I e II foram os mais numerosos, sendo que no grupo I ficaram os isolados (38 no total) de lesão de citros (mancha preta), com crescimento mais lento e que foram então, identificados como *G. citricarpa*. No grupo II (43 isolados), os dados moleculares apontaram para uma grande identidade destes isolados com o fungo *G. mangiferae*, sendo que estes isolados eram provenientes de citros e também de outras plantas assintomáticas ou com sintomas bem discretos (pequenas manchas). Com base nestes dados, estes isolados foram classificados como *Guignardia mangiferae*. Os grupos III e IV apresentaram apenas um isolado cada e os dados moleculares apontaram para as espécies *Phyllosticta telopeae* e *P. spinarum*, respectivamente. Estes resultados têm uma grande importância econômica, pois a União Européia apresenta leis fitossanitárias específicas para fungos fitopatogênicos de citros. A classificação de linhagens endofíticas mesmo que isoladas de citros como pertencentes a uma espécie não patogênica a citros, é uma informação bastante relevante para exportações de citros, já que estes fungos não seriam enquadrados como fitopatogênicos de citros.

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

Em recente trabalho, RODRIGUES et al. (2004) caracterizaram linhagens de *Guignardia mangiferae* por meio de dados morfológicos, ISSR-PCR (“Inter Single Sequence Repeat Anchored Polymerase Chain Reaction”) e seqüências ITS1-5,8S-ITS2 e traçam um comparativo destes dados com o local de isolamento como também com o hospedeiro de onde as 18 linhagens estudadas foram isoladas. Estes autores não puderam associar a variabilidade encontrada, principalmente com dados morfológicos e de ISSR-PCR, com hospedeiros e localização geográfica. Algumas linhagens de *Guignardia* e *Phyllosticta* isoladas de hospedeiros não relacionados eram mais semelhantes que outras linhagens isoladas de hospedeiros extremamente relacionados. Estes resultados reforçam a necessidade da utilização de outros dados, além do hospedeiro, para definir a nomenclatura destes fungos.

3.3 MARCADORES MOLECULARES

A biologia molecular fornece ferramentas para evidenciar e entender melhor diversos aspectos relacionados direta ou indiretamente com o material genético de qualquer organismo.

Para o estudo de fungos, as técnicas de biologia molecular mais utilizadas são: eletroforese de isoenzimas, RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”), RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”), análise do DNA mitocondrial, análise do DNA ribossômico, eletroforese em campo pulsado, e ainda análise do polimorfismo do DNA telomérico.

Por meio da análise de isoenzimas é possível detectar alelos de genes que originam proteínas como as esterases, amilases, álcool desidrogenases, entre outras. As bandas diferentes refletem combinações diferentes de aminoácidos nas proteínas. Muito utilizada nos estudos de genética de populações, as isoenzimas constituem uma importante fonte de marcadores genéticos que permitem a análise de vários locos simultaneamente, a identificação de heterozigotos, detecção da variabilidade em um nível próximo do DNA, identificação de culturas fúngicas e determinação da variabilidade natural de populações (ALFENAS et al., 1991). Apesar de sua relativa simplicidade e eficiência, algumas isoenzimas têm sua produção alterada em virtude de componentes de meios de cultura utilizados para

microrganismos (St LEGER et al., 1992), limitando as análises e conseqüentemente, as interpretações dos resultados.

No início dos anos 70, descobriu-se que o princípio da eletroforese, utilizado com proteínas, poderia ser usado também para moléculas de DNA, já que estas possuem carga elétrica negativa e, em um gel, migram do pólo negativo em direção ao pólo positivo (ALBERTS et al., 2004). A utilização de marcadores de DNA surgiu então, como ferramenta para a análise direta do DNA, não sofrendo influência do ambiente, nem estando sujeita a variações do estágio de desenvolvimento do organismo em questão (PUTERKA et al., 1993).

Com a descoberta de que sítios para enzimas de restrição poderiam estar presentes nos organismos em diferentes locais e número, desenvolveu-se a técnica de RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism"). Com esta técnica, verificou-se que alterações em um único par de bases são muito comuns nos genomas de diversos organismos e estas alterações são, muitas vezes, neutras alterando somente o sítio de restrição para endonucleases. Com a alta freqüência destes polimorfismos, foi possível que um grande número de marcadores fosse introduzido nos estudos de variabilidade genética (ALBERTS et al., 2004). As principais aplicações do RFLP são: o estudo da organização e evolução do genoma fúngico; identificação de genes específicos; estudos de genética de populações; taxonomia e obtenção de mapas genéticos (MICHELMORE e HULBERT, 1987). Contudo, apesar de sua utilidade, são necessárias grandes quantidades de DNA e este deve ser de boa qualidade, e, além das enzimas de restrição, também são utilizadas sondas marcadas, radioativamente ou não, o que limita seu uso. Uma associação desta técnica com a técnica de PCR, a PCR-RFLP, vem sendo utilizada para a caracterização de diversos organismos, inclusive fungos. Como o DNA no qual serão investigados os sítios de restrição é produto de PCR e os polimorfismos são detectados diretamente em eletroforeses, as desvantagens citadas acima são quase que totalmente superadas. COHEN et al. (2003) usou esta técnica para identificar o fungo fitopatogênico *Phytophthora citrophthora*, isolado de citros.

O DNA mitocondrial também pode ser utilizado na análise da variabilidade genética como marcador molecular, pois apresenta algumas características favoráveis como tamanho reduzido, grande número de cópias por célula, ausência de metilação das bases nitrogenadas, purificação fácil e riqueza em RFLP ao nível

intraespecífico, o que o torna ideal em estudos taxonômicos (BRUNS, WHITE e TAYLOR, 1991; HEGEDUS e KHACHATOURIANS, 1993).

O DNA ribossômico, na maioria dos eucariontes apresenta-se como arranjo repetitivo aleatório, dos três genes principais que codificam para os diferentes tipos de rRNA e tem sido utilizado no estudo filogenético de fungos (BRUNS; WHITE; TAYLOR, 1991). As seqüências codificantes do rDNA evoluem lentamente e são altamente conservadas, possibilitando a sua utilização em estudos com organismos pouco relacionados taxonomicamente. Porém, as regiões espaçadoras internas destes genes, conhecidas como ITS (“Internal Transcribed Spacer”), evoluem rapidamente, apresentando alto grau de polimorfismo, sendo então, muito útil em estudos filogenéticos em níveis taxonômicos mais baixos, como gêneros e espécies. Na identificação de fungos fitopatogênicos, estas seqüências 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; SURYANARAYANAN, 2003; RODRIGUES et al., 2004; STRINGARI, 2004).

A impressão digital (“*fingerprinting*”) do DNA telomérico também pode ser usada para confirmar o número de cromossomos em fungos, já que são usadas sondas que contêm a seqüência do DNA telomérico de *Botrytis cinerea*, a qual é bastante conservada e tem sido usada para vários fungos filamentosos (VIAUD et al., 1996). Também utilizando esta técnica, AIMI et al. (2002) identificaram as regiões teloméricas de *Rosellinia necatrix* utilizando a sonda pTel46, isolada de *Coprinus cinereus*, e localizaram RFLPs nestas regiões que serviram para a caracterização de linhagens deste fungo.

Entre todas as técnicas desenvolvidas para a análise de DNA e RNA, nenhuma teve o impacto da PCR (“Polymerase Chain Reaction”) ou reação em cadeia da polimerase, técnica de um procedimento conceitualmente simples que vem sendo extensivamente utilizada. A PCR baseia-se na amplificação de um segmento de DNA flanqueado por dois oligonucleotídeos iniciadores. Estes oligonucleotídeos iniciadores apresentam a extremidade 3'-OH livre, que hibridam com as regiões flanqueadoras da seqüência alvo, permitindo o início da amplificação do segmento pela enzima DNA polimerase. Este tipo de reação utiliza uma DNA polimerase especial, termoestável, que resiste à alta temperatura, necessária para a desnaturação do DNA dupla fita. Ciclos repetidos de desnaturação, hibridação dos

oligonucleotídeos iniciadores e síntese enzimática resultam numa amplificação exponencial do DNA alvo. Desenvolvida na década de 80 por Kary Mullis, a PCR tornou possível a produção de múltiplas cópias de seqüências específicas de DNA, sem a necessidade de clonar estas seqüências (ALBERTS et al., 2004).

Entre as grandes vantagens da técnica de PCR, destaca-se a pequena quantidade de DNA necessária para a reação e também a facilidade de não ser necessário isolar a seqüência que será amplificada. Dentre as desvantagens, existe a necessidade de conhecer a seqüência que flanqueia o segmento a ser amplificado e também os cuidados que devem ser tomados para evitar uma contaminação com DNA exógeno (ALBERTS et al., 2004). Vários métodos de caracterização de gêneros, espécies, variedades e até mesmo linhagens específicas de fungos vêm utilizando a técnica de PCR.

3.3.1 RAPD

Tomando os princípios da PCR, dois grupos desenvolveram praticamente ao mesmo tempo a técnica de RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA") ou polimorfismo do DNA amplificado ao acaso. WILLIAMS et al. (1990) e WELSH e McLELLAND (1990) passaram a utilizar apenas um oligonucleotídeo iniciador de seqüência arbitrária que amplifica regiões específicas de cada genoma. A amplificação ocorre quando coincidir desta mesma seqüência oligonucleotídica reconhecer um sítio de complementariedade em uma das fitas e também o mesmo sítio, porém com orientação invertida, na outra fita da molécula de DNA, dentro do intervalo limite da PCR. Da mesma forma que em uma PCR, para o RAPD também se utiliza uma DNA polimerase termoestável, geralmente a Taq DNA polimerase (WILLIAMS et al., 1990). Os oligonucleotídios dispostos nas extremidades da seqüência a ser amplificada fornecem a extremidade 3' livre para a atuação da Taq DNA polimerase. A reação é aquecida a 90-95°C, para desnaturação do DNA molde, sofre um resfriamento entre 36-42°C para permitir o anelamento dos oligonucleotídios iniciadores aos sítios apropriados no DNA molde; e um novo aquecimento a 70-75°C para que a Taq DNA polimerase sintetize novas fitas de DNA, completando-se assim o primeiro ciclo de amplificação. Nos ciclos seguintes,

os oligonucleotídios iniciadores irão se ligar nas fitas originais de DNA e também nas sintetizadas nos ciclos anteriores.

Os produtos da amplificação são separados por eletroforese em gel de agarose e cada banda do DNA amplificado é o resultado da interação entre o oligonucleotídio iniciador e o DNA molde (WILLIAMS et al., 1990). Os polimorfismos são reconhecidos pela presença de um fragmento amplificado em um dos genótipos em relação à ausência deste mesmo fragmento em outro genótipo. Alterações na sequência de bases nas regiões complementares aos oligonucleotídios eliminam um sítio de ligação do oligonucleotídio. Inserções de sequências entre os sítios de ligação dos oligonucleotídios podem deixar o segmento molde maior que o limite da PCR, de forma que a amplificação não ocorra. Ambas mutações são reconhecidas pela ausência da banda no gel. Inserções entre os sítios de ligação dos oligonucleotídios iniciadores que não ultrapassem o limite da PCR farão com que a amplificação ocorra, porém a banda decorrente da amplificação desta região terá um peso molecular maior. Por outro lado, deleções entre os sítios de ligação dos oligonucleotídios iniciadores farão com que a amplificação ocorra, produzindo uma banda de peso molecular menor. Da mesma forma, estas alterações serão reconhecidas como ausência ou presença de bandas.

Segundo WILLIAMS et al. (1993) o comprimento ideal do oligonucleotídio iniciador para amplificação em RAPD é em torno de dez bases, devendo seu conteúdo GC ser de 50 a 70%, sendo no mínimo de 40%. Além disso, eles não devem conter sequências palindrômicas, a fim de evitar o autopareamento. Estes autores também ressaltam que as concentrações de oligonucleotídio, magnésio e DNA podem alterar tanto o número de bandas amplificadas, bem como sua intensidade.

Com os resultados obtidos por RAPD, é possível obter impressões digitais ("fingerprintings") moleculares de indivíduos, variedades e populações; análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais e também estabelecer relações filogenéticas entre indivíduos, entre espécies e também entre outros níveis taxonômicos. Marcadores obtidos por RAPD também podem ser utilizados para evidenciar mecanismos de recombinação em fungos filamentosos (DALZOTO et al., 2003).

Para o gênero *Colletotrichum*, o uso de marcadores RAPD tem sido útil na identificação de diferentes raças de *C. graminicola* causadores da antracnose do sorgo (GUTHRIE et al., 1992), e na diferenciação de isolados de *C. truncatum* causador da antracnose em soja (VASCONCELOS, 1994).

Por meio da técnica de RAPD, também foi possível a caracterização de linhagens patogênicas do fungo *Leptosphaeria maculans*, isoladas de crucíferas (GOODWIN; ANNIS, 1991), e de *Brassica napus* (SCHÄFER; WÖSTEMEYER, 1992).

MANULIS et al. (1993), utilizaram com sucesso, 30 oligonucleotídios iniciadores arbitrários para distinguir linhagens patogênicas e não patogênicas de isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*, obtidos de cravo. Vinte e um isolados de *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* foram separados em dois grupos distintos por CROWHURST et al. (1991), utilizando 14 oligonucleotídios iniciadores. Ainda em *Fusarium*, GRAJAL-MARTIN, SIMON e MUEHLBAUER (1993) utilizaram marcadores de RAPD para caracterização da raça 2 de *F. oxysporum* f.sp. *pisi*. PAMPHILE e AZEVEDO (2002) utilizaram marcadores de RAPD para caracterizar linhagens endofíticas de *Fusarium verticillioides*, isoladas de duas estirpes diferentes de milho e também de plantas híbridas descendentes das estirpes. Pelo padrão de bandas obtido, os autores sugerem um processo de co-evolução entre estas linhagens de *F. verticillioides*.

LIU et al. (1995) encontraram padrões de RAPD úteis para uma rápida identificação dos endofíticos *Acremonium lolii* e *A. coenophialum*. LIEW e IRWIN (1994) utilizando 13 oligonucleotídios iniciadores detectaram alta divergência genética (80%) comparando isolados de *Phytophthora megasperma*, obtidos a partir de grão de bico, oriundos da Austrália e da Espanha. Entretanto a separação em dois grupos por meio de 339 bandas de RAPD, não foi observada quando marcadores morfológicos foram utilizados, pois tais marcadores não detectaram variação entre os isolados, sugerindo que estes são menos sensíveis. CAPELARI e FUNGARO (2003) usaram dados obtidos por RAPD para a determinação de espécies biológicas no fungo *Pleurotus*. Estes autores concluíram que apesar de dados de caracterização morfológica e distribuição geográfica terem sido utilizados para diferenciar as espécies *P. cystidiosus* e *P. smithii*, estas certamente pertencem a uma mesma espécie.

MEIJER, MEGNEGNEAU e LINDERS (1994) encontraram alto coeficiente de similaridade (>80%) entre 47 isolados de *Phomopsis subordinaria* provenientes de oito localidades diferentes. Quando 69 isolados procedentes de 23 locais diferentes foram analisados por isoenzimas, nenhuma diferença foi detectada, sendo todos idênticos. NICHOLSON e REZANOOR (1994) detectaram variação entre isolados de *Pseudocercospora herpotrichoides* utilizando 10 oligonucleotídios iniciadores (*primers*), enquanto HOLMES, ECKERT e PITT (1994) observaram apenas 10% de similaridade entre espécies patogênicas de *Penicillium* em citros. Quando estes autores compararam por meio de seis oligonucleotídios iniciadores isolados de mesma espécie, verificaram altos coeficientes de similaridade, variando de 84,4 a 100%.

HULBERT et al. (1988) e JUDELSON e MICHELMORE (1989) utilizaram o RAPD no estudo de linhagens patogênicas e não patogênicas do fungo *Bremia lactucae*, e identificaram marcadores associados a genes de avirulência neste fitopatógeno. MIAZZI, HAJJEH e FARETRA (2003) utilizaram marcadores de RAPD para a análise de 374 isolados de *Uncinula necator*, um importante fitopatógeno de uva, de uma mesma região, porém isolados em épocas diferentes. Estes autores concluíram que linhagens que foram isoladas na mesma época possuíam maior similaridade, sugerindo então biótipos deste fungo co-existindo no mesmo ambiente.

Por meio de dados obtidos a partir de RAPD, GLIENKE-BLANCO et al. (2002) encontraram alta variabilidade genética entre linhagens de *G. citricarpa* isoladas de citros. Também CHRISTO (2002) comparando o padrão obtido por RAPD de 59 isolados de *Guignardia* spp e *Phyllosticta* sp sugere distinção de espécies entre linhagens endofíticas e patogênicas, como também relaciona linhagens isoladas de diferentes espécies de hospedeiros. PENNA (2000) estudou a variabilidade genética de 24 linhagens de *Phyllosticta* spp, isoladas de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) por RAPD que resultou em três agrupamentos distintos, coincidentes com o agrupamento realizado pela análise de características morfológicas. Por meio de análise de RAPD e também de seqüenciamento de regiões ITS1 e ITS2, 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), como também confirma a identificação de outras linhagens endofíticas de citros como pertencentes à espécie *Phyllosticta spinarum*.

3.3.2 Diagnóstico molecular: SCARs e outros marcadores

O uso de marcadores moleculares com a finalidade específica de identificação de espécies, variedades ou mesmo de uma única linhagem de qualquer fungo vem sendo amplamente utilizado. Para a identificação de fungos fitopatogênicos esta forma de diagnóstico tem se mostrado muito valiosa.

Marcadores moleculares do tipo SCAR (“Sequence Characterized Amplified Region”) vêm sendo obtidos principalmente a partir de bandas de RAPD e também de AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”).

SOUBABÈRE et al. (2001) desenvolveram 16 marcadores do tipo SCAR obtidos por RAPD com o objetivo de monitorar a recombinação e também a migração em populações de *Magnaporthe grisea*, um importante patógeno de arroz. Também com o objetivo de estudar a dinâmica populacional do fungo *Cryphonectria cubensis*, patógeno de eucalipto, VAN DER MERWE, WINGFIELD e WINGFIELD (2003) utilizaram 10 marcadores de sequência caracterizada, obtidos a partir de ISSR-PCR.

Com o objetivo de discriminar o fungo *Aspergillus ochraceus*, SCHMIDT et al. (2003), isolaram bandas de 70 linhagens isoladas principalmente de café no Brasil, a partir de AFLP. Estas bandas foram re-amplificadas, clonadas e seqüenciadas. Baseados nas seqüências, os autores construíram um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores capazes de amplificar exclusivamente estas seqüências. Estes oligonucleotídeos iniciadores foram testados com sucesso contra um painel de várias espécies de *Aspergillus* e foi confirmada a especificidade para *A. ochraceus*. Desta forma, com a utilização destes SCARs, foi desenvolvido um método simples e rápido de identificação deste fungo.

Técnicas de diagnóstico molecular também vêm sendo amplamente utilizadas para a identificação de fungos relacionados com controle biológico. No controle biológico de insetos, a eficácia do fungo também depende de sua capacidade de persistir nas plantações onde foi inoculado. Com o objetivo de caracterizar e identificar uma linhagem comercial de *Beauveria bassiana* utilizada em controle biológico, CASTRILLO, VANDENBERG e WRAIGHT (2003) desenvolveram três marcadores do tipo SCAR a partir de RAPD e testaram estes marcadores contra vários isolados de *B. bassiana*, outras espécies de *Beauveria* e também contra o

fungo *Metarhizium anisopliae*. Com sucesso, os autores puderam diferenciar esta linhagem comercial e também identificá-la no ambiente após sua utilização. Também utilizado no controle biológico de ervas daninhas, o fungo *Colletotrichum coccodes* (linhagem 183088) foi identificado no solo por meio de SCARs obtidos por RAPD (DAUCH; WATSON; JABAJI-HARE, 2003). Após utilizar a técnica de RAPD para traçar o perfil de 16 linhagens de cinco espécies de *Trichoderma*, HERMOSA et al. (2001) selecionaram bandas exclusivas da linhagem 11 de *T. atroviride*, fungo utilizado no controle biológico de outros fungos, e converteram uma destas bandas em um SCAR, capaz de diferenciá-la das outras linhagens.

Para a identificação de *Biscogniauxia mediterranea*, um fungo endofítico de árvores, que em condições de estresse ambiental pode se tornar patogênico, oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados a partir de seqüências ITS. Com a utilização destes SCARs, os autores foram capazes de identificar este fungo na sua fase latente no próprio hospedeiro (MAZZAGLIA et al., 2001).

Recentemente, BONANTS et al. (2003) desenvolveram dois pares de oligonucleotídeos iniciadores a partir de seqüências ITS obtidas anteriormente (BAAYEN et al., 2002), capazes de discriminar os fungos *Guignardia citricarpa* e *G. mangiferae* e também, identificar a presença do fitopatógeno *G. citricarpa* em 60 a 70% de lesões de mancha preta em citros sem picnídio e em 90% das lesões com picnídio. Este método é melhor e mais rápido que o método tradicional de identificação destas espécies que leva em torno de cinco dias e é eficaz no diagnóstico deste fungo em apenas 40 a 50% das lesões em citros.

3.4 RNA DUPLA FITA EM FUNGOS

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

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

Em recente revisão, MERTENS (2004) relatou cinco famílias de vírus de RNA_{df} que vem sendo identificadas infectando fungos. São elas:

- Hypoviridae: genoma de um segmento, com vesículas de 50 a 80 nm que não possuem capsídeo protéico;
 - Totiviridae: genoma de um segmento e com capsídeo icosaédrico de 30 a 40 nm de diâmetro;
 - Chrysoviridae: genoma com quatro segmentos, com capsídeo protéico icosaédrico de 30 a 40 nm de diâmetro;
- (estas três famílias são exclusivas de fungos)
- Partitiviridae: genoma com dois segmentos, com capsídeo protéico icosaédrico com 30 a 40 nm de diâmetro (hospedeiros de vírus desta família podem ser fungos e plantas);
 - Reoviridae: genoma com 10, 11 ou 12 segmentos, empacotados em capsídeos protéicos icosaédricos de 70 a 90 nm de diâmetro. Esta é a família mais numerosa de vírus de RNA_{df}, sendo que os hospedeiros destes vírus podem pertencer a diferentes táxons, como: fungos, plantas, artrópodos, peixes, répteis, pássaros e mamíferos. Recentemente foi descrito o que deve ser o primeiro caso de um vírus desta família infectando um fungo. OSAKI et al. (2002) relataram a existência de um vírus com 12 bandas, encontrado em uma linhagem hipovirulenta do fungo fitopatogênico *Rosellinia necatrix*.

Os micovírus são regularmente transmitidos através do contato citoplasmático pela fusão de hifas. Partículas virais também podem ser transmitidas para os esporos durante o desenvolvimento do fungo, mas, aparentemente não podem infectar através da parede celular intacta (TIAGO, 2001). Segundo BUCK (1986), os micovírus não têm habilidade de lisar as células do hospedeiro, sendo que o único mecanismo natural de transmissão é o citoplasmático, refletindo em uma gama limitada de hospedeiros, já que fungos filamentosos possuem um sistema de auto-reconhecimento geneticamente regulado que impede a fusão de hifas entre linhagens incompatíveis. Este sistema de incompatibilidade vegetativa, de acordo

com McCABE, PFEIFFER e VAN ALFEN (1999), limita a transmissão dos micovírus através da reprodução sexual em populações fúngicas.

A identificação destas bandas extras, correspondentes à RNA` dupla fita, é relativamente simples. Deve ser utilizado um protocolo de extração de ácidos nucléicos e posterior visualização destes ácidos nucléicos em gel de agarose. A confirmação da natureza das bandas extras, quando encontradas, geralmente é feita com tratamentos com DNase e RNase. Alguns fungos como o *Uncinula necator*, fitopatogênico e biotrófico obrigatório, exigem adaptações no protocolo convencional conforme descrito por DÉLYE e CORIO-COSTET (1998).

Pesquisas indicam que essas partículas virais estão presentes em, aproximadamente, 30% de todas as espécies de fungos (BUCK, 1986). A Tabela 1 mostra de forma resumida exemplos de fungos fitopatogênicos nos quais foram encontrados RNAdf.

A presença de RNA dupla fita foi detectada por VARGA, KEVEI e VÁGVÖLGYI (1994) em 7% dos isolados da natureza e em 25,49% (13 em 51) dos isolados da coleção *nigri* do gênero *Aspergillus*. Também VARGA et al. (1998), detectaram 5,6% de linhagens infectadas em um total de 178 isolados do mesmo gênero.

Em todos os casos, um polimorfismo natural de RNAdf em fungos tem sido verificado. Em geral, 1 a 8 bandas tem sido detectadas com peso molecular variando de 0,5 a 15kb. GILLINGS, TESORIERO e GUNN (1993) apontam para a importância desse polimorfismo como um conveniente marcador para distinguir entre isolados dentro de uma espécie.

Em extenso estudo com o fungo fitopatogênico *Discula destructiva*, RONG et al. (2001) relataram a existência de RNAdf em quase 80% das 108 linhagens investigadas deste fungo. Estas linhagens foram isoladas de locais bastante distantes geograficamente e as diferenças encontradas nos padrões de bandas sugerem que a diversidade genética do RNAdf de *D. destructiva* é gerada rapidamente e que este fungo pode ser infectado simultaneamente por múltiplas viroses.

TABELA 1 – FUNGOS FITOPATOGÊNICOS COM RNAdf

FUNGO	Nº. DE ISOLADOS COM RNAdf (%)	REFERÊNCIA
<i>Botrytis cinerea</i>	143 em 200 (71,5%)	HOWITT et al., 1995
<i>Chalara elegans</i>	3 (100%)	PUNJA, 1994
<i>Cochliobolus victoriae</i>	Não citado	GHABRIAL, 1994
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	14 (100%)	DALE; MANNERS; IRWIN, 1988
<i>Cryphonectria parasitica</i>	7 em 13 (53,85%)	CELIKER; ONOGUR, 1998
<i>Diaporthe ambigua</i>	1 em 2 (50,00%)	PREISIG et al., 2000
<i>Endothia (=Cryphonectria) parasítica</i>	13 em 28 (46,43%)	DAY et al., 1977
<i>Epichloe festucae</i>	1 em 4 (25,00%)	ZABALGOGEAZCOA et al., 1998
<i>Flammulina velutipes</i>	1 (100%)	MAGAE; HAYASHI, 1999
<i>Fusarium graminearum</i>	13 em 286 (4,54%)	CHU et al., 2002
<i>Fusarium poae</i>	Não citado	COMPEL et al., 1999
<i>Fusarium solani</i>	1 (100%)	NOGAWA et al., 1996
<i>Gaeumannomyces graminis</i>	Não citado	NUSS; KOLTIN, 1990
<i>Leucostoma</i> sp (<i>L. personii</i> e <i>L. cincta</i>)	2 em 24 (8,33%)	HAMMAR; FULBRIGHT; ADAMS, 1989
<i>Monosporascus cannonballus</i>	60,00%	BATTEN et al., 2000
<i>Nectria radiculicola</i>	24 em 81 (29,63%)	AHN; LEE, 2001
<i>Ophiostoma (=Ceratocystis) Ulmi</i>	5 em 8 (62,50%)	ROGERS; BUCK; BRASIER, 1986
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Não citado 83,30% - México	PFEIFFER et al., 2001
<i>Phytophthora infestans</i>	20,00% - Holanda 2,90% - Peru	NEWHOUSE et al., 1992
<i>Pyricularia oryzae</i>	20 em 29 (68,96%)	HUNST; LATERELL; ROSSI, 1986
<i>Pythium irregulare</i>	33 em 39 (84,61%)	GILLINGS; TESORIERO; GÜNN, 1993
<i>Rhizoctonia solani</i> AG (anastomosis group) 3	100%	ROBINSON; DEACON, 2002
<i>Rhizopus</i> sp	5 em 27 (18,52%)	PAPP et al., 2001
<i>Sclerotinia minor</i>	11 em 30 (36,67%)	MELZER; BOLAND, 1996
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	1 em 5 (20,00%)	BOLAND, 1992
<i>Sphaeropsis sapinea</i>	4 em 31 (12,90%)	STEENKAMP et al., 1998

FONTE: RIBEIRO, 2002

Geralmente RNAs dupla fita são latentes ou crípticos mas, em alguns casos, fenótipos particulares são observados em fungos que contém esses micovírus (CASTRO et al., 1999). A presença de certos elementos de RNAdf está fortemente correlacionada com alterações na patogenicidade, principalmente hipovirulência (BOLAND, 1992). Todavia, infecções por RNAdf podem, também, alterar a morfologia da colônia e reduzir a taxa de crescimento e esporulação de seus hospedeiros (ELLISTON, 1982).

DAY et al. (1977) verificaram que entre as 13 linhagens com RNAdf do fungo fitopatogênico, *Endothia parasitica*, 9 eram tão patogênicas quanto as linhagens que não possuíam RNAdf, mas as outras exibiram várias anormalidades morfológicas e mostraram-se menos patogênicas. Também em *Endothia parasitica*, segundo ELLISTON (1982) a presença de certos RNAs dupla fita resultaram em redução da virulência. FULBRIGHT (1984) utilizou ciclohexamida para obter linhagens deste mesmo fungo livres de RNAdf e essa cura foi acompanhada por um aumento drástico na virulência e por uma recuperação da morfologia normal da colônia.

BOLAND (1992) também cita uma possível associação entre RNAdf e hipovirulência no fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, já que isolados virulentos não apresentaram esses elementos e a transmissão de RNAdf ocorreu associada com o fenótipo de hipovirulência para as linhagens virulentas. Em outro estudo com *S. sclerotiorum*, ZHOU e BOLAND (1999) verificaram que linhagens hipovirulentas (com RNAdf) produziam menor quantidade de massa micelial do que linhagens virulentas (livres de RNAdf) em meio de batata líquido (PDB). Também as linhagens hipovirulentas apresentaram uma menor produção e/ou um atraso na produção de ácido oxálico em comparação com linhagens virulentas, especialmente durante os primeiros dias de cultura (3 a 7 dias). Já para a espécie *Sclerotinia minor*, MELZER e BOLAND (1996) verificaram que a presença de RNAdf não necessariamente induz a hipovirulência, uma vez que alguns isolados virulentos também apresentaram esses elementos. Entretanto, todos os isolados hipovirulentos continham RNAdf.

Comparando linhagens de *Chalara elegans* que continham RNAdf quanto ao crescimento, patogenicidade e sobrevivência no solo, PUNJA (1994) verificou que a presença de múltiplos elementos de RNAdf no fungo estava associada com um aumento na esporulação, alteração da morfologia da colônia e redução no crescimento e na patogenicidade. Resultados semelhantes foram obtidos por

HOWITT et al. (1995) em *Botrytis cinerea*. Estes autores compararam várias linhagens contendo RNAdf com linhagens livres destes elementos e encontraram uma diferença na taxa de crescimento e virulência, sendo menores para o grupo contendo RNAdf. CASTRO et al. (1999) observaram neste mesmo fungo que células infectadas com vírus apresentaram um importante grau de degeneração celular em seu citoplasma, inclusive com o desaparecimento de organelas.

A maioria dos isolados do fungo fitopatogênico *Monosporascus cannonballus* que continha RNAdf, após repetidas transferências em meio de cultura em laboratório, desenvolveu fenótipos degenerativos e mostrou redução na virulência (BATTEN et al., 2000).

CHU et al. (2002) observaram a presença de RNAdf em linhagens de *Fusarium graminearum* e então analisaram com mais detalhes uma destas linhagens, verificando mudanças morfológicas como redução do crescimento, aumento da pigmentação, redução da virulência para trigo e decréscimo na produção de toxinas. Além disso, o RNAdf foi transmitido para uma linhagem livre deste elemento por fusão de hifas e a linhagem receptora adquiriu o vírus associado ao fenótipo da linhagem doadora.

Através da fusão de protoplastos, PFEIFFER et al. (2001) transferiram RNAdf para uma linhagem de *Phaffia rhodozyma* não portadora, e os efeitos desses elementos no valor adaptativo do hospedeiro foram testados por seguidas reproduções sexuais e assexuais. Os resultados não mostraram efeito na taxa de crescimento durante a fase lag e log da reprodução vegetativa, mas o número máximo de células na fase estacionária foi significativamente diferente. No entanto, na reprodução sexual, os resultados foram inconclusivos.

Já em *Sphaeropsis sapinea*, STEENKAMP et al. (1998) identificaram quatro linhagens contendo RNAdf das quais duas apresentaram um crescimento mais lento e outras duas um crescimento mais regular. Estas linhagens foram testadas quanto à virulência, e esta apresentou-se menor nas duas linhagens com crescimento mais lento. Desta forma, a redução da virulência em *S. sapinea* apresentou-se positivamente correlacionada com crescimento mais lento *in vitro*, sugerindo que a presença de RNAdf pode não estar relacionada a estas características.

ZABALGOGEAZCOA et al. (1998), analisando *Epichloe festucae*, não observaram diferenças com relação à virulência entre linhagens infectadas e não

infectadas por RNA dupla fita. PAPP et al. (2001) analisando isolados do gênero *Rhizopus* não observaram diferença fenotípica entre isolados com e sem RNAdf. Após fracionamento dos componentes celulares, estes autores relataram a identificação das bandas de RNAdf no extrato de mitocôndrias, exclusivamente. Porém, estes autores indicam a necessidade de uma investigação mais precisa para concluir sobre a localização intracelular destas partículas virais.

Resultados diferentes foram encontrados por AHN e LEE (2001) que identificaram em *Nectria radicularis* RNA dupla fita de quatro tamanhos distintos (6,0, 5,0, 2,5 e 1,5 kb). Em testes de cura, verificaram que o RNA dupla fita de 6,0 kb está associado com altos níveis de virulência e esporulação, sugerindo que este RNAdf é um regulador positivo da virulência neste fungo.

Satélites de certos RNA dupla fita são responsáveis pelo “sistema matador”, que fazem com que seu hospedeiro, como ocorre em *Saccharomyces cerevisiae* (WICKNER, 1992) e *Ustilago maydis* (SHELBOURN; DAY; BUCK, 1988), secretem toxinas. As linhagens matadoras contêm segmentos de RNA dupla fita encapsulados que são responsáveis por informações requeridas para replicação e para a estrutura viral, e também por codificar polipeptídeos tóxicos e provavelmente por um papel na imunidade do fungo para a toxina que ele produz.

Em fungos entomopatogênicos, LEAL et al. (1994) realizaram bioensaios utilizando o fungo *Metarhizium anisopliae* contra o afídio *Myzus persicae* e não detectaram diferenças de virulência entre a linhagem com RNAdf e a linhagem isogênica (sem o RNAdf), ao contrário do que é descrito para a maioria dos fitopatógenos. Também TIAGO (2001) analisou a correlação entre a presença de RNA dupla fita e produção de proteases degradadoras de cutícula, secreção de proteína total e produção de conídios em linhagens isogênicas de *Metarhizium anisopliae* variedade *acridum* (= *Metarhizium flavoviride*) e *Paecilomyces fumosoroseus*. Neste trabalho, não foi encontrada correlação entre os parâmetros analisados com a presença ou ausência de RNA dupla fita, sugerindo que a infecção deve ser latente nesses fungos. Em bioensaio com o inseto *Euchistus heros*, linhagens com e sem RNA dupla fita de *M. anisopliae* apresentaram desempenho semelhante na mortalidade deste inseto (RIBEIRO, 2002). Na espécie *M. flavoviride*, MARTINS et al. (1999) verificaram que linhagens com RNAdf não foram associadas com hipovirulência em teste contra o gafanhoto *Ramatocerus schistocercoides*.

Resultados diferentes foram obtidos por FRAZZON et al. (2000). Estes autores analisaram a produção de proteases e quitinases em linhagens de *Metarhizium anisopliae* com e sem RNA dupla fita e verificaram que as linhagens com RNAdf secretavam estas enzimas em menor quantidade. GIMÉNEZ-PECCI et al. (2002) também observaram que as linhagens de *M. anisopliae* com RNA dupla fita secretavam endoquitinases em menor quantidade que as linhagens sem RNA dupla fita. SANTI et al. (2000) também verificou que as mesmas linhagens com RNA dupla fita investigadas por GIMÉNEZ-PECCI et al. (2002) também foram, em regra geral, menos infectivas contra o carrapato *Boophilus microplus*. Resultados semelhantes foram obtidos por DALZOTO (2004) com o entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Em bioensaio com o percevejo marrom da soja, *Euchistus heros*, uma linhagem com RNAdf foi menos virulenta que a mesma linhagem curada deste vírus, evidenciando o caráter de hipovirulência deste vírus neste fungo.

BIDOCHKA et al. (2000) analisaram vários isolados de *M. anisopliae* que apresentaram RNA dupla fita de tamanhos similares, após separação eletroforética. Os autores observaram por meio da análise de “Northern blot” que os RNAdf nem sempre eram homólogos. Os isolados também foram caracterizados por RAPD e compatibilidade vegetativa e observou-se que os RNAdf homólogos ocorreram preferencialmente em linhagens geneticamente relacionadas. BOGO et al. (1996) relataram a presença de RNA dupla fita e partículas virais em várias linhagens de *M. anisopliae*. Mais recentemente, GIMÉNEZ-PECCI et al. (2002) caracterizaram o RNA dupla fita das linhagens infectadas identificadas por BOGO et al. (1996) e sugeriram que os vírus das linhagens AI e M5, MaV – AI e MaV – M5 respectivamente, são pertencentes à família *Totiviridae* e o vírus da linhagem RJ, o MaV – RJ, pertence à família *Partitiviridae*. Ainda neste mesmo trabalho, os autores evidenciam alterações fenotípicas decorrentes da perda espontânea de alguns fragmentos de RNA dupla fita de alto peso molecular da linhagem RJ de *M. anisopliae*.

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

Com relação à organização do genoma desses RNAs dupla fita, NOGAWA et al. (1996) verificaram atividade RNA polimerase dependente de RNA (“RDRP –

RNA-dependent RNA polymerase”) no micovírus FUSO-V de *Fusarium solani*. COMPEL et al. (1999) purificaram o micovírus – FUPO-1 – da linhagem A-11 de *Fusarium poae* e identificaram dois segmentos, um codificando para uma provável RDRP e o outro codificando para uma provável proteína de capsídeo (“coat protein”). A organização do genoma e certas seqüências de FUPO-1 mostraram similaridade ao vírus 2H de *Atkinsonella hypoxylon* e ao micovírus FUSO-V de *Fusarium solani*, membros da família Partitiviridae. Apesar de não ter sido possível estabelecer uma correlação entre compatibilidade vegetativa e RNA dupla fita, estes autores observaram por meio de hibridizações que em linhagens de *Fusarium poae* com compatibilidade vegetativa, RNAs dupla fita de tamanhos similares sempre eram geneticamente relacionados (muito similares ou homólogos) porém em linhagens que apresentavam incompatibilidade vegetativa, os RNAs dupla fita de tamanhos similares eram homólogos ou não.

PREISIG, WINGFIELD e WINGFIELD (1998) seqüenciaram o RNA dupla fita presente em partículas virais de 35 nm de diâmetro de linhagens do fungo filamentoso *Sphaeropsis sapinea*, encontrando dois fragmentos de 5163pb e 5202pb identicamente organizados, possuindo duas ORFs (“Open Reading Frames”) sobrepostas, sendo que a ORF1 codifica para uma proteína de capsídeo e a ORF2 para uma RDRP. STRAUSS, LAKSHMAN e TAVANTZIS (2000) caracterizaram o genoma bisegmentado de RNAdf da linhagem Rh5 717 de *Rhizoctonia solani* e encontraram um segmento maior, de 2.363 bases (RNAdf1), seguido por um segmento menor, de 2.206 bases (RNAdf2). Análises do potencial de codificação mostraram que RNAdf1 pode codificar um polipeptídeo de 730 aminoácidos com massa molecular de 86 kDa, o qual tem significativa homologia com uma provável RDRP das partitiviroses de *Fusarium poae* e *Atkinsonella hypoxylon*. O RNAdf2 pode codificar um polipeptídeo de 683aa com massa molecular de 76 kDa, o qual mostra homologia com uma provável proteína de capsídeo das mesmas viroses.

Após investigar 204 isolados europeus do fungo *Heterobasidion annosum*, patogênico de coníferas, IHRMARK et al. (2001) identificaram oito linhagens apresentando de uma (três linhagens) a duas bandas (cinco linhagens) de RNAdf de tamanho de 1,8 a 2,4kb, utilizando DNA como marcador de peso molecular. Uma linhagem pertencia ao grupo tipo P e as outras sete, ao grupo tipo S de interesterilidade. O RNAdf de uma das linhagens com duas bandas foi parcialmente

seqüenciado e a seqüência obtida apresentou grande homologia com várias RDRPs, sendo a maior com a provável RDRP de *Rhizoctonia solani* (partitivírus). Neste estudo também foram incluídas quatro linhagens de *H. araucariae*, porém nenhuma banda extra foi verificada nestas linhagens.

Em recente estudo, CHENG et al. (2003) seqüenciaram completamente o RNAdf de *Coniothyrium minitans* e encontraram duas “ORFs” parcialmente sobrepostas, sendo que uma codifica uma provável RDRP e a outra uma provável proteína de capsídeo. Baseado na organização do genoma e na análise da seqüência, o vírus que infecta esta linhagem de *C. minitans* foi identificado como pertencente à família Totiviridae e foi denominado CmRV (*C. minitans* RNA vírus).

No fungo *Diaporthe ambigua*, a seqüência do genoma do RNAdf – DaRV (*D. ambigua* RNA vírus) – encontrada por PREISIG et al. (2000) foi de 4113pb contendo 53% de GC, com duas ORFs presentes no mesmo sentido. O domínio conservado da RDRP estava presente, no entanto, nenhuma ORF foi verificada codificando para uma proteína de capsídeo. Com estes dados, os autores sugerem que o DaRV não é encapsulado e pode estar associado à membrana da célula uma vez que seis prováveis hélices transmembranas estão presentes na porção N-terminal, a qual deve dirigir e ancorar o complexo viral à membrana. Neste fungo, a presença de RNAdf está associada à hipovirulência. MOLELEKI et al. (2003) conseguiram a transfecção do cDNA do DaRV, clonado no plasmídeo pGEM-T “Easy vector” (Promega), para o fungo *Diaporthe perijuncta* através de eletroporação de esferoplastos. Após a confirmação da existência do vírus neste fungo, estes autores verificaram que estas linhagens tiveram uma diminuição na taxa de crescimento e aumentaram a produção de micélio aéreo, porém deixaram de produzir ascósporos. Em ensaio com maçã, estes autores também verificaram que a patogenicidade não foi alterada, concluindo então que o DaRV parece não possuir potencial como controle biológico destes fitopatógenos.

Resultados mais favoráveis da utilização de vírus no controle biológico de fungos fitopatogênicos vêm sendo obtidos com os vírus de hipovirulência de *Cryphonectria parasitica*. Este fungo é responsável pelo cancro em castanheiras. Na Europa, esta doença vem sendo controlada pela disseminação de linhagens hipovirulentas (com vírus) e atualmente, lesões de cancro curadas estão sendo encontradas e investigadas. Em todas é confirmada a presença do RNA dupla fita do

hipovírus (ROBIN; HEINIGER, 2001). Recentemente, HOEGGER et al. (2003) comprovaram a disseminação dos vírus presentes nas linhagens infectadas em cancos previamente tratados com o fungo infectado com o vírus e também em novas lesões da doença, que não tinham sido tratadas anteriormente.

SASAKI et al. (2002) utilizaram a técnica de biolística para transformação, com o cDNA de CHV1-EP713, vírus responsável pela hipovirulência em *Cryphonectria parasítica*, de fungos da ordem Diaporthales, sendo duas linhagens de *C. parasítica*, uma de *Valsa ceratosperma* e também uma linhagem de *Phomopsis* tipo G. Tanto para os hospedeiros naturais deste vírus como para *V. ceratosperma* e *Phomopsis*, foram observadas uma alteração morfológica e, mais importante, uma redução na virulência destas linhagens.

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

3.5 BIBLIOTECA GENÔMICA

Estudos clássicos de microscopia eletrônica e mapeamento genético contribuíram para elucidar em parte a organização dos genes, especialmente em células procarióticas. No início dos anos 70 tornou-se possível o isolamento, purificação e análise de fragmentos de DNA através da Tecnologia do DNA Recombinante. A partir de então, abordagens antes não aventadas tornaram-se realidade como a construção de uma biblioteca genômica de qualquer organismo através da fragmentação do DNA cromossômico e da preservação destes fragmentos em um vetor de clonagem, capaz de se propagar em uma célula hospedeira (FELIPE et al., 1992).

Para que o genoma de um organismo esteja totalmente representado em uma biblioteca genômica, alguns aspectos devem ser considerados. Primeiramente deve-se levar em conta a complexidade do genoma em questão. Desta forma, é necessário calcular o número de clones requeridos para se ter todos os genes representados pelo menos uma vez na biblioteca genômica. Também, deve-se considerar que a construção de uma biblioteca genômica a partir do DNA total de uma célula eucariótica incluirá além das regiões codificadoras, regiões não codificadoras, que representam a maior parte do DNA de organismos eucarióticos.

Bibliotecas genômicas são construídas geralmente a partir do DNA total do organismo, mas também podem ser construídas a partir de DNA complementar (cDNA). Este método baseia-se na extração do RNA mensageiro (mRNA) e na síntese *in vitro* do cDNA e traz algumas vantagens, pois presumivelmente todo o DNA da biblioteca corresponde a seqüências que serão traduzidas em proteínas. Porém, a grande desvantagem deste método é que a biblioteca ficará incompleta, pois apenas os genes que estão sendo expressos nas condições fisiológicas em que o mRNA foi extraído estarão representados (ALBERTS, 2004).

Recentemente, VETTORE et al. (2001) construíram várias bibliotecas de cDNA de diferentes tecidos, em diferentes condições fisiológicas, de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). Um total de 291.689 clones de DNA foram seqüenciados, resultando em 237.954 seqüências de expressão ("ESTs – Expressed Sequence Tags") sendo que 38% não apresentaram homologia com outras seqüências depositadas em bancos de dados. Aproximadamente 53% das seqüências foram encontradas em mais de uma biblioteca e as 47% restantes, foram encontradas exclusivamente em bibliotecas específicas.

Em alguns casos, o uso de uma biblioteca de cDNA juntamente com uma biblioteca genômica é bastante vantajoso. BENEN et al. (1998) isolaram um gene que codifica para uma enzima ("vanillyl-alcohol oxidase") de uma biblioteca de cDNA de *Penicillium simplicissimum* e utilizaram-no como sonda para isolar o mesmo gene de uma biblioteca genômica. Comparando as seqüências do mesmo gene isolado das duas bibliotecas, estes autores descobriram que este gene apresenta cinco pequenos introns. Também VAN DE KAMP et al. (1999) utilizaram bibliotecas de cDNA e genômica para estudar genes envolvidos no transporte de sulfato em *P. chrysogenum*.

Segundo FELIPE et al. (1992), para a construção de uma biblioteca genômica, três elementos devem ser cuidadosamente estudados, escolhidos e preparados em detalhe:

1º) Inserção:

Após a extração e purificação do DNA total do organismo em estudo, este deverá ser quantificado e sua integridade confirmada em gel de agarose. O DNA deverá então ser clivado com enzima de restrição, de forma que se obtenham extremidades coesivas compatíveis com as extremidades do vetor linearizado. Uma vez estabelecido um padrão de clivagem conveniente para a obtenção de inserções do tamanho médio adequado, o DNA digerido deverá ser fracionado em gel de agarose ou em gradiente de sacarose, para se isolar a população de fragmentos do tamanho desejado.

2º) Vetores:

A escolha do vetor para clonagem depende dos tamanhos dos fragmentos com que se quer trabalhar, da facilidade de manuseio do vetor, da eficiência na recuperação dos clones obtidos e do processo de seleção dos recombinantes. Basicamente são utilizados três tipos de vetores: plasmídios (para insertos em torno de 5kb), bacteriófagos (para insertos de 10 a 20kb) e cosmídios (para insertos de até 45kb).

Em função do tamanho do genoma, bibliotecas genômicas de fungos filamentosos têm sido construídas preferencialmente em bacteriófagos e cosmídios, pois permitem insertos maiores que em plasmídios. Dentre os bacteriófagos, um dos mais utilizados é o fago λ EMBL3 (SMITHSON et al., 1995; TUDZYNSKI et al., 1996; XOCONOSTLE-CÁZARES; LÉON-RAMIREZ; RUIZ-HERRERA, 1996). Recentemente, cromossomos artificiais de bactérias ("BACs") também vêm sendo utilizados como vetores, podendo suportar insertos em torno de 100kb, diminuindo muito o número de clones necessários para representar o genoma do organismo (KUTIL et al., 2004)

3º) Células hospedeiras:

Pela sua definição funcional, uma célula hospedeira é aquela capaz de receber o vetor (plasmídios, bacteriófagos ou cosmídios) através de um processo de transformação ou infecção e propagá-lo eficiente e convenientemente. Universalmente, a bactéria *Escherichia coli* é a hospedeira escolhida, não só pelas

suas facilidades de manuseio, como também pela farta informação existente na literatura sobre sua genética.

A construção de uma biblioteca genômica de um organismo abre inúmeras perspectivas de investigação, isolamento e seqüenciamento de genes. Em recente trabalho com o fungo *Stagonospora* (*Septoria*) *nodorum*, patógeno de trigo, BAILEY, MUELLER e BOWYER (2000) obtiveram linhagens deficientes na produção da enzima ornitina decarboxilase (ODC) e estas linhagens apresentaram grande diminuição de virulência. Utilizando um oligonucleotídeo iniciador degenerado em PCR ("Polymerase Chain Reaction"), a região central deste gene foi amplificada e utilizada como sonda para o isolamento do gene a partir de uma biblioteca genômica (construída em bacteriófago λ) deste fungo. Com o gene isolado, este foi seqüenciado e a proteína codificada (ODC) foi comparada com a produzida por outros fungos, encontrando-se similaridade. Combinando as técnicas de PCR, RT-PCR e hibridação, BENITO, GARCIADEBLÁS e RODRÍGUEZ-NAVARRO (2000) isolaram seis genes que codificam para ATPases em *Neurospora crassa*.

MIÑAMBRES et al. (2000) descreveram um protocolo simples e rápido que tem sido utilizado com sucesso na clonagem de muitos genes de diferentes microrganismos (*Pseudomonas*, *Escherichia*, *Aeromonas*, *Streptomyces*, *Penicillium*) denominado FGIP ("Fast Gene Isolation Procedure"). Nesta técnica não há a necessidade de hibridação, porém é indispensável o conhecimento de um oligopeptídeo pertencente à proteína ou uma seqüência de oligonucleotídeo correspondente à seqüência codificadora do gene. São construídos dois oligonucleotídeos iniciadores complementares ao braço esquerdo (L) e ao direito (R) do vetor utilizado na construção da biblioteca genômica. Um outro oligonucleotídeo iniciador deduzido a partir da proteína é sintetizado e combinado com o oligonucleotídeo iniciador L ou com o R e a amplificação por PCR é feita utilizando uma amostra do DNA total da biblioteca genômica como molde. Cada banda amplificada, com tamanho equivalente ou maior do que o esperado, de acordo com o peso molecular da proteína, é investigada.

JOHNSON et al. (2000) em estudo com linhagens patogênicas e não patogênicas do fungo *Alternaria*, isolaram de uma biblioteca genômica (fago Lambda Zap) de *A. alternata* o gene completo (13,1 kb) da AM-toxina sintetase (AMT). Após transformações de linhagens selvagens de *A. alternata*, que resultaram em

interrupções neste gene, foram isoladas linhagens incapazes de causar doenças em cultivares de maçã, susceptíveis a *A. alternata*. Com este tipo de investigação, os autores provaram que o gene *AMT* é um determinante primário da virulência de *A. alternata* em maçã.

Também, a partir de bibliotecas genômicas é que se faz o seqüenciamento completo de genomas. Recentemente um consórcio de pesquisadores e instituições ("ONSA: Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis") realizou o primeiro seqüenciamento completo do genoma de um organismo no Brasil. A bactéria *Xylella fastidiosa*, causadora da clorose variegada de citros (CVC), teve seu genoma seqüenciado e, além de um cromossomo principal de aproximadamente 2,68 Mb, também foram seqüenciados dois plasmídeos encontrados nesta bactéria, sendo um de 51.158 pares de bases e outro de 1.285 pares de bases. A porcentagem total de ORFs ("Open Reading Frames") com provável função biológica foi de 47% de um total de 2.904 prováveis regiões codificadoras. Genes integrantes de importantes vias metabólicas foram identificados e também genes associados aos mecanismos de patogenicidade e virulência desta bactéria. Pelo menos 83 genes derivados de bacteriófagos foram identificados, incluindo genes associados à virulência em outras bactérias, demonstrando uma evidência direta da transferência horizontal de genes (SIMPSON et al., 2000).

Poucos fungos filamentosos têm seus genomas completamente conhecidos. Recentemente, GALAGAN et al. (2003) seqüenciaram o genoma de *Neurospora crassa*, um dos fungos filamentosos mais bem estudados. Com um genoma de aproximadamente 40Mb, foram encontrados cerca de 10.000 genes sendo que alguns deles trouxeram novas perspectivas ao estudo da biologia e evolução deste fungo.

Uma das técnicas mais recentes e mais promissoras no estudo da funcionalidade dos genes é o microarranjo de DNA ("DNA microarrays"). Esta técnica permite a investigação da expressão de milhares de genes simultaneamente e sob diferentes condições fisiológicas (DERISI; IYER; BROWN, 1997; DERISI; IYER, 1999). Até recentemente, as investigações da funcionalidade dos genes ocorriam somente com genes já isolados e seqüenciados, mas HAYWARD et al. (2000) com uma pequena modificação na técnica, utilizaram uma biblioteca genômica de *Plasmodium falciparum* para selecionar as seqüências que foram

investigadas pela técnica de microarranjos de DNA. Com o objetivo de identificar genes envolvidos na fase parasitária do *P. falciparum* para futuro desenvolvimento de vacinas, estes pesquisadores selecionaram 51 seqüências correspondentes a genes ativados nesta fase, sendo que destes, 23 corresponderam a genes ainda não descritos em bancos de dados de genes ("Genebank"). Com esta técnica abre-se mais uma possibilidade de utilização de bibliotecas genômicas no estudo da funcionalidade de genes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LINHAGENS UTILIZADAS

Diferentes linhagens de *Guignardia citricarpa*, *G. mangiferae* e *Phyllosticta spinarum* foram utilizadas conforme descrito a seguir e discriminado nas Tabelas 2, 3 e 4, respectivamente. Nas tabelas também estão dados sobre o hospedeiro, o local e o ano de isolamento de cada linhagem.

- Avaliação do crescimento radial e esporulação:

G. citricarpa: PC7LB8

P. spinarum: ECPR3

- Caracterização morfológica em MC e BDA:

G. citricarpa: PC7LB8, PC7LD6, PC7LB6, PC7LE10, PC3C, PC12C, PCP6, PC13, PC IAC19/02, PC 20/02

G. mangiferae: E13C, E20C, E21C, F75LP, ECN22, PGB1515, EG3Z, EC01/96, ECOL23, EC16/96

P. spinarum: ECPR3, ECPR5, ECPR6, ECPR8, ECPR10

- RNA dupla fita:

G. citricarpa: PC13, PC7LA2, PC7LD6, PC7LB6, PC7LI3, PC7LB8, PC7LE10, PC13/96, PC19/96, PC3C, PC6C, PC8C, PC9C, PC10C, PC12C, PC15C, PC18C, PC IAC19/02, PC20/02, PC1G, PC2G, PC3G

G. mangiferae: EC145, EC131, EC01/96, EC16/96, ECF75LP, EG3Z, ECOL23, ECN22, PGB1515, E1C, E2C, E4C, E5C, EC7C, E11C, E13C, E14C, EC16C, EC17C, E19C, E20C, E21C

P. spinarum: ECPR3, ECPR5, ECPR6, ECPR8, ECPR10

- Transformação com os plasmídeos p-GEM T com as seqüências de RAPD

Escherichia coli: Foi utilizada a linhagem DH10B.

- Biblioteca genômica:

E. coli: Foi utilizada a linhagem LE 392.

Bacteriófago: Foi utilizado o fago LambdaGEM®-11.

G. citricarpa: PC IAC19/02.

TABELA 2 – HOSPEDEIRO, ANO E LOCAL DE ISOLAMENTO DAS LINHAGENS UTILIZADAS DE *Guignardia citricarpa*

LINHAGEM	HOSPEDEIRO	ANO	ISOLAMENTO
PC13	<i>Citrus limon</i>	1996	Mogi-Guaçu/SP-Brasil ¹
PCP6	<i>Citrus</i> sp (falsa melanose)	1996	Cordeirópolis/SP-Brasil ¹
PC7LA2	<i>Citrus</i> sp	1996	Mogi-Guaçu/SP-Brasil ¹
PC7LD6	<i>Citrus</i> sp	1996	Mogi-Guaçu/SP-Brasil ¹
PC7LB6	<i>Citrus</i> sp	1996	Mogi-Guaçu/SP-Brasil ¹
PC7LI3	<i>Citrus</i> sp	1996	Mogi-Guaçu/SP-Brasil ¹
PC7LB8	<i>Citrus</i> sp	1996	Mogi-Guaçu/SP-Brasil ¹
PC7LE10	<i>Citrus</i> sp	1996	Mogi-Guaçu/SP-Brasil ¹
PC13/96	<i>Citrus</i> sp	1996	Cordeirópolis/SP-Brasil ¹
PC19/96	<i>Citrus</i> sp	1996	Cordeirópolis/SP-Brasil ¹
PC IAC19/02	<i>Citrus</i> sp (limão Eureka)	2002	Cordeirópolis/SP-Brasil ¹
PC 20/02	<i>Citrus sinensis</i> (laranja pêra)	2002	Cordeirópolis/SP-Brasil ¹
PC1G	<i>Citrus limonia</i> (limão cravo)	2002	Jaboticabal/SP-Brasil ²
PC2G	<i>Citrus</i> sp (limão verdadeiro)	2002	Jaboticabal/SP-Brasil ²
PC3G	<i>Citrus sinensis</i> (laranja pêra)	2002	Jaboticabal/SP-Brasil ²
PC3C	<i>Citrus</i> sp	-	África do Sul ³
PC6C	<i>Citrus</i> sp	-	África do Sul ³
PC8C	<i>Citrus</i> sp	-	África do Sul ³
PC9C	<i>Citrus</i> sp	-	África do Sul ³
PC10C	<i>Citrus</i> sp	-	África do Sul ³
PC12C	<i>Citrus</i> sp	-	Brasil ³
PC15C	<i>Citrus</i> sp	-	Japão ³
PC18C	<i>Citrus</i> sp	-	México ³

FONTE: O autor

NOTAS: Linhagens cedidas por: ¹ IAC – Biólogo Carlos I. A. Vildoso; ² Dr. Antônio de Góes, UNESP; ³ Dr. G.C. Carroll, Univ. Oregon, EUA.

TABELA 3 – HOSPEDEIRO, ANO E LOCAL DE ISOLAMENTO DAS LINHAGENS UTILIZADAS DE *Guignardia mangiferae*

LINHAGEM	HOSPEDEIRO	ANO	ISOLAMENTO
ECN22	<i>Citrus sinensis</i> (laranja pêra)	1997	Novais/SP-Brasil ¹
EC145	<i>Citrus reticulata</i> (tangerina)	1994	Cordeirópolis/SP-Brasil ¹
EC131	<i>C. sinensis</i> x <i>C. reticulata</i> (tangor)	1994	Cordeirópolis/SP-Brasil ¹
ECOL23	<i>Citrus sinensis</i> (laranja pêra)	1997	Olímpia/SP – Brasil ¹
EC01/96*	<i>Citrus limon</i>	1996	SP-Brasil ²
EC16/96*	<i>Citrus limon</i>	1996	Cordeirópolis/SP-Brasil ²
EC196/01*	<i>Citrus</i> sp	2001	SP - Brasil ²
ECF75LP	<i>Citrus</i> sp	1998	Tucumán - Argentina ³
EG3Z	<i>Paulinnia cupana</i> (guaraná)	1996	Manaus/AM-Brasil ⁴
E1C	Pittosporaceae	-	EUA ⁵
E2C	Zamiaceae	-	África do Sul ⁵
E4C	Zamiaceae	-	EUA ⁵
E5C	Moraceae	-	Tailândia ⁵
EC7C	<i>Citrus</i> sp	-	EUA ⁵
E11C	Sapotaceae	-	EUA ⁵
E13C	Lauraceae	-	África do Sul ⁵
E14C	Araliaceae	-	África do Sul ⁵
EC16C	<i>Fortunela margarita</i> (laranja)	-	EUA ⁵
EC17C	<i>Citrus</i> sp	-	EUA ⁵
E19C	Araliaceae	-	Costa Rica ⁵
E20C	Rubiaceae	-	EUA ⁵
E21C	<i>Camellia japonica</i>	-	EUA ⁵
PGB1515**	<i>Psidium guajava</i> (goiaba)	1993	Brasília/DF-Brasil ⁶

FONTE: O autor

NOTAS: * linhagens isoladas de lesão como *Guignardia citricarpa* que, através de dados moleculares e características morfológicas, foram identificadas como *Guignardia mangiferae*. ** linhagem isolada de lesão de goiaba, inicialmente descrita como *G. psidii*, porém por meio de dados moleculares, esta linhagem fica agrupada com *G. mangiferae*. Linhagens cedidas por: ¹ Dra. Chirlei Glienke de Blanco (BLANCO, 1999); ² IAC – Biólogo Carlos I. A. Vildoso; ³ Dra. Estela Duran, Tucumán, Argentina; ⁴ Dr. José Odair Pereira, UFAM; ⁵ Dr. G.C. Carroll, Univ. Oregon, EUA; ⁶ Dr. Luimar José Tozetto, UnB.

TABELA 4 – HOSPEDEIRO, ANO E LOCAL DE ISOLAMENTO DAS LINHAGENS UTILIZADAS DE *Phyllosticta spinarum*

LINHAGEM	HOSPEDEIRO	ANO	ISOLAMENTO
ECPR3	<i>Citrus limon</i>	1997	Rio Negro/PR – Brasil ¹
ECPR5	<i>Citrus limon</i>	1997	Rio Negro/PR – Brasil ¹
ECPR6	<i>Citrus limon</i>	1997	Rio Negro/PR – Brasil ¹
ECPR8	<i>Citrus limon</i>	1997	Rio Negro/PR - Brasil ¹
ECPR10	<i>Citrus limon</i>	1997	Rio Negro/PR - Brasil ¹

FONTE: O autor

NOTA: Linhagens cedidas por: ¹ Dra. Chirlei Glienke de Blanco (BLANCO, 1999).

4.2 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS NOS MEIOS DE CULTURA:

4.2.1 Meio Mínimo (MM) (PONTECORVO et al., 1953)

NaNO ₃	6,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
KCl	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
ZnSO ₄	0,01 g
Glicose	10,0 g
Água destilada	p/ 1.000 mL

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

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

Meio Mínimo adicionado de	
Extrato de levedura	2,0 g
Peptona	2,0 g
Caseína hidrolizada	1,5 g
Solução de vitaminas	1,0 mL

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

4.2.3 Meio BDA

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

A batata foi fervida em água destilada por quinze minutos. Depois de peneirado, a dextrose foi adicionada ao caldo resultante e o volume foi completado para 1000 mL com água destilada. O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH 0,1 mol/L. Para meio BDA sólido, foi acrescentado 1,5% de ágar. O meio foi autoclavado e armazenado em temperatura ambiente.

4.2.4 Meio V8 ("Campbell's Vegetable Juice")

V8 (Suco de tomate com vegetais)	10%
Glicose	1%
Ágar	1,5%

A solução foi preparada em H₂O destilada. O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH 1 mol/L. O meio foi autoclavado e armazenado em temperatura ambiente.

4.2.5 Meio LB

bacto-triptona	10 g
bacto-extrato de levedura	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O dest.	p/ 1000 mL

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

4.2.6 Meio LA

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

4.2.7 Meio TB / top agarose

bacto-triptona	10 g
NaCl	8 g

H₂O dest. p/ 1000 mL

Para a top agarose, foi acrescentado 0,6% (p/v) de agarose.

4.2.8 Maltose 20% (Solução estoque)

A solução foi preparada em 10 mL de H₂O milli-Q, esterilizada por filtração, aliquoteada e armazenada a -20°C.

4.2.9 Solução de Vitaminas

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

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

4.3 SOLUÇÕES E TAMPÕES

4.3.1 Solução Salina

NaCl 0,85% (p/v) em H₂O destilada.

A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

4.3.2 Solução de "Tween 80"

"Tween 80" 0,1% (v/v) em H₂O destilada.

A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

4.3.3 GET

Glicose	4,5 g
EDTA 0,5M pH 8,0 (autoclavado)	10 mL
Tris-HCl 1M pH 7,4 (autoclavado)	12,5 mL
H ₂ O destilada	p/ 500 mL

A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

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

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

A solução foi mantida a 4°C.

- KOAc 5 M (estoque):

KOAc	246,87 g
H ₂ O Milli-Q	p/ 500 mL

4.3.5 Tampão de Extração de DNA (RAEDER; BRODA, 1985)

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

A solução foi preparada no momento do uso.

4.3.6 Clorofil

Clorofórmio	24 volumes
Álcool Isoamílico	1 volume

4.3.7 Clorofane

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

4.3.8 Tampão TE

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

4.3.9 Tampão TBE 5x (solução estoque)

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

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

4.3.10 Solução de Brometo de Etídio

O brometo de etídio foi dissolvido (1,0% p/v) em água destilada. No momento do uso, foram adicionados 3 µl em 100 mL de água destilada. A solução foi mantida em temperatura ambiente.

4.3.11 Tampão do fago

Tris-HCl pH 7,4	20 mM
MgSO ₄	10 mM
NaCl	100 mM

4.3.12 Tampão SM

Tris-HCl pH 7,5	50 mM
MgSO ₄	8 mM
NaCl	100 mM
Gelatina	0,01%

4.3.13 Tampão de corrida (“gel loading buffer”)

Sacarose	38%
Azul de bromofenol	1%
EDTA	67 mM

4.3.14 Solução EDTA 0,5 M pH 8,0 (estoque)

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

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

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

4.3.16 RNase (USB)

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

4.3.17 DNase (Gibco)

A enzima foi fornecida na concentração de 140U/ μ L, sendo preparada, conforme instruções do fabricante, na concentração de 140 U/mL. Foi armazenada a -20°C .

4.3.18 Nuclease S1 (Gibco)

A enzima foi fornecida em uma solução de 20 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 0,1 mM de acetato de zinco, 50mM de NaCl e 50% (v/v) de glicerol, sendo sua concentração de 767 U/ μ L. Foi feita uma diluição de 1:10 na solução tampão de diluição também fornecida, e estocada a -20°C .

4.3.19 Solução de Lise

NaOH 1,8 M	0,5 mL
SDS 10%	0,5 mL
Água Milli-Q	p/ 5,0 mL

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

4.4 PREPARO DE MATERIAL

4.4.1 Esterilização

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

Vidrarias foram esterilizadas em forno Pasteur a 180°C por 4 horas.

4.4.2 Incubação

- Linhagens de *G. citricarpa*, *G. mangiferae* e *P. spinarum*: placas com meio sólido foram incubadas em estufa tipo BOD, a 28°C, por tempo e com luminosidade variados, conforme especificado nas metodologias.
- Linhagens de *E. coli*: placas com meio sólido e frascos com meio líquido foram incubados em estufa a 37°C, por tempo variado, conforme especificado nas metodologias.

4.5 CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE ESPOROS EM DIFERENTES CONDIÇÕES E TESTES ESTATÍSTICOS

Esporos provenientes de colônias de *Guignardia citricarpa* e *Phyllosticta spinarum*, com 25 dias de crescimento em meio completo sólido, foram inoculados no centro de placas de Petri com os seguintes meios de cultura: meio completo (MC) (4.2.2), BDA (4.2.3) e V8 (4.2.4) e incubados a 28°C com diferentes condições de luminosidade (fotoperíodo natural – 12 horas e luz fluorescente do tipo luz do dia, ininterruptamente – 24 horas). Foram feitas três repetições para cada tratamento. Após 14 dias de crescimento, o diâmetro de todas as colônias foi medido, para avaliar o crescimento radial. Para a avaliação da produção de esporos, foi retirado um disco de um centímetro de diâmetro (com o auxílio de um tubo de ensaio) tangencialmente ao centro da colônia. Este material foi colocado em 2 mL de solução Tween 80 0,1% (4.3.2) e macerado com o auxílio de um bastão de vidro por 3 minutos. Após agitação

por 30 segundos em agitador de tubos (tipo Vortex) foi feita a contagem dos esporos em Câmara de Neubauer.

Para este experimento foi utilizado o delineamento estatístico inteiramente casualizado (DIC) e a partir dos dados obtidos foram feitas a análise de variância (ANOVA) e eventualmente o Teste de Tukey para médias. Também foi feito um teste de correlação entre as características crescimento radial e esporulação.

Várias linhagens de *Guignardia citricarpa*, *G. mangiferae* e *Phyllosticta spinarum* foram caracterizadas morfolologicamente nos meios: meio completo (MC) (4.2.2) e BDA (4.2.3), após 14 dias de crescimento em BOD a 28°C.

4.6 SEQUENCIAMENTO DOS MARCADORES DE RAPD

Marcadores moleculares foram selecionados a partir do perfil de bandas de linhagens de *G. mangiferae* e *G. citricarpa* com os oligonucleotídeos iniciadores OPX14 e OPX17 de RAPD. Estes fragmentos de DNA foram eluídos do gel e clonados no plasmídeo pGEM-T (mapa do plasmídeo em Anexo) por CHRISTO (2002). Foram obtidos dois marcadores exclusivos de linhagens de *G. citricarpa* sendo um com o oligonucleotídeo iniciador OPX 14, denominado 14P3 e o outro com o oligonucleotídeo iniciador OPX 17, denominado de 17P3. Também foi obtido com o oligonucleotídeo iniciador OPX 14, um marcador exclusivo de linhagens de *G. mangiferae*, denominado 14E1. O sequenciamento destes fragmentos clonados, o alinhamento das seqüências e o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores foram feitos neste trabalho, conforme metodologia descrita a seguir.

4.6.1 Transformação de *Escherichia coli*

- Células competentes:

Foi selecionada uma colônia isolada de cultura nova de *E. coli*, linhagem DH10B, como fonte para inóculo em 10 mL de LB (4.2.5). Após crescimento por 12 a 16 horas em estufa a 37°C agitando a 200 rpm, foi retirada uma alíquota de 10 µL e inoculada em 10 mL de LB novamente, nas mesmas condições. Após crescimento de aproximadamente 5 horas, a cultura foi colocada no gelo e aliqotada em

volumes de 1 mL. Após centrifugar por 1 minuto a 4°C, 11.750 g, o meio de cultura foi descartado e o precipitado foi suavemente ressuspensionado em 100 µL de CaCl₂ 0,1 M, esterilizado e gelado.

- Transformação:

Foi acrescentado 1 µL de DNA (plasmídeo) à suspensão de células e a mistura de células e DNA foi mantida por meia hora no gelo, por dois minutos a 42°C e por mais 10 minutos no gelo. Foi acrescentado 1 mL de LB (4.2.5) e deixado em estufa, a 37°C por 30 minutos a uma hora. Foi retirada uma alíquota de 100 µL desta cultura e espalhada com o auxílio de alça de Drigalski em placas contendo LA (4.2.6) com ampicilina. Uma colônia proveniente desta cultura foi inoculada em meio LB contendo ampicilina (4.2.5) e crescida por 12 a 16 horas em estufa a 37°C sob agitação de 200 rpm. Após o crescimento, foi retirada uma alíquota para armazenar em uma solução 1:1 de meio LB com ampicilina e Glicerol e mantida a -20°C ou foi realizada a extração dos plasmídeos (mini-prep).

4.6.2 Mini-Prep

A extração de DNA plasmidial foi realizada utilizando-se 1,5 mL da cultura obtida no item anterior, centrifugada por 1 minuto a 11.750 g. Após descartar o sobrenadante, foram adicionados 180 µL de GET (4.3.3) e, então, as células foram ressuspensionadas com auxílio de agitador (tipo Vortex). Após centrifugar novamente nas mesmas condições, as células foram ressuspensionadas em 150 µL de GET contendo 0,5 µL de RNase (20 mg/mL). Foram adicionados 150 µL de solução de lise (NaOH 0,18M/SDS 1%) (4.3.19) que foi misturado, invertendo-se os tubos cuidadosamente. Após incubação por cinco minutos em temperatura ambiente, foram acrescentados 150 µL de solução de KOAc 3M pH 5,2 (4.3.4). A mistura foi homogeneizada por inversão cinco vezes, e os tubos foram incubados abertos em estufa a 90°C por exatos 30 minutos. Os tubos foram fechados e mantidos em banho de gelo por 10 minutos. Depois de centrifugar por 10 minutos a 11.750 g, o sobrenadante foi transferido para um tubo novo e foi adicionado 0,6x de volume de isopropanol. Os tubos foram misturados por inversão e centrifugados por 10 minutos

a 11.750 g a 20°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70%. Após centrifugar por 5 minutos a 11.750 g a 20°C, foi repetida a lavagem com etanol e a centrifugação. Os tubos foram deixados secar por 60 minutos a 37°C ou durante a noite em temperatura ambiente, cobertos com papel toalha. O DNA foi ressuspenso em 30 µL de água Milli-Q esterilizada. A qualidade do DNA obtido e sua concentração foram avaliadas em eletroforese em gel de agarose. Este DNA foi mantido a -20°C ou utilizado em seguida para a reação de seqüenciamento.

4.6.3 Reação de seqüenciamento

Foram feitas reações de amplificação utilizando o oligonucleotídeo iniciador M13 Universal (5' GTAAAACGACGGCCAG 3') como também com o M13 Reverso (5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'), compatíveis para a amplificação de insertos no plasmídeo pGEM-T. As condições para cada reação, tanto com o M13 Universal como com o M13 Reverso foram: 5 pmol de oligonucleotídeos iniciadores, 200 a 500 ng de DNA e 3 µL de ET (kit: "DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE" da Amersham Biosciences), água Milli-Q para um volume final de 10 µL. A amplificação foi realizada em um termociclador Eppendorf (Modelo: Mastercycler gradient) de acordo com as seguintes etapas: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 30 ciclos de 20 segundos a 94°C e 1 minuto e 30 segundos a 60°C.

4.6.4 Purificação da reação de seqüenciamento

Para 10 µL de reação, foram adicionados 10 µL de água Milli-Q esterilizada e 2 µL de AcNH₄ (acetato de amônio) 7,5 M. Após misturar, foram acrescentados 65 µL de etanol 96% e centrifugado por 20 minutos a 11.750 g. Descartado o sobrenadante, o precipitado foi lavado com 400 µL de etanol 70%. Após centrifugar por 5 minutos a 11.750 g, o sobrenadante foi novamente descartado. Repetiu-se a lavagem com etanol. Foi deixado secar por 30 minutos a 37°C e durante a noite em temperatura ambiente. Este DNA foi mantido a -20°C por curtos períodos (1 a 2 semanas) e os tubos foram protegidos da luminosidade, embalados em papel alumínio. O DNA foi

ressuspendido em 5 a 10 µL de água Milli-Q esterilizada quando o seqüenciador utilizado foi o MegaBace ou em tampão específico quando foi utilizado o ABI-377.

4.6.5 Seqüenciamento

As amostras foram separadas em seqüenciador capilar, Modelo: MegaBACE, da Amersham Biosciences e algumas repetições foram feitas no ABI-377, da Applied Biosystems. Para aumentar a confiabilidade nas seqüências, cada fragmento foi seqüenciado várias vezes e, dados de, no mínimo, oito repetições (com leituras nos dois sentidos) foram utilizados no alinhamento.

O alinhamento das seqüências foi feito no programa ClustalW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994). Após o alinhamento destas seqüências, foi criada uma seqüência consenso para cada fragmento.

As seqüências foram submetidas ao banco de dados do NCBI ("National Center for Biotechnology Information"), no programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) das seguintes formas:

- Blast n: compara a seqüência de nucleotídeos com outras seqüências de nucleotídeos.
- Blast x: traduz a seqüência de nucleotídeos nos seis quadros de leitura em seqüências de aminoácidos e compara com outras seqüências de aminoácidos do banco de dados.

4.6.6 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

Para cada seqüência, foi desenhado um par de oligonucleotídeos iniciadores de forma que fosse possível uma amplificação conjunta ("multiplex") para proporcionar uma identificação rápida e precisa das espécies de *G. citricarpa* e *G. mangiferae*. Para isso, os oligonucleotídeos iniciadores desenhados não podem ter regiões complementares (mais do que 3 bases) e também devem possuir temperatura de anelamento (T_m) semelhante. A T_m de todos os oligonucleotídeos iniciadores desenhados está entre 64 a 66 °C, conforme calculado utilizando-se a fórmula $T_m = (4 \times [G+C]) + (2 \times [A+T])^\circ C$ (BROWN, 2003). E também, estes

oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados para amplificar fragmentos com tamanhos bastante distintos.

4.7 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS

Duas técnicas foram utilizadas:

4.7.1 Extração de ácidos nucléicos (RAEDER; BRODA, 1985 modificado por GLIENKE, 1995)

Fragmentos de micélio foram inoculados em nove pontos, em placas de Petri contendo meio completo sólido (4.2.2). Após 5 a 6 dias de crescimento, as colônias foram retiradas do meio com o auxílio de uma espátula, cuidando para não deixar resíduo de meio de cultura. Os discos de micélio foram colocados em frascos fechados com filme de parafina, congelados e armazenados ou levados ao liofilizador (com o filme de parafina perfurado). Após a liofilização, os frascos foram fechados hermeticamente e armazenados em freezer ou procedeu-se a extração de ácidos nucléicos.

Ao micélio liofilizado, foi adicionado nitrogênio líquido e este foi triturado em gral de porcelana até obtenção de um pó bem fino. Este pó de micélio foi aliquoteado em tubos de 2 mL (40 a 60 mg/tubo) no qual foi acrescentado o tampão de extração (4.3.5), previamente aquecido em banho-maria a 70°C, proporcionando uma suspensão homogênea após agitação suave. Foi incubado por 20 minutos à mesma temperatura. Foi acrescentado um volume de fenol equilibrado e após a mistura das fases, foi centrifugado a 2.040 g por 15 minutos. A fase aquosa foi coletada, foi acrescentado um volume de clorofane (4.3.7) e centrifugado nas mesmas condições. Após novamente coletar a fase aquosa, foi acrescentado um volume de clorofil (4.3.6), misturado e centrifugado. À fase aquosa, foi acrescentado lentamente um volume de isopropanol, e mantida a solução a -20°C por, no mínimo, 1 hora para precipitação dos ácidos nucléicos. A suspensão foi centrifugada a 11.750 g por 20 minutos e o sobrenadante foi desprezado. O precipitado foi lavado com etanol 70% (1 mL por tubo) e novamente centrifugado (11.750 g por 5 minutos). Repetiu-se este

procedimento e então os tubos foram deixados abertos e invertidos para secagem, a 37°C por uma hora ou durante a noite em temperatura ambiente. Os ácidos nucléicos foram ressuspensos em TE (4.3.8), TE diluído 1:10 (Tris 1mM, EDTA 0,1 mM) ou água Milli-Q esterilizada, conforme especificado em cada protocolo.

4.7.2 “Wizard® Genomic DNA Purification Kit” - Promega (modificado pela autora)

O protocolo original é utilizado para extração de DNA de plantas e sofreu pequenas alterações, descritas a seguir.

O micélio liofilizado e triturado foi obtido conforme descrito no item 4.7.1. Foram colocados 40 mg deste pó de micélio em tubos de microcentrifuga de 1,5 mL. Em cada tubo contendo o micélio, foi adicionado 600 µL de Solução de Lise de Núcleo. Os tubos foram homogeneizados em agitador de tubos por 1 a 3 segundos e incubados a 65°C por 15 minutos. Foram adicionados 3 µL de Solução de RNase que foi misturada à suspensão por inversão dos tubos (2 a 5 vezes). Os tubos foram incubados a 37°C por 15 minutos e deixados esfriar em temperatura ambiente por 5 minutos. Para o preparo de amostras para investigação da presença de RNAdf, esta etapa foi suprimida. Foram adicionados 200 µL de Solução de Precipitação de Proteína e a suspensão foi agitada vigorosamente por 20 segundos em alta velocidade (agitador de tubos do tipo Vortex). Após centrifugar por 3 minutos a 16.000 g, a proteína precipitada formou um *pellet* compacto. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido cuidadosamente para um tubo novo, no qual foi acrescentado um volume de clorofil (4.3.6) e centrifugado por 10 minutos a 11.750 g. O sobrenadante foi novamente retirado e a este foram adicionados 600 µL de isopropanol em temperatura ambiente. Depois de misturado gentilmente, formou-se uma massa visível de DNA. Esta suspensão foi centrifugada por um minuto a 16.000 g em temperatura ambiente. O sobrenadante foi despejado cuidadosamente e foram adicionados 600 µL de etanol 70% para a lavagem do DNA. Após centrifugar novamente por um minuto a 16.000 g em temperatura ambiente, o etanol foi retirado cuidadosamente com uma pipeta Pasteur e os tubos foram deixados abertos e invertidos para a secagem do DNA. O DNA foi ressuspendido em 100 µL de Solução de Re-hidratação e incubado por uma hora a 65°C (mexendo o tubo eventualmente) ou

deixado nesta solução durante uma noite em temperatura ambiente ou a 4°C até completa ressuspensão.

Todas as soluções, exceto o clorofil, o etanol 70% e o isopropanol foram fornecidas junto com o kit.

A integridade dos ácidos nucléicos foi verificada em gel de agarose 0,8%. O gel foi corado por 15 minutos com solução de brometo de etídio e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta.

4.8 RNA DUPLA FITA E PARTÍCULAS SEMELHANTES A VÍRUS

4.8.1 Identificação da presença de RNA dupla fita

A verificação da presença de bandas de RNA dupla fita das linhagens de *Guignardia citricarpa*, *G. mangiferae* e *Phyllosticta spinarum* foi feita por meio de eletroforeses dos ácidos nucléicos totais destes fungos em gel de agarose 1%. As linhagens que apresentaram bandas extras foram identificadas e a estimativa do tamanho das bandas de RNA dupla fita foi feita com o Programa Kodak 1D 3.5.0 Scientific Imaging System, utilizando como padrão de peso molecular o fago λ clivado com a enzima *HindIII*.

Os ácidos nucléicos de algumas linhagens de cada espécie investigada que apresentaram bandas extras foram tratados com DNase (item 4.3.17), RNase (item 4.3.16) e Nuclease S1 (4.3.18) para certificar a presença de RNA dupla fita.

- Digestão com RNase:

Neste sistema de digestão foi utilizada a concentração final de 1 unidade da enzima para cada μ g de ácidos nucléicos totais em 100 mM de Tris-HCl e 10 mM de EDTA.

- Digestão com DNase:

Neste sistema de digestão foi utilizada a concentração final de 1,75 unidades da enzima para cada μ g de ácidos nucléicos totais em 5 mM de $MgCl_2$ e 0,1 M de acetato de sódio.

- Digestão com Nuclease S1:

Neste sistema de digestão foi utilizada a concentração final de duas unidades da enzima para cada μg de ácidos nucleicos totais, em 30 mM de acetato de sódio pH 4,6; 1 mM de acetato de zinco e 5% de glicerol (Tampão da Nuclease S1 fornecido junto com a enzima).

Os sistemas de digestão foram mantidos em banho-maria a 37°C por, no mínimo, 1 hora. Os ácidos nucleicos não digeridos foram precipitados com isopropanol, lavados com etanol 70% e ressuspensos em tampão TE (4.3.8) para posterior análise em eletroforese em gel de agarose 1%.

4.8.2 Purificação parcial de partículas semelhantes a vírus (“VLPs - Virus-Like Particles”) (HOWITT et al., 1995)

O micélio liofilizado e triturado com nitrogênio líquido foi obtido conforme descrito no item 4.7.1. Foram adicionados, em 10 g deste pó bem fino de micélio, 20 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 a 4°C. Foi acrescentado 0,5 volume de clorofórmio e após centrifugação a 11.000 g por 20 minutos a 4°C, a fase aquosa foi coletada e transferida para tubos de ultracentrífuga. A amostra foi ultracentrifugada a 120.000 g por 80 minutos a 4°C. O precipitado foi ressuspensionado em 1 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,0 por 2 horas e estocado a -20°C durante a noite. A suspensão foi clarificada por centrifugação a 2.000 g por 10 minutos a 4°C. Ao sobrenadante, foram adicionados 10 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,0 e este foi novamente ultracentrifugado a 120.000 g por 80 minutos a 4°C. O precipitado foi então ressuspensionado em 0,5 mL do mesmo tampão por no mínimo 2 horas e transferido para tubos tipo “eppendorf” de 1,5 mL. As amostras foram centrifugadas a 1.700 g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante foi conservado a 4°C.

4.8.3 Microscopia eletrônica de transmissão - MET (HOWITT et al., 1995, com modificações)

Foram colocados 20 μL da amostra sobre uma grade parlódio/carbono, malha 200, e o excesso de material foi removido com papel filtro. Após, foram adicionados 20 μL de acetato de uranila 2% pH 4,0. O material foi examinado à voltagem de 80KV, nos aumentos de 40.000 e 60.000 vezes em Microscópio Eletrônico de

Transmissão, modelo TEM – ZEISS EM 900. E as imagens foram processadas pelo programa KONTRON ELECTRONIC KS300.

4.8.4 Ensaio de compatibilidade

Com o objetivo de iniciar uma investigação sobre possíveis formas de transmissão de partículas semelhantes a vírus e RNA dupla fita entre linhagens de *G. citricarpa* (PC7LB8 e PC13) e *P. spinarum* (ECPR6 e ECPR8), um preliminar ensaio de compatibilidade foi feito. Duas linhagens foram inoculadas no centro de uma placa de Petri com MC (4.2.2), a uma distância de dois centímetros entre os inóculos. Após crescimento por 14 dias em BOD a 28°C, a morfologia das colônias foi observada.

4.9 SELEÇÃO DA LINHAGEM DE *G. citricarpa* PARA A BIBLIOTECA GENÔMICA.

Para garantir a representatividade do genoma de *G. citricarpa* na biblioteca, foi necessário selecionar uma linhagem recém isolada de lesão de MPC, para prevenir uma possível perda de material genético devido a sucessivos repiques em laboratório. Para assegurar que a linhagem escolhida pertencia à espécie *G. citricarpa*, foram feitas caracterizações por RAPD e SCAR, conforme descrito a seguir. O perfil de bandas foi verificado em eletroforese em gel de agarose no qual foram utilizados os marcadores de peso molecular DNA Ladder 100pb (1 µg por canaleta) e o fago λ, clivado com *Hind*III (0,5 µg por canaleta).

4.9.1 Caracterização por RAPD

Foram utilizados o primers OPX 14 (5' ACAGGTGCTG 3'), OPX 17 (5' GACACGGACC 3') e OPX 19 (5' TGGCAAGGCA 3') por apresentarem padrões bem distintos para linhagens de *G. citricarpa*, *G. mangiferae* e *P. spinarum* (CHRISTO, 2002). A reação foi realizada de acordo com as condições descritas por GLIENKE (1995), contendo 50 ng de DNA, tampão PCR 1x, 0,5 U de *Taq* polimerase, 0,3 µM de oligonucleotídeo iniciador, 0,2 mM de cada dNTP, 2,5 mM de MgCl₂ e H₂O Milli-Q

esterilizada para um volume final de 25 μ L. A amplificação foi realizada em um termociclador Eppendorf (Modelo: Mastercycler gradient) de acordo com as seguintes etapas: desnaturação inicial a 95° C por 4 minutos, 40 ciclos de 1 minuto a 92° C / 1,5 minutos a 37° C / 2 minutos a 72° C e extensão final de 3 minutos a 72° C.

4.9.2 Identificação por SCAR

Foi utilizado o par de oligonucleotídeos iniciadores GCP1 (5' AAGTGTGAGTGTCTGAAGGTGG 3') e GCP2 (5' GACGACTCGCTTTTCTACGGC 3'), desenhados por BLANCO (1999), exclusivamente para caracterizar linhagens patogênicas de *G. citricarpa*. As condições de reação foram: tampão PCR 1x, 0,5 U de *Taq* polimerase, 0,5 μ M de oligonucleotídeos iniciadores, 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de $MgCl_2$ e 40 ng de DNA genômico de cada linhagem para um volume final de 20 μ L. A amplificação foi realizada em um termociclador Eppendorf (Modelo: Mastercycler gradient) de acordo com as seguintes etapas: desnaturação inicial a 95° C por 2 minutos, 35 ciclos de 1 minuto a 92° C / 1 minuto a 67° C / 1 minuto a 72° C e extensão final de 3 minutos a 72° C.

4.10 BIBLIOTECA GENÔMICA DE *Guignardia citricarpa*:

4.10.1 Extração de DNA total

A extração foi feita conforme descrito no item 4.7.1, porém em todas as etapas tomou-se o cuidado de preservar ao máximo a integridade do DNA, agitando suavemente e utilizado ponteiras com a ponta cortada.

A integridade do DNA foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,4% (2 V/cm) a 4°C por 16 a 20 horas, utilizando TBE 1x (4.3.9). O gel foi corado por 15 minutos com solução de brometo de etídio (4.3.10) e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. Este DNA também foi quantificado por meio de leitura espectrofotométrica a 260 nm ($A_{260nm} = 1,0$ equivale a 50 μ g/mL de DNA de fita dupla) e sua pureza foi verificada na relação A_{260nm}/A_{280nm} . Para a biblioteca esta relação deve ser superior a 1,75.

4.10.2 Preparação dos insertos

O DNA obtido no item anterior foi utilizado para determinar a quantidade da enzima de restrição *Sau3A* ideal para produzir o maior número de fragmentos de tamanho aproximado de 15 kb. Diferentes diluições da enzima foram utilizadas para digerir 1 µg de DNA durante 30 minutos a 37°C. A reação foi interrompida, adicionando 1 µL de EDTA 0,5 M (4.3.14) e 10 µL de tampão de corrida do gel (“gel loading buffer”) (4.3.13). As digestões obtidas foram analisadas em eletroforese em gel de agarose 0,4% em TBE 1x (4.3.9), 2 V/cm por 16 a 20 horas ou até que o azul de bromofenol tivesse migrado para fora do gel. Após a coloração com solução de brometo de etídio (4.3.10), foi escolhida a diluição que gerou mais fragmentos de tamanhos próximos a 15 kb.

A enzima *Sau3A* foi utilizada por reconhecer uma sequência de quatro pares de bases no DNA de fita dupla (5' GATC 3'), proporcionando uma frequência de digestão muito maior do que enzimas que reconhecem hexanucleotídeos. Outra vantagem está no fato destes quatro pares de bases reconhecidos pela *Sau3A* estarem presentes no núcleo do hexanucleotídeo que compõe o sítio da enzima *BamHI*. Consequentemente, fragmentos de DNA gerados por digestão com *Sau3A* podem se religar por complementação às extremidades de *BamHI*.

O sistema mais adequado para a obtenção de fragmentos com tamanho aproximado de 15 kb foi ampliado para a obtenção de 20 µg de DNA digerido. Para o sistema ampliado, foi utilizada metade da concentração da enzima que tinha sido utilizada para a diluição que gerou mais fragmentos no intervalo selecionado.

O DNA digerido foi aplicado em um gel de agarose (0,5% - LGT) com poços comuns ladeados por marcadores de peso molecular e com poços preparativos de 100 µL. Após a eletroforese (2 V/cm, 16 a 20 horas de corrida a 4°C), canaletas correspondentes aos poços preparativos foram recortadas do gel e as outras canaletas dos poços comuns foram levadas à luz ultravioleta, após coloração com brometo de etídio (4.3.10). A banda de interesse foi marcada, o gel foi remontado e a parte do gel não corada, correspondente à banda marcada, foi recortada. Este DNA digerido foi recuperado do gel por extração com fenol. O gel foi derretido por 5 a 10 minutos a 70°C, foram acrescentados NaCl (250mM), Tris-HCl pH 8,0 (100mM) e EDTA (1mM).

Foi adicionado um volume de fenol saturado, e após homogeneização, foi centrifugado por 10 minutos a 16.000 g e procedeu-se a extração do DNA digerido conforme descrito no item 4.7.1. A concentração e o tamanho deste DNA foram verificados por meio de eletroforese em gel de agarose (0,4% - 2V/cm, por 16 a 20 horas a 4°C), utilizando o fago λ clivado com *HindIII*, como marcador de peso molecular.

4.10.3 Preparação do vetor

O vetor escolhido foi o fago lambda por permitir insertos de aproximadamente 20 kb, pela facilidade de manuseio e infecção nas células bacterianas. Foi utilizado o fago LambdaGEM®-11 (Promega) que foi adquirido purificado na concentração de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e já digerido com a enzima *BamHI*.

Para a ligação dos fragmentos gerados por *Sau3A* (DNA do fungo) com o vetor LambdaGEM®-11 foram testadas duas condições de ligação e um controle:

- 0,5 μg de braços de LambdaGEM®-11 : 1,0 μg de inserto
- 0,5 μg de braços de LambdaGEM®-11 : 2,0 μg de inserto

Controle (DNA digerido do kit):

- 0,5 μg de braços de LambdaGEM®-11 : 1,0 μg de inserto

Aos sistemas foram acrescidos: 1 μL de tampão de ligação (10x), 3 unidades de T4 DNA ligase e H_2O para 5 μL . Os sistemas foram incubados por 72 horas a 8°C. Este DNA foi armazenado a 4°C ou utilizado diretamente para o empacotamento.

4.10.4 Empacotamento do fago

O extrato de empacotamento (Packagene® Extract – Promega) foi retirado do freezer (-80°C) e descongelado no gelo. Imediatamente depois de descongelado, 1,5 a 2,5 μg de DNA ligado foram acrescentados ao extrato e misturado batendo suavemente na base do tubo algumas vezes. A mistura foi incubada a 22°C (temperatura ambiente) por 3 horas. Para cada mistura de DNA/extrato (55 μL), foram adicionados 445 μL de tampão do fago (4.3.11) e 25 μL de clorofórmio. A solução foi misturada suavemente por inversão e deixada parada para o clorofórmio assentar na

base do tubo. Este extrato foi utilizado para infectar as células hospedeiras ou foi estocado a 4°C por no máximo 7 dias.

4.10.5 Preparação das células competentes e infecção com o bacteriófago LambdaGEM®-11

Uma colônia isolada de *E. coli* (LE 392) foi inoculada em 10 mL de meio TB (4.2.7) suplementado com 0,2% de maltose (para permitir a infecção viral) (4.2.8) e 10 mM de MgSO₄ (magnésio para a estabilização da estrutura do fago encapsulado). A cultura foi incubada durante a noite a 37°C com agitação rotatória (150 rpm) e uma nova cultura (5 mL) foi feita com o mesmo meio e suplementos, utilizando 30 µL da cultura inicial como fonte de inóculo. A cultura foi mantida por 4 a 5 horas a 37°C, com agitação (150 rpm) até que atingisse uma D.O. de 0,8. Alíquotas de 1 mL desta cultura foram centrifugadas a 2.040 g durante 5 minutos. Descartado o sobrenadante, o sedimento de células foi ressuspensionado em 100 µL de MgSO₄ 10 mM. Pode-se estocar as células competentes por até dois dias a 4°C.

Para a infecção das células de *E. coli* (LE 392), foram adicionados 100 µl da suspensão de células competentes a 100 µl do sistema contendo os fagos em diversas diluições em tubos de 5 mL. As diluições foram feitas em tampão do fago. A mistura de células e fagos foi incubada a 37°C em banho-maria, durante 30 minutos para ocorrer a infecção das células.

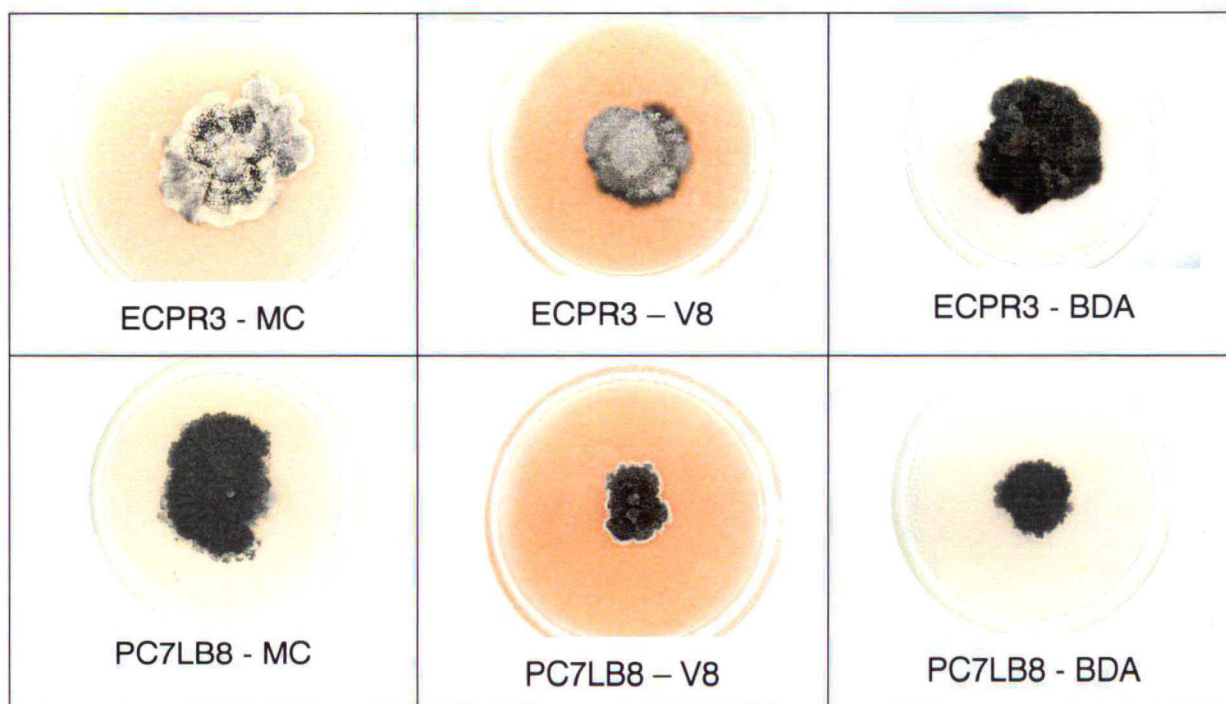
Em cada tubo, foram adicionados 3 mL de meio top-agarose (4.2.7), previamente derretido e mantido aquecido em banho-maria a 45°C. O tubo foi misturado por inversão rapidamente e plaqueado em placas de Petri com meio LB (4.2.5) pré-aquecidas a 37°C. Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas invertidas a 37°C por 8 a 12 horas ou até aparecerem placas de lise. Para o controle, foi utilizada uma suspensão de clones de um fago recombinante, previamente empacotado e titulado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE ESPOROS

Uma linhagem de *Guignardia citricarpa* isolada diretamente de lesão de Mancha Preta de Citros (PC7LB8) e uma linhagem de *Phyllosticta spinarum* (ECPR3) igualmente isolada de citros, porém de planta assintomática, foram selecionadas para avaliação do crescimento radial e produção de esporos. Conforme descrito no item 4.5, foram utilizados três meios de cultura (MC, V8 e BDA) e duas condições de luminosidade (12 e 24 horas de luz). A morfologia destas linhagens nestes meios de cultura está apresentada na Figura 1. Os resultados obtidos para cada tratamento estão apresentados a seguir. Os dados e os testes estatísticos estão apresentados no Apêndice 1.

FIGURA 1 - MORFOLOGIA DAS LINHAGENS PC7LB8 DE *G. citricarpa* E ECPR3 DE *P. spinarum* APÓS 14 DIAS DE CRESCIMENTO EM MC, V8 E BDA



FONTE: O autor

5.1.1 Crescimento radial

De acordo com a ANOVA há diferença significativa entre as linhagens ECPR3 de *P. spinarum* e PC7LB8 de *G. citricarpa*, entre os meios de cultura (MC, V8 e BDA) e também entre as duas condições de luminosidade (12h e 24h) para o crescimento radial. Não foram observadas diferenças significativas quanto às possíveis interações entre todos os fatores citados acima. Com um coeficiente de variação relativamente baixo (13%), as diferenças encontradas foram consideradas válidas. Nas Tabelas 5 e 6 estão apresentadas as médias das repetições de todos os tratamentos das linhagens ECPR3 de *P. spinarum* e PC7LB8 de *G. citricarpa*, respectivamente, assim como o resultado do Teste de Tukey, para as médias dos meios de cultura.

TABELA 5 - MÉDIAS DOS CRESCIMENTOS RADIAIS (cm) DA LINHAGEM ECPR3 DE *P. spinarum* EM TODOS OS TRATAMENTOS

MEIOS DE CULTURA	LUZ		MÉDIAS	Teste de Tukey
	12h	24h		
MC	7,5	6,6	7,1	a
V8	6,5	5,2	5,9	b
BDA	6,8	4,6	5,7	b
MÉDIAS	6,9	5,5		

Fonte: O autor

Nota: DMS = 0,74 (para as médias dos meios de cultura). Letras iguais indicam não haver diferenças entre as médias.

TABELA 6 - MÉDIAS DOS CRESCIMENTOS RADIAIS (cm) DA LINHAGEM PC7LB8 DE *G. citricarpa* EM TODOS OS TRATAMENTOS

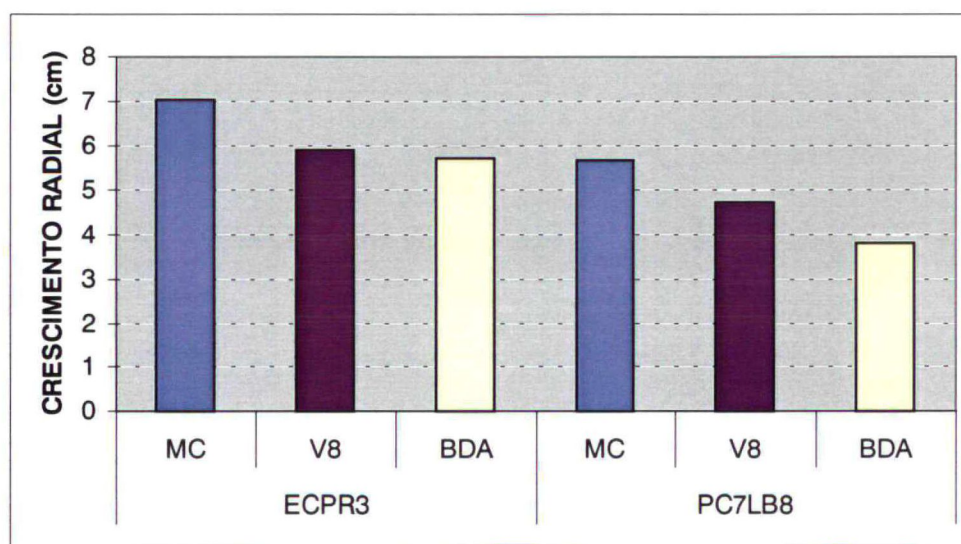
MEIOS DE CULTURA	LUZ		MÉDIAS	Teste de Tukey
	12h	24h		
MC	6,0	5,3	5,7	a
V8	5,0	4,5	4,8	b
BDA	4,2	3,4	3,8	c
MÉDIAS	5,1	4,4		

Fonte: O autor

Nota: DMS = 0,74 (para as médias dos meios de cultura). Letras iguais indicam não haver diferenças entre as médias.

O meio completo (MC) foi o que proporcionou o maior crescimento radial (quase 20% maior que o segundo melhor meio, o meio V8, para as duas linhagens) enquanto o meio BDA proporcionou o menor crescimento radial, conforme representado na Figura 2. Após o teste de Tukey, concluiu-se que o crescimento radial da linhagem PC7LB8 de *G. citricarpa* ocorre significativamente diferente em todos os meios testados e para a linhagem ECPR3 de *P. spinarum*, os meios BDA e V8 são estatisticamente iguais, porém ambos diferem significativamente do MC (Tabelas 5 e 6).

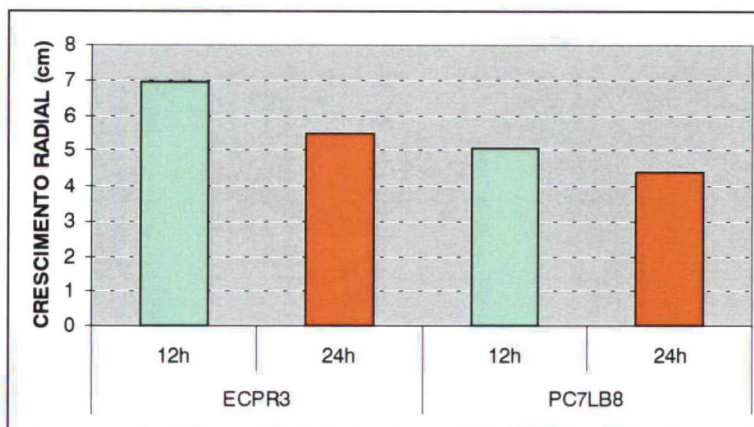
FIGURA 2 - MÉDIAS DOS CRESCIMENTOS RADIAIS DAS LINHAGENS ECPR3 DE *P. spinarum* e PC7LB8 DE *G. citricarpa* NOS DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, APÓS 14 DIAS



FONTE: O autor

A luminosidade influenciou significativamente no crescimento radial sendo que 12 horas de fotoperíodo foi o tratamento que proporcionou o maior diâmetro para as colônias (Figura 3). A linhagem ECPR3 de *P. spinarum* apresentou um diâmetro 26% maior com 12 horas de luz e a linhagem PC7LB8 de *G. citricarpa*, apresentou um diâmetro 14% maior na mesma condição.

FIGURA 3 - MÉDIAS DOS CRESCIMENTOS RADIAIS DAS LINHAGENS ECPR3 DE *P. spinarum* E PC7LB8 DE *G. citricarpa* NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE LUMINOSIDADE, APÓS 14 DIAS

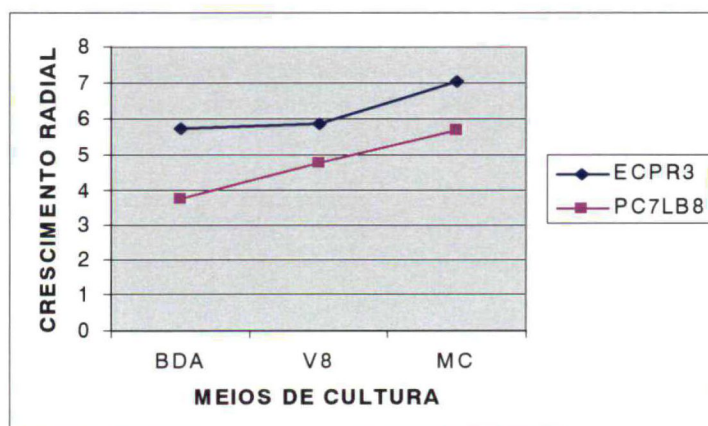


FONTE: O autor

A linhagem PC7LB8 de *G. citricarpa* apresentou sempre um crescimento radial menor que a linhagem endofítica de *P. spinarum*, que, em média, apresentou um diâmetro quase 31% maior (Figuras 2, 3 e 4). Este resultado reforça observações anteriores de que as linhagens patogênicas apresentam crescimento mais lento em meios de cultura (McONIE, 1964a e 1964b; BAAYEN et al., 2002).

A ausência de interação entre estas características nas duas espécies analisadas pode ser evidenciada na Figura 4.

FIGURA 4 – COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO RADIAL DAS LINHAGENS ECPR3 DE *P. spinarum* e PC7LB8 DE *G. citricarpa* EM BDA, V8 E MC, APÓS 14 DIAS



FONTE: O autor

5.1.2 Esporulação

De acordo com a ANOVA há diferença significativa na produção de esporos entre as linhagens ECPR3 de *P. spinarum* e PC7LB8 de *G. citricarpa* e também entre os meios de cultura utilizados. Também foi possível verificar que existe interação entre as linhagens destas espécies e os meios de cultura. Apesar do coeficiente de variação ter sido alto (45%), ainda foi possível detectar estas diferenças. As diferentes condições de luminosidade aparentemente não alteraram a esporulação ou não foi possível detectar um efeito para as diferentes condições de luminosidade neste experimento em função do valor elevado do c.v. (coeficiente de variação). Talvez em um novo experimento com maior número de repetições seja possível detectar alguma influência da luminosidade na produção de esporos. BRODRICK e RABIE (1970) encontraram uma correlação positiva entre luminosidade e produção de esporos tanto em meio de cultura como na fruta de *Citrus sinensis*. Os autores utilizaram três condições de luminosidade: escuro, fotoperíodo de 12 horas e 24 horas de luz. O número de esporos foi maior, quanto maior o tempo de exposição à luz tanto no meio de cultura quanto na fruta.

A linhagem ECPR3, de *P. spinarum*, apresentou melhor produção de esporos com o meio BDA que foi 37% superior ao V8, o segundo melhor meio. Porém, após o Teste de Tukey, verificou-se que não existe diferença significativa entre estes dois meios, mas ambos diferem do MC, que foi o pior meio para a produção de esporos para esta linhagem (Tabela 7 e Figura 5).

Para a linhagem PC7LB8 de *G. citricarpa* o melhor meio para esporulação foi o MC que se apresentou muito pouco superior ao meio BDA (13%). Apesar destes terem sido bem melhores que o meio V8 para a produção de esporos (o MC foi 190% melhor e BDA foi 156% melhor), após o teste de Tukey, verificou-se que não há diferença significativa entre estes meios para esta característica (Tabela 8 e Figura 5).

TABELA 7 - MÉDIAS DA ESPORULAÇÃO ($\times 10^6$) DA LINHAGEM ECPR3 DE *P. spinarum* EM TODOS OS MEIOS

MEIOS DE CULTURA	MÉDIAS	Teste de Tukey
BDA	4,21	a
V8	3,07	a
MC	0,83	b

Fonte: O autor

Nota: DMS = 1,3323. Letras iguais indicam não haver diferenças entre as médias.

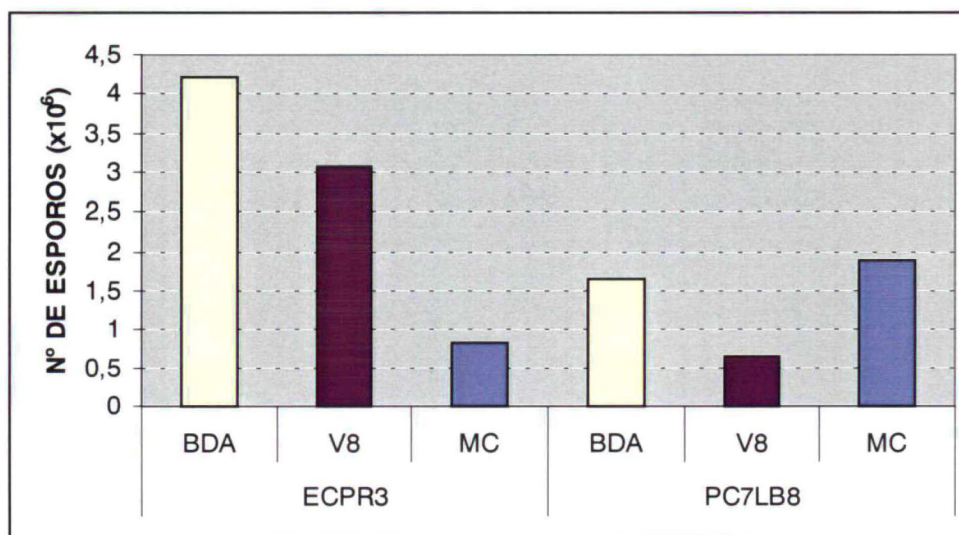
TABELA 8 - MÉDIAS DA ESPORULAÇÃO ($\times 10^6$) DA LINHAGEM PC7LB8 DE *G. citricarpa* EM TODOS OS MEIOS

MEIOS DE CULTURA	MÉDIAS	Teste de Tukey
MC	1,89	a
BDA	1,67	a
V8	0,65	a

Fonte: O autor

Nota: DMS = 1,3323. Letras iguais indicam não haver diferenças entre as médias.

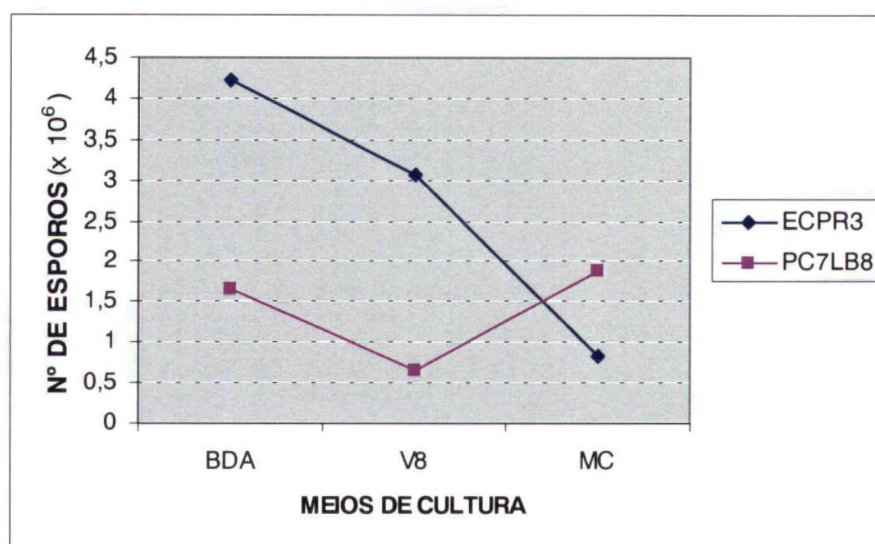
FIGURA 5 – MÉDIAS DAS TAXAS DE ESPORULAÇÃO DAS LINHAGENS ECPR3 DE *P. spinarum* E PC7LB8 DE *G. citricarpa* NOS DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, APÓS 14 DIAS



FONTE: O autor

A interação entre os meios de cultura e as linhagens analisadas pode ser evidenciada na Figura 6, pois no MC a linhagem PC7LB8 de *G. citricarpa* apresenta um comportamento diferente do observado para a linhagem ECPR3 de *P. spinarum*.

FIGURA 6 – COMPARAÇÃO DA TAXA DE ESPORULAÇÃO DAS LINHAGENS ECPR3 DE *P. spinarum* E PC7LB8 DE *G. citricarpa* EM BDA, V8 E MC, APÓS 14 DIAS



FONTE: O autor

Comparando-se os gráficos de crescimento radial e esporulação (Figuras 4 e 6) foi possível verificar uma possível relação entre o crescimento radial e a esporulação da linhagem ECPR3 de *P. spinarum*. Após o teste de correlação (Apêndice1), verificou-se que realmente existe uma correlação significativa e negativa entre estas características. Ou seja, quanto menor o diâmetro da colônia nos meios analisados, maior a produção de esporos. Considerando que os esporos são estruturas de resistência, pode-se explicar esta correlação, pois o meio de cultura no qual esta linhagem apresentou a maior produção de esporos é justamente o meio mais pobre em nutrientes (BDA). Em compensação, no meio mais rico em nutrientes, o MC, esta linhagem apresentou a pior produção de esporos e o melhor crescimento radial.

Para a linhagem PC7LB8 de *G. citricarpa*, a correlação observada não foi significativa e apresentou diferentes tendências quando estas características foram confrontadas com as diferentes condições de luminosidade ensaiadas. Com 24 horas de luz, a correlação foi negativa, seguindo a mesma tendência do observado para a linhagem de *P. spinarum*. Já para a condição de 12 horas de luminosidade a correlação foi positiva, sugerindo uma tendência oposta, de que quanto maior o diâmetro da colônia, maior a produção de esporos. Considerando que para esta linhagem os meios de cultura utilizados também não apresentaram uma diferença significativa para a produção de esporos, sugere-se um novo experimento com maior número de repetições para evidenciar alguma correlação entre estas características para esta linhagem.

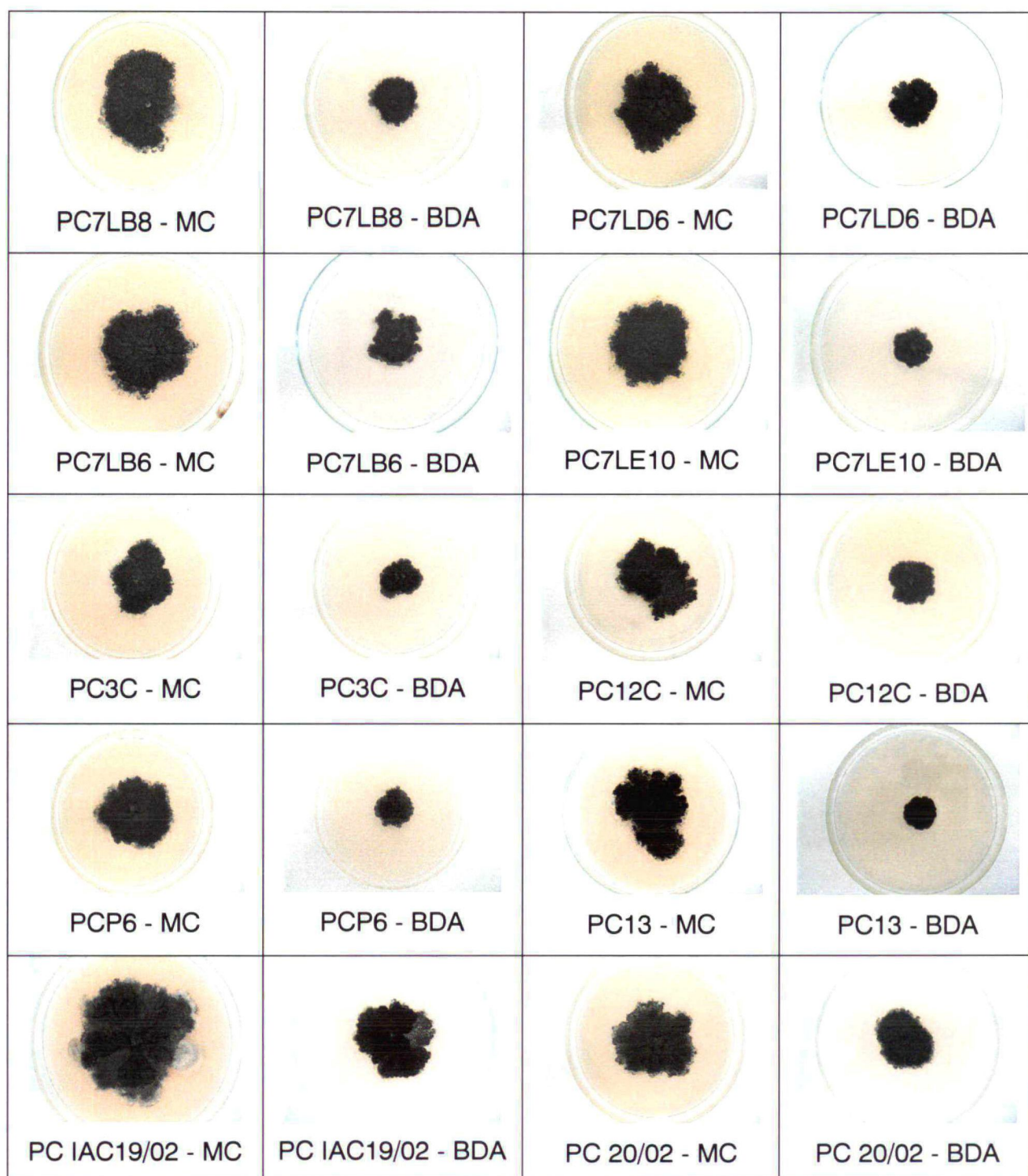
Com este estudo também foi possível evidenciar a diferença de comportamento para as linhagens PC7LB8 de *G. citricarpa* e ECPR3 de *P. spinarum*, pois tanto para o crescimento radial como para a produção de esporos, observou-se diferença significativa na análise de variância (ANOVA) entre elas. Também foi feita uma comparação das médias dos crescimentos radiais e esporulação destas duas linhagens nos meios de cultura utilizados e apenas para a produção de esporos no meio completo (MC) estas linhagens apresentaram médias estatisticamente iguais. Para todas as outras comparações, os desempenhos foram significativamente diferentes (Apêndice 1). Até recentemente considerava-se que estas duas linhagens poderiam pertencer a uma mesma espécie, porém dados de seqüenciamento de regiões ITS (STRINGARI, 2004) demonstraram que realmente elas pertencem a espécies diferentes.

A partir dos resultados obtidos, tomou-se como procedimento padrão o uso de meio completo (MC) sólido para produção de micélio e o uso de BDA para produção de esporos.

O meio à base de V8 é utilizado com frequência no cultivo e na caracterização de alguns fungos fitopatogênicos. APPIAH et al. (2003) utilizaram um meio à base de V8 para fazer uma extensa caracterização morfológica e morfométrica de 161 linhagens de *Phytophthora* isoladas de 17 países. Informações como morfologia da colônia e taxa de crescimento neste meio foram utilizadas para uma identificação preliminar de espécies deste fungo. Para as linhagens estudadas no presente trabalho, o meio V8 não apresentou o melhor resultado nem para crescimento radial

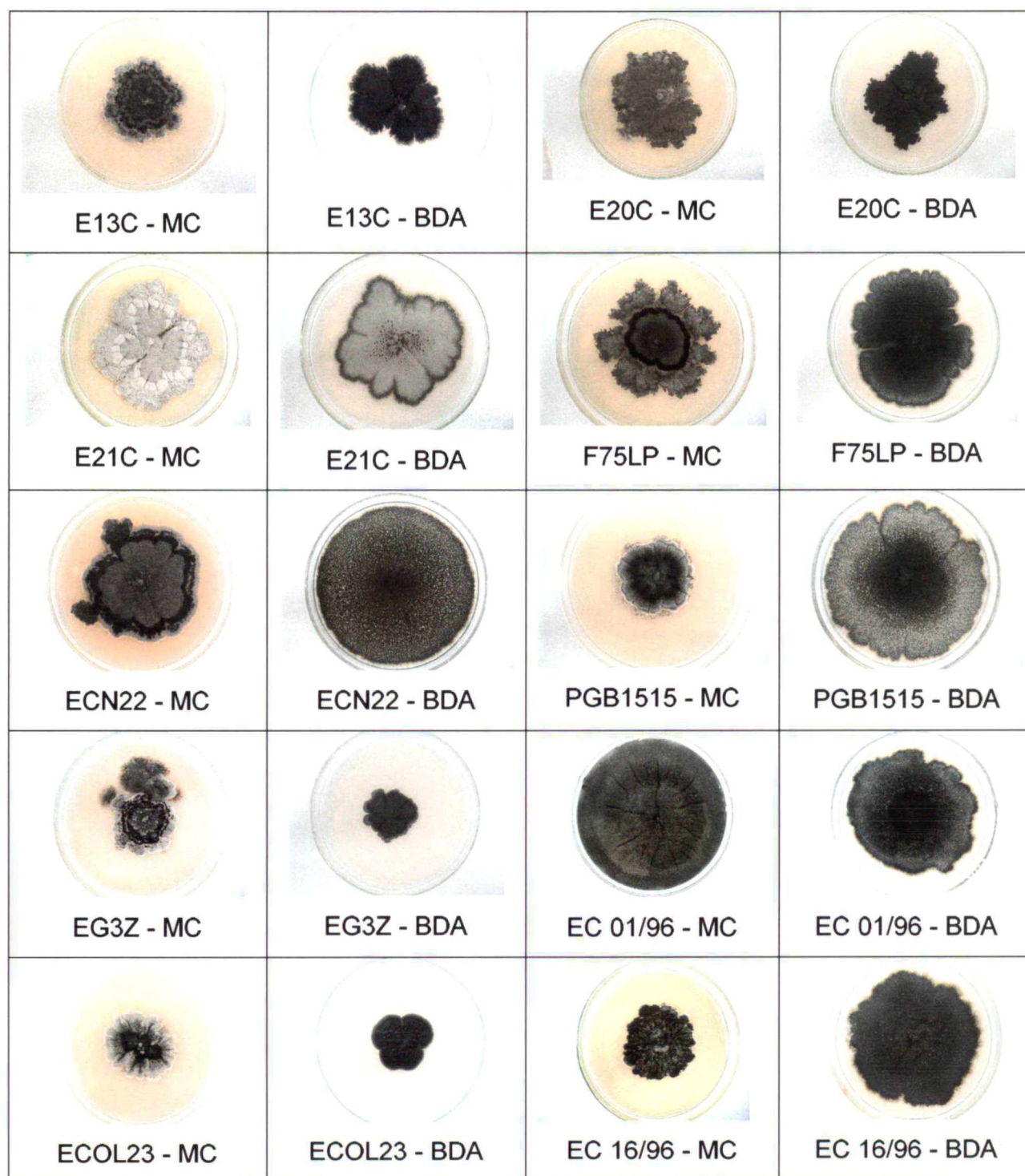
(o meio MC foi aproximadamente 20% melhor) e também não foi o melhor para produção de esporos. Apesar de ter sido melhor que o MC para a linhagem ECPR3, ainda o meio BDA foi superior. Desta forma, foram selecionados os meios MC e BDA para uma caracterização morfológica de 10 linhagens de *Guignardia citricarpa*, 10 linhagens de *G. mangiferae* e 5 linhagens de *Phyllosticta spinarum*, conforme está apresentado nas Figuras 7, 8 e 9, respectivamente.

FIGURA 7 - MORFOLOGIA DE COLÔNIAS DE *Guignardia citricarpa* EM MC E BDA, APÓS 14 DIAS DE CRESCIMENTO



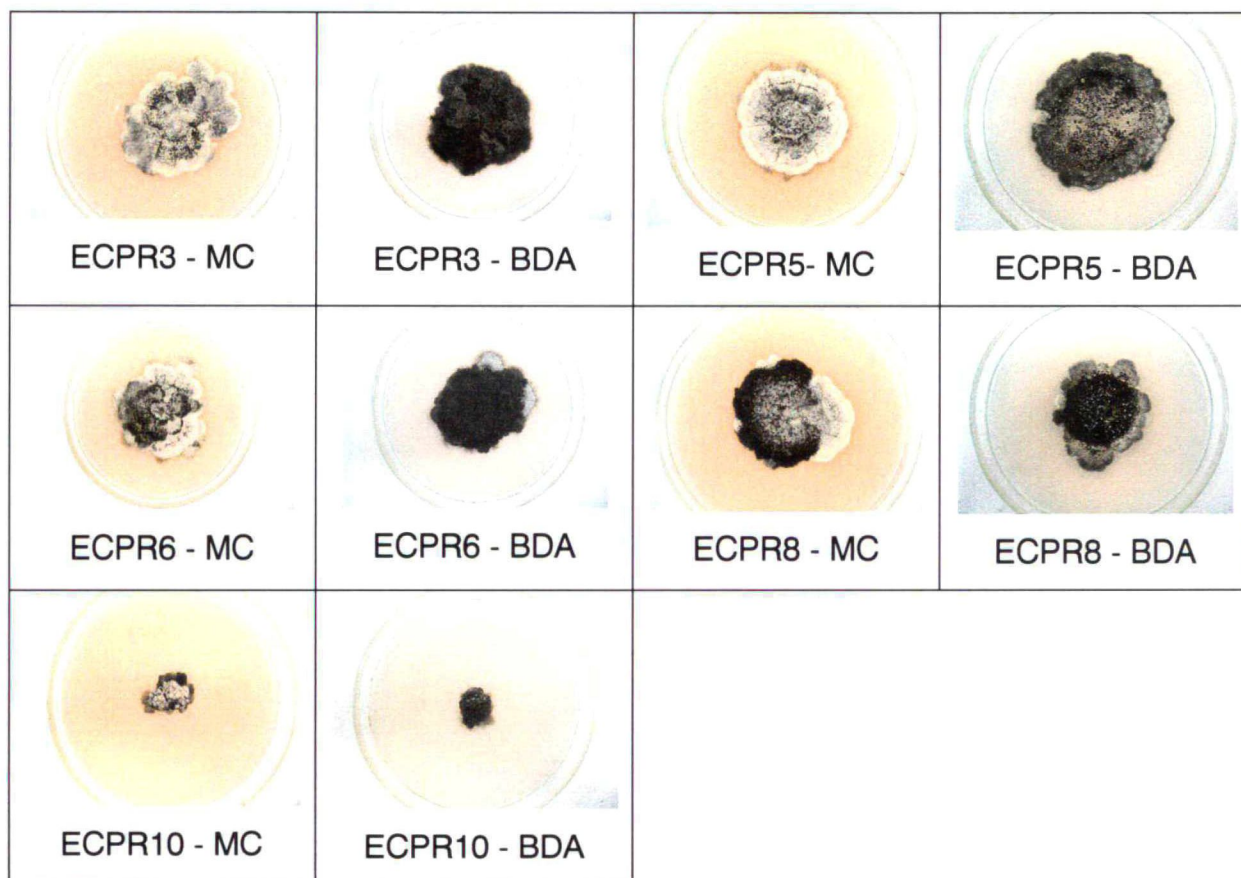
FONTE: O autor

FIGURA 8 - MORFOLOGIA DE COLÔNIAS DE *Guignardia mangiferae* EM MC E BDA, APÓS 14 DIAS DE CRESCIMENTO



FONTE: O autor

FIGURA 9 - MORFOLOGIA DE COLÔNIAS DE *Phyllosticta spinarum* EM MC E BDA, APÓS 14 DIAS DE CRESCIMENTO



FONTE: O autor

As linhagens de *Guignardia citricarpa*, apesar de terem sido isoladas em diferentes épocas e de origens geográfica diversas (Tabela 2), apresentaram padrão bem semelhante e constante tanto em MC como em BDA conforme pode ser observado na Figura 7. Em MC o crescimento radial foi sempre maior, e em BDA o crescimento radial é menor. Como fator comum a estas linhagens, está o fato de todas terem sido isoladas de citros apesar da origem geográfica bem distinta em alguns casos.

As linhagens de *Guignardia mangiferae* apresentaram uma grande diversidade morfológica nos meios MC e BDA, conforme pode ser observado na Figura 8. Em alguns casos (ECN22 e PGB1515) o crescimento radial foi muito maior no meio BDA do que no MC. Outras linhagens apresentaram crescimento radial semelhante nos dois meios. Estas linhagens foram isoladas de plantas de diferentes famílias, assintomáticas e de diversas localizações geográficas (Tabela 3). Uma

linhagem (PGB1515) foi isolada de lesão de goiabeira e inicialmente denominada de *G. pisidii*, porém dados de RAPD e seqüências ITS (STRINGARI, 2004) agruparam esta linhagem com isolados da espécie *G. mangiferae*.

As linhagens de *Phyllosticta spinarum* foram todas isoladas de citros, na mesma época e na mesma localidade. Estas apresentaram um padrão semelhante de crescimento radial nos meios BDA e MC (Figura 9), porém diferente entre elas. Especialmente a linhagem ECPR10, que apresenta um crescimento radial bem inferior às demais linhagens. Em relação à produção de melanina, também parece haver diferença na produção deste pigmento nestes meios. No meio BDA as colônias são mais escuras, ou seja, têm mais pigmento do que no MC. A produção de esporos destas linhagens sempre foi superior no meio BDA em comparação ao MC. Esta característica foi identificada apenas por observação do comportamento destas linhagens nestes meios, mas para a linhagem ECPR3, esta diferença foi estatisticamente significativa. Talvez este fato indique um comportamento comum a esta espécie em relação a estes meios.

Com base nestes resultados, pode-se sugerir que dados morfológicos obtidos a partir do crescimento destes fungos nestes meios de cultura podem ser utilizados como auxiliares na identificação de linhagens da espécie *G. citricarpa*, de forma que linhagens que cresçam rapidamente em BDA não devem pertencer à espécie *G. citricarpa*. BAAYEN et al. (2002) compararam a taxa de crescimento de *G. citricarpa* e *G. mangiferae* em quatro meios de cultura. Apenas em dois deles, o BDA e meio de cereja ("CHA – Cherry Decoction Agar") foram observadas diferenças significativas na taxa de crescimento destas duas espécies, sendo que a diferença foi muito mais acentuada no meio CHA. Em alguns casos, características como morfologia e taxa de crescimento podem ser muito úteis na identificação de fungos fitopatogênicos (APPIAH et al., 2003). Para outros fungos, porém estas informações podem ser irrelevantes ou mesmo resultar em classificações taxonômicas errôneas. Este é o caso da determinação de espécies biológicas no fungo *Pleurotus*. Dados morfológicos e de distribuição geográfica foram utilizados para a classificação de *P. cystidiosus* e *P. smithii*, porém CAPELARI e FUNGARO (2003), por meio de dados obtidos por RAPD, concluíram que estes fungos pertencem a uma mesma espécie.

5.2 SEQÜENCIAMENTO E DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

Marcadores moleculares foram selecionados a partir do perfil de bandas de linhagens de *G. mangiferae* e *G. citricarpa* com os oligonucleotídeos iniciadores OPX14 e OPX17 de RAPD por CHRISTO (2002). Um marcador foi selecionado a partir do perfil eletroforético de linhagens de *G. mangiferae*, e foi denominado 14E1, por ter sido identificado com o oligonucleotídeo iniciador OPX14. Outros dois foram selecionados a partir do padrão de bandas obtido para *G. citricarpa* com os oligonucleotídeos iniciadores OPX14 e OPX17, sendo denominados 14P3 e 17P3, respectivamente. As seqüências obtidas, apresentadas a seguir, foram submetidas ao banco de dados “GenBank”, com o programa BLAST e em alguns casos foram encontradas similaridades com seqüências de aminoácidos.

Para a seqüência de *G. mangiferae*, a 14E1, e para uma das seqüências de *G. citricarpa*, a 17P3, foram encontradas similaridades com seqüências de aminoácidos de *Aspergillus nidulans* e também *Neurospora crassa* (Blast x), fungo que teve seu genoma seqüenciado recentemente (GALAGAN et al., 2003) (Apêndice 2). A outra seqüência de *G. citricarpa* (14P3) não apresentou similaridade significativa com nenhuma seqüência de nucleotídeos nem de aminoácidos. Estes resultados serão discutidos a seguir.

Para cada seqüência consenso, foi desenhado um par de oligonucleotídeos iniciadores de forma que fosse possível uma amplificação conjunta (“multiplex”) para proporcionar uma identificação rápida e precisa das espécies de *G. citricarpa* e *G. mangiferae*. Desta forma, será possível um diagnóstico de plantas cítricas infectadas com *G. citricarpa* (fitopatogênico) ou com *G. mangiferae* (fungo endofítico de citros, porém que não causa a doença Mancha Preta de Citros).

Com base nos resultados do seqüenciamento, pode-se concluir que o fragmento clonado tem 575 nucleotídeos. Os oligonucleotídeos iniciadores desenhados a partir desta seqüência aparecem indicados por setas na própria seqüência e são eles:

GCF3: 5' CACGGACCTGTTCAACGACG 3'

GCR4: 5' GACTTTTTGCGCCTCTCAGCG 3'

A amplificação, a partir destes oligonucleotídeos iniciadores, deve gerar fragmentos de 515 pares de bases em linhagens de *G. citricarpa*.

Comparando-se esta seqüência com o banco de dados "GenBank", por meio do programa Blast, não foi obtida nenhuma similaridade significativa de nucleotídeos (Blast n) porém seqüências de aminoácidos possíveis (Blast x) apresentaram uma baixa homologia com uma proteína hipotética conservada de *Neurospora crassa* (Apêndice 2). Considerando os valores obtidos, acredita-se que esta similaridade não venha prejudicar o uso desta seqüência (17P3) como SCAR para *G. citricarpa*.

Já a similaridade encontrada para a seqüência 14E1 com proteínas hipotéticas principalmente de *Aspergillus nidulans* e também de *Neurospora crassa* talvez resulte na necessidade da identificação de novos marcadores para a espécie *G. mangiferae*. Apesar da ausência de similaridade na seqüência de nucleotídeos deste fragmento, deve-se considerar que *A. nidulans* e *N. crassa* são fungos taxonomicamente distante de *G. mangiferae*. A distinção entre *G. citricarpa* e *G. mangiferae* com este SCAR poderá ser prejudicada pela proximidade taxonômica destes fungos. A mutação que criou um sítio de homologia para o oligonucleotídeo iniciador OPX14 exclusivamente nesta região do genoma de *G. mangiferae* pode não refletir necessariamente em diferenças significativas em uma possível região homóloga no genoma de *G. citricarpa*.

Os oligonucleotídeos iniciadores desenhados para estas seqüências devem amplificar fragmentos de tamanhos bem distintos e foram desenhados tomando-se o cuidado de não haver complementação entre os próprios, para possibilitar uma utilização destes oligonucleotídeos iniciadores de uma forma conjunta ("multiplex"). Para linhagens de *G. mangiferae*, o fragmento amplificado deverá ter 708 pares de bases e para linhagens de *G. citricarpa*, existe a possibilidade de amplificar fragmentos de 515 pares de bases e também 162 pares de bases. Um par de oligonucleotídeos iniciadores desenhado anteriormente (BLANCO, 1999), que

amplifica fragmentos de aproximadamente 300 pares de bases, exclusivamente para linhagens de *G. citricarpa* também poderá ser utilizado com os oligonucleotídeos iniciadores desenhados neste trabalho. Com tamanhos de seqüências amplificadas bem diferentes, estes fragmentos serão facilmente identificados em eletroforese.

A rapidez e a eficácia do uso de SCARs ("Sequence Characterized Amplified Region") na identificação de fungos fitopatogênicos vem tornando esta técnica uma importante ferramenta no diagnóstico destes fungos. Com a utilização de SCARs para o fungo *Fusarium graminearum*, um importante patógeno de culturas com grande importância econômica como arroz, milho e trigo, foi possível uma rápida identificação deste fungo, e também estes marcadores foram utilizados para uma averiguação da distribuição geográfica de algumas linhagens deste fitopatógeno (CARTER et al., 2002).

KONSTANTINOVA et al. (2002) desenharam pares de oligonucleotídeos iniciadores específicos para a identificação de três espécies de *Alternaria*, patogênicas de cenoura, sendo que duas delas (*A. alternata* e *A. radicina*) apresentam um grande potencial toxigênico. Com estes oligonucleotídeos iniciadores, estes autores foram capazes de identificar cada espécie destes fungos também diretamente no hospedeiro.

Para a identificação de *G. citricarpa*, BONANTS et al. (2003) desenvolveram dois pares de oligonucleotídeos iniciadores a partir de seqüências ITS que apresentaram um desempenho melhor na identificação deste fitopatógeno do que técnicas convencionais. Estes autores relataram que foi possível identificar a presença de *G. citricarpa* em 60 a 70% de lesões de mancha preta em citros sem picnídio e em 90% das lesões com picnídio enquanto que o procedimento tradicional, que inclui o isolamento e o crescimento do fungo em meio de cultura, é eficaz no diagnóstico deste fungo em apenas 40 a 50% das lesões em citros e demora pelo menos cinco dias. Este par de oligonucleotídeos iniciadores também foi testado com outras espécies de *Guignardia* e *Phyllosticta* e resultou em ampliações também para as espécies *G. bidwellii* e *G. aesculi*. Neste mesmo trabalho, estes autores também desenharam um par de oligonucleotídeos iniciadores para a identificação de *G. mangiferae*, a partir de seqüências ITS, que também amplificou um fragmento de *Phyllosticta eugeniae*. Quando foi utilizada uma mistura

dos DNAs de *G. mangiferae* e *G. citricarpa* os oligonucleotídeos iniciadores respectivos amplificaram os fragmentos com o tamanho esperado.

A procura por um método eficaz na diferenciação destas espécies ocorre pela necessidade de certificação de mudas de citros e também de laranja, principalmente, e outras frutas cítricas que são exportadas. O método descrito recentemente e citado acima (BONANTS et al., 2003), foi mais rápido e confiável que o método tradicional de identificação destas espécies, porém, ainda este método não foi eficiente em todos os casos.

5.3 RNA DUPLA FITA E PARTÍCULAS SEMELHANTES A VÍRUS

5.3.1 Identificação de RNA dupla fita

A existência de RNA dupla fita em fungos vem sendo descrita com frequência na literatura. Pela primeira vez, linhagens de *Guignardia citricarpa*, *G. mangiferae* e *Phyllosticta spinarum* foram investigadas com o objetivo de identificação e caracterização destes elementos.

Foram investigadas 22 linhagens de *G. citricarpa*, 22 linhagens de *G. mangiferae* e 5 linhagens de *P. spinarum*. Dentre as 22 linhagens isoladas de lesão de citros (*G. citricarpa*) nove linhagens apresentaram uma única banda de RNAdf sempre do mesmo tamanho, que, com base no marcador de peso molecular λ HindIII, apresenta aproximadamente 3100 pares de base (Figura 10).

Das 22 linhagens de *G. mangiferae*, apenas uma linhagem apresentou duas bandas de RNAdf. Com base no marcador de peso molecular λ HindIII, de DNA, estas bandas tiveram seus tamanhos estimados em 2700pb e 1500pb (Figura 11).

Das cinco linhagens de *P. spinarum* analisadas, quatro apresentaram bandas de RNAdf, porém estas bandas são menores, variando entre 1800pb a 1000pb, mais intensas e o número de bandas foi de 2 a 3 (Figura 11). A intensidade destas bandas pode ser um indicativo de fragmentos diferentes com tamanho muito semelhante e que migraram juntos.

As linhagens das três espécies investigadas que apresentaram bandas extras de RNAdf estão relacionadas na Tabela 9.

Apesar das estimativas de tamanho de bandas de RNA dupla fita utilizando um marcador de peso molecular de DNA dupla fita serem menos precisas do que se fosse utilizado um marcador de RNA dupla fita, acredita-se a diferença do tamanho estimado para o tamanho correto deva ser pequena e que pela disponibilidade de marcadores de DNA, estes acabam sendo mais utilizados. Em vários trabalhos recentes as estimativas dos tamanhos destas bandas de RNA dupla fita foram feitas utilizando principalmente o λ HindIII como marcador de peso molecular (GIMENEZ-PECCI et al., 2002; IKEDA et al., 2004).

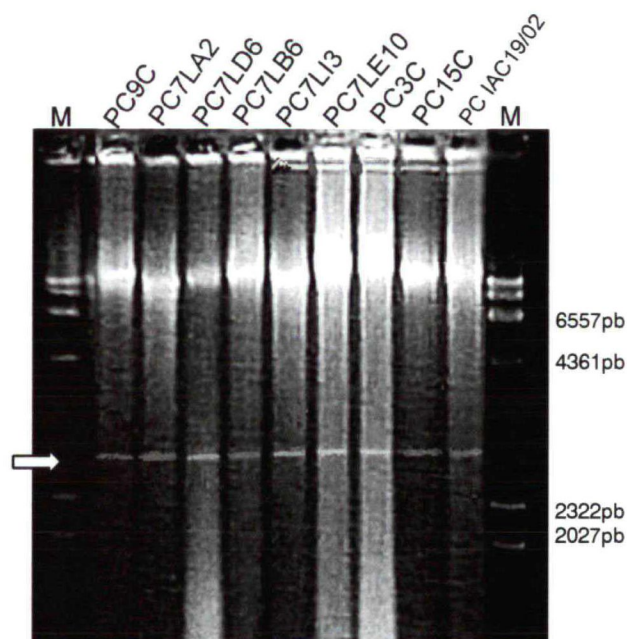
TABELA 9 - LINHAGENS QUE APRESENTARAM RNAdf

ESPÉCIE	LINHAGEM	NÚMERO DE BANDAS	ORIGEM
<i>G. citricarpa</i>	PC IAC19/02	1	SP - BRASIL
<i>G. citricarpa</i>	PC7LA2	1	SP - BRASIL
<i>G. citricarpa</i>	PC7LD6	1	SP - BRASIL
<i>G. citricarpa</i>	PC7LB6	1	SP - BRASIL
<i>G. citricarpa</i>	PC7LI3	1	SP - BRASIL
<i>G. citricarpa</i>	PC7LE10	1	SP - BRASIL
<i>G. citricarpa</i>	PC3C	1	ÁFRICA DO SUL
<i>G. citricarpa</i>	PC9C	1	ÁFRICA DO SUL
<i>G. citricarpa</i>	PC15C	1	JAPÃO
<i>G. mangiferae</i>	E1C	2	EUA
<i>P. spinarum</i>	ECPR3	2	PR - BRASIL
<i>P. spinarum</i>	ECPR5	2	PR - BRASIL
<i>P. spinarum</i>	ECPR8	3	PR - BRASIL
<i>P. spinarum</i>	ECPR10	2	PR - BRASIL

Fonte: O autor

Uma classificação preliminar destes micovírus pode ser feita com base no número de bandas que compõem seu genoma. Por apresentarem apenas uma banda, as nove linhagens de *G. citricarpa* devem estar infectadas com vírus da família Totiviridae (MERTENS, 2004). A confirmação se estas linhagens infectadas estão com o mesmo tipo de vírus e se realmente estes são da família Totiviridae será possível por meio do seqüenciamento do cDNA destes RNAdf, o que deverá ser feito como continuidade desta investigação. Linhagens de diversas origens geográficas como a PC9C (África do Sul), PC15C (Japão) e várias aqui do Brasil apresentaram a mesma banda de RNAdf. Com base neste fato, sugere-se que se realmente for o mesmo vírus infectando estas linhagens, este fungo deve ter uma relação evolutiva muito antiga com este vírus. Já RONG et al. (2001), relataram diferenças no padrão de bandas de RNAdf de linhagens de *Discula destructiva* também isoladas de locais geograficamente bastante distantes e sugerem que a diversidade destes RNAdf é gerada rapidamente em *D. destructiva*.

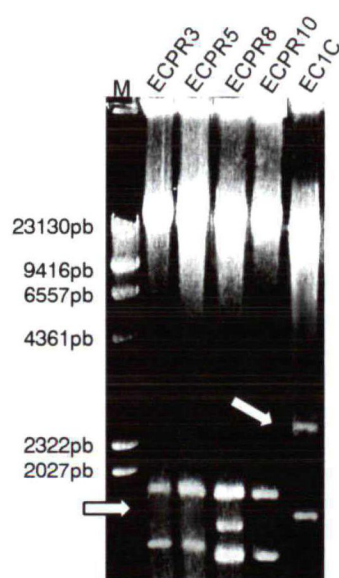
FIGURA 10 – ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS DE LINHAGENS DE *G. citricarpa* QUE APRESENTARAM BANDAS DE RNAdf



Fonte: O autor

Notas: M = marcador de peso molecular, DNA do fago λ clivado com *Hind*III. Seta = bandas de RNAdf.

FIGURA 11 – ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS DE LINHAGENS DE *P. spinarum* e *G. mangiferae* QUE APRESENTARAM BANDAS DE RNAdf



Fonte: O autor

Notas: M = marcador de peso molecular, DNA do fago λ clivado com *Hind*III. Setas = bandas de RNAdf. LINHAGENS DE *P. spinarum* = ECPR3, ECPR5, ECPR8 e ECPR10. LINHAGEM DE *G. mangiferae* = EC1C.

A única linhagem de *G. mangiferae* identificada com RNAdf (E1C) deve estar infectada com um vírus da família Partitiviridae, que possui genoma fragmentado em duas moléculas de RNAdf (MERTENS, 2004) (Figura 11). Uma hipótese de dupla infecção por vírus da família Totiviridae não pode ser descartada antes do seqüenciamento destes fragmentos ou da sua caracterização por hibridação. OSAKI et al. (2004) confirmaram a existência de uma co-infecção por vírus no fungo *Helicobasidium mompa*.

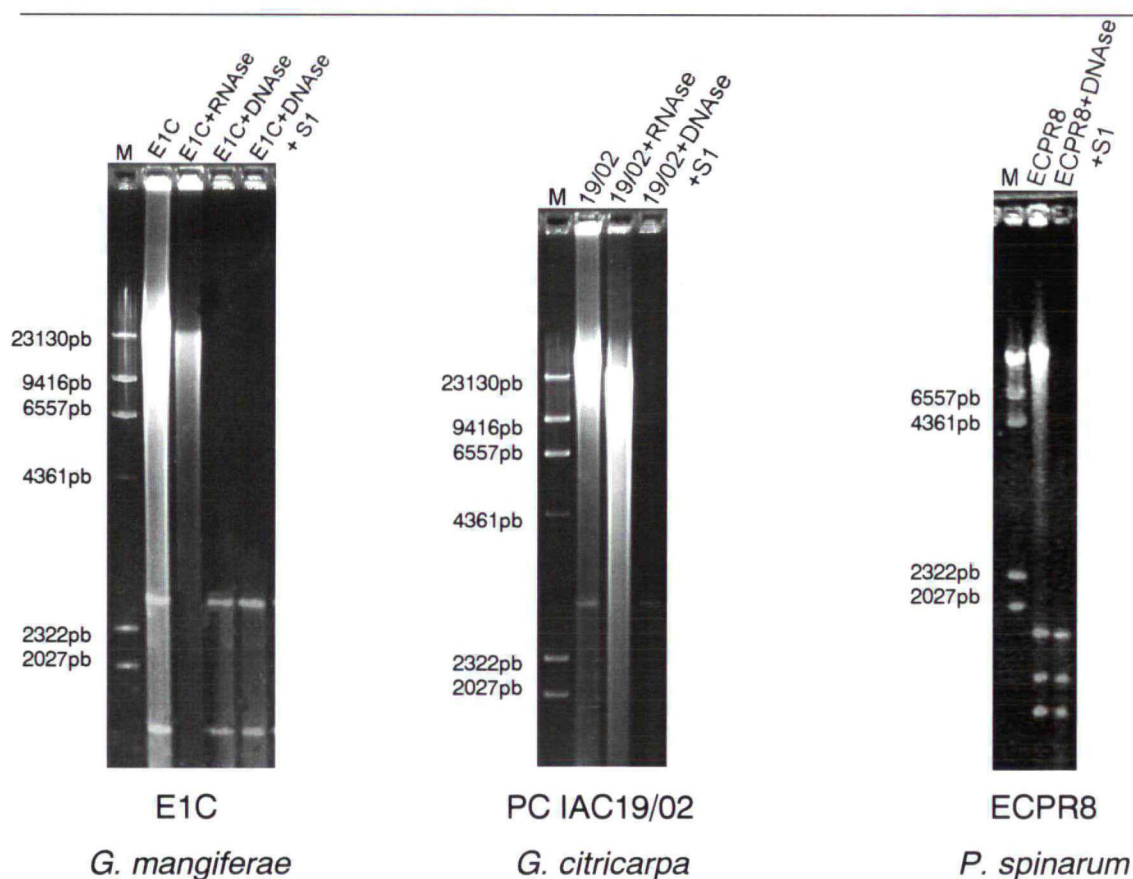
Com relação às bandas encontradas nas linhagens de *Phyllosticta spinarum*, o padrão observado é bem diferente do encontrado para as outras espécies. A grande densidade das bandas pode ser um indicativo da presença de mais de um fragmento de RNAdf com tamanho muito similar. Com um número desconhecido de fragmentos, poder-se-ia considerar até a possibilidade da infecção ser por um vírus da família Reoviridae, que apresenta genoma fragmentado em 10 a 12 segmentos. Porém, dados obtidos por MET, apresentados a seguir, invalidaram esta hipótese, pois as partículas semelhantes a vírus teriam que ser maiores do que o observado se a infecção fosse ocasionada por um vírus da família Reoviridae (partículas com 70 a 90 nm), conforme citado por MERTENS (2004). Desta forma, considera-se mais provável uma infecção por um vírus da família Partitiviridae (dois segmentos) ou da família Chrysoviridae (três a quatro segmentos) nas linhagens infectadas de *P. spinarum*. Estas duas famílias, Partitiviridae e Chrysoviridae, têm muita afinidade e até recentemente eram consideradas como uma única família, a Partitiviridae, sendo os genomas do gênero *Partitivirus* com dois segmentos e do gênero *Chrysovirus* com três segmentos (BATTEN et al., 2000). Da mesma forma que o apresentado para *G. mangiferae*, a hipótese de infecção múltipla também não pode ser descartada neste caso.

Os resultados obtidos em relação ao padrão de RNA dupla fita encontrado em cada uma destas espécies pode indicar que talvez estes vírus tenham algum tipo de especificidade em relação ao seu hospedeiro, principalmente para *P. spinarum* e *G. citricarpa*.

Para a confirmação da presença destes RNAdf, várias amostras tiveram seus ácidos nucléicos extraídos várias vezes (duas a quatro), e em todas as ocasiões, as mesmas bandas foram observadas. A manutenção destes elementos nestas linhagens deve realmente ter alguma importância para os fungos infectados, pois

algumas destas linhagens são mantidas há mais de oito anos em laboratório e ainda mantêm estes elementos. Algumas linhagens tiveram seus ácidos nucléicos tratados com DNase, RNase e Nuclease S1 para a confirmação da natureza destas bandas (Figura 12). Também, algumas linhagens que não apresentaram bandas de RNA dupla fita, tiveram seus ácidos nucléicos extraídos mais vezes e analisados em gel de agarose, para confirmar a ausência destas bandas.

FIGURA 12 – ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS DE *G. mangiferae*, *G. citricarpa* E DE *P. spinarum* TRATADOS COM RNase, DNase E NUCLEASE S1



FONTE: O autor

Nota: M = marcador de peso molecular, DNA do fago λ clivado com *HindIII*.

Semelhante ao observado por ZABALGOGUEAZCOA et al. (1998) no fungo endofítico *Epichloë festucae* e por PAPP et al. (2001) no fungo *Rhizopus*, as linhagens de *G. citricarpa* com e sem os vírus parecem não apresentar diferenças morfológicas em relação ao aspecto destas colônias em diferentes meios de cultura, conforme pode ser observado em algumas linhagens apresentadas na Figura 7.

POSSIEDE (2004) fez uma caracterização morfométrica de dez linhagens de *G. citricarpa*. Destas dez linhagens, também utilizadas neste trabalho, constatou-se que cinco pertenciam ao grupo de linhagens com RNAdf e cinco não apresentavam estes elementos. Os dados obtidos por POSSIEDE (2004) foram agrupados com base na presença e ausência de RNAdf e os valores obtidos foram comparados. Os dados estão apresentados na Tabela 10.

TABELA 10 – DADOS MORFOMÉTRICOS DE LINHAGENS DE *G. citricarpa* COM E SEM RNAdf

Linhagens com RNAdf	Diâmetro (cm) das colônias em MC		Dimensões (µm) das estruturas de reprodução		Nº de esporos de colônias em MC	
	15 dias	30 dias	conídios	espermácios	15 dias	30 dias
PC7LD6	3,5	4,6	5,9 x 10,1	2,3 x 5,4	2,4x10 ⁴	3,6x10 ⁴
PC7LB6	3,0	3,8	4,6 x 8,3	1,8 x 5,6	3,7x10 ⁴	5,1x10 ⁴
PC7LE10	3,5	4,2	5,9 x 10,2	2,0 x 6,2	1,8x10 ⁴	3,3x10 ⁴
PC7LA2	2,9	3,5	5,9 x 9,0	1,7 x 5,9	0,7x10 ⁴	0,1x10 ⁴
PC3C	3,6	4,6	5,9 x 12,0	2,0 x 6,7	2,2x10 ⁴	4,9x10 ⁴
MÉDIAS	3,3	4,14	5,64 x 9,92	1,96 x 5,96	2,16x10⁴	3,4x10⁴
Linhagens sem RNAdf						
PC7LB8	3,9	4,4	5,4 x 9,17	1,9 x 6,2	2,9x10 ⁴	1,5x10 ⁴
PC6C	3,8	4,9	5,8 x 9,6	1,9 x 5,8	0,3x10 ⁴	0,8x10 ⁴
PC12C	3,6	4,2	5,7 x 10,4	1,9 x 6,5	0,5x10 ⁴	0,9x10 ⁴
PCP6	2,9	3,1	5,7 x 8,8	1,8 x 6,1	1,2x10 ⁴	0,9x10 ⁴
PC13/96	2,6	3,6	6,1 x 10,1	1,9 x 6,3	1,0x10 ⁴	0,5x10 ⁴
MÉDIAS	3,36	4,04	5,74 x 9,61	1,88 x 6,18	1,18x10⁴	0,92x10⁴

FONTE: Adaptado de POSSIEDE, 2004

A média da taxa de produção de esporos do grupo de linhagens com RNAdf foi maior com 15 e 30 dias de cultivo destas linhagens em MC. Com base neste comparativo, este estudo deverá ser refeito com todas as linhagens de *G. citricarpa* e também, para a confirmação se estes elementos contribuem favoravelmente com a produção de esporos neste fungo, linhagens curadas do vírus também deverão ser avaliadas. Ainda para assegurar a influência destes elementos, a mesma fonte de inóculo deverá ser utilizada para repiques com a finalidade de avaliação destas características morfológicas e também para a produção do micélio de onde serão extraídos os ácidos nucléicos nos quais serão investigadas as presenças destes elementos.

PUNJA (1994) verificou que a presença de múltiplos elementos de RNAdf no fungo *Chalara elegans* estava associada com um aumento na esporulação, alteração da morfologia da colônia e redução no crescimento e na patogenicidade. AHN e LEE (2001), em testes de cura de RNA dupla fita em *Nectria radicola*, verificaram que um elemento de RNA dupla fita de 6,0 kb está associado com altos níveis de virulência, esporulação e pigmentação, sugerindo que este RNAdf é um regulador positivo da virulência neste fungo.

Vários trabalhos associam a presença de RNA dupla fita à diminuição da patogenicidade em alguns fungos fitopatogênicos e também em fungos entomopatogênicos (DALZOTO, 2004). Linhagens de *G. citricarpa* com e sem RNA dupla fita devem ser avaliadas em relação à patogenicidade e, como uma forma de verificar a influência destes vírus na patogenicidade deste fungo, uma linhagem deverá ser curada do vírus e o seu potencial patogênico comparado com a linhagem infectada. A cura também deverá ser feita em linhagens de *P. spinarum*, e na linhagem de *G. mangiferae* para uma avaliação da influência destes RNAs dupla fita na morfologia destes fungos. Uma das formas mais eficientes de se curar um fungo de vírus é a que utiliza sucessivos repiques em meio de cultura com ciclohexamida, um inibidor de síntese de RNA, (FULBRIGHT, 1984; AZEVEDO et al., 2000; DALZOTO, 2004) e este deverá ser o método utilizado na seqüência deste trabalho.

5.3.2 Partículas semelhantes a vírus (VLPs)

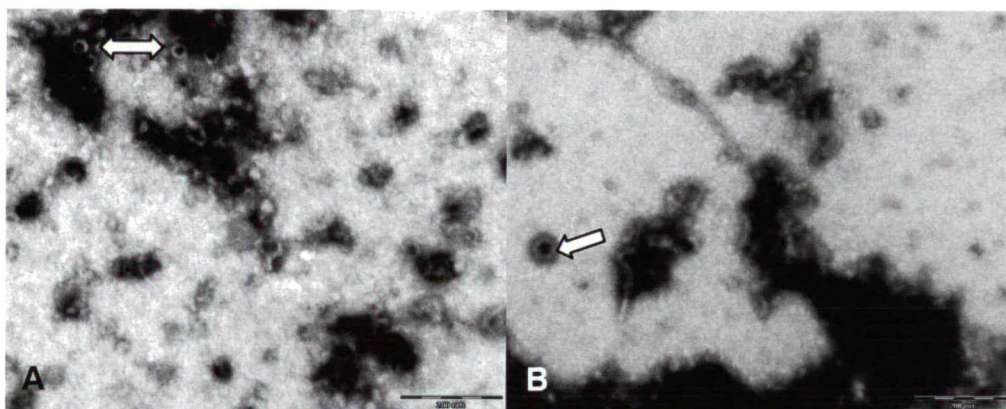
A presença de bandas correspondentes à RNA dupla fita, possibilita a existência de uma infecção por micovírus, fato que levou à investigação da presença de partículas semelhantes a vírus ou VLPs (“Virus-Like Particles”) em *G. citricarpa* e *P. spinarum* por microscopia eletrônica de transmissão.

Tanto para a linhagem de *G. citricarpa*, PC IAC19/02 como para a linhagem de *P. spinarum*, ECPR8, foram identificadas partículas semelhantes a vírus.

As VLPs da linhagem de *P. spinarum* (ECPR8) apresentaram um tamanho aproximado de 30 nm de diâmetro e o número de partículas visualizadas foi muito grande (Figura 13A). As partículas semelhantes a vírus identificadas na linhagem PC IAC19/02, de *G. citricarpa*, apresentaram um tamanho aproximado de 40 nm de diâmetro e estavam presentes em menor número (Figura 13B) quando comparadas com o número de partículas visualizadas para linhagem ECPR8 de *P. spinarum*. Os tamanhos das partículas semelhantes a vírus observadas por MET, sustentam as hipóteses destes fungos estarem infectados com vírus das famílias Totiviridae (*G. citricarpa*) e Partitiviridae e/ou Chrysoviridae (*P. spinarum*).

VLPs de tamanhos entre 30 a 50 nm vêm sendo identificadas em vários fungos. HUSNT, LATTERELL e ROSSI (1986) encontraram VLPs de 35 nm em *Pyricularia oryzae*. Já em *Fusarium solani*, NOGAWA et al. (1996) identificaram VLPs de 30 nm de diâmetro. Partículas semelhantes a vírus maiores foram observadas por ZABALGOGEAZCOA et al. (1998) em *Epichloë festucae*. Neste fungo, as VLPs apresentaram diâmetro de aproximadamente 50 nm.

FIGURA 13 – PARTÍCULAS SEMELHANTES A VÍRUS DAS LINHAGENS ECPR8 DE *Phyllosticta spinarum* E PC IAC19/02 DE *Guignardia citricarpa*



FONTE: O autor

Notas: **A** - linhagem ECPR8 de *Phyllosticta spinarum* e **B** – linhagem PC IAC19/02 de *Guignardia citricarpa*. Setas indicam as partículas semelhantes a vírus. Barra à direita corresponde a 200 nm. Aumento de 40.000x.

5.3.3 Compatibilidade

Vários mecanismos de transmissão de partículas semelhantes a vírus ou mesmo de RNA dupla fita vêm sendo estudados. Mecanismos naturais de transmissão ocorrem no ciclo sexual, com linhagens vegetativamente compatíveis (McCABE; PFEIFFER; VAN ALFEN, 1999) ou ainda por fusão de hifas (CHU et al., 2002). IKEDA et al. (2004) apresentam uma discussão a respeito das formas de transmissão das partículas virais e consideram até a possibilidade de interações com organismos de solo que serviriam como vetores destas partículas, acelerando um processo de transmissão horizontal.

Formas artificiais de transmissão destes vírus também vêm sendo utilizadas, como por meio de fusão de protoplastos (PFEIFFER et al., 2001), eletroporação de esferoplastos (MOLELEKI et al., 2003) e até biolística (SASAKI et al., 2002). Estas duas últimas técnicas utilizam o cDNA destes vírus para a transformação.

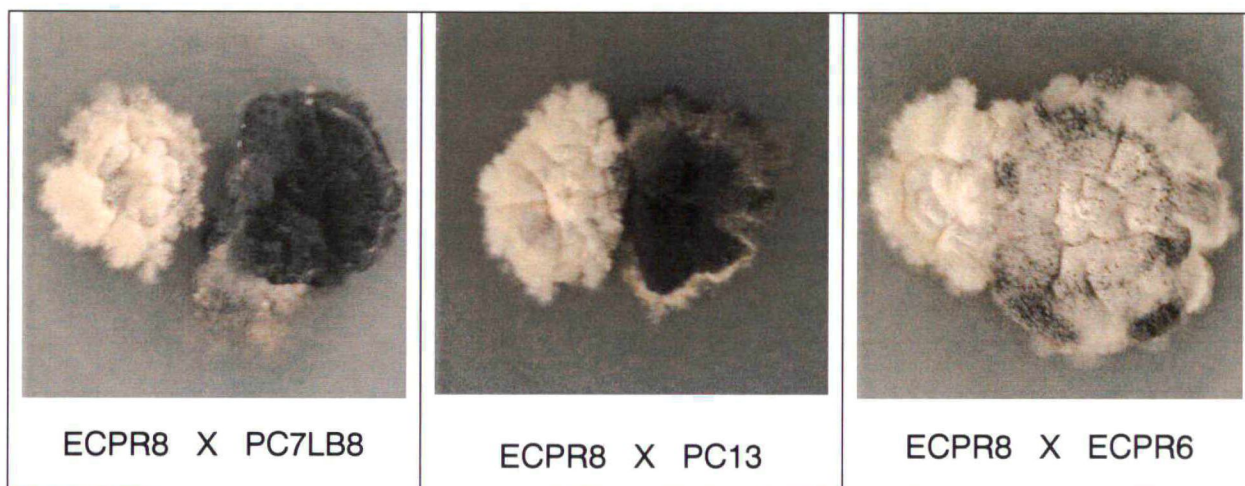
Neste trabalho foi feito um preliminar ensaio de compatibilidade entre a linhagem ECPR8 de *P. spinarum* e três outras linhagens, duas de *G. citricarpa*

(PC7LB8 e PC 13) e outra de *P. spinarum* (ECPR6), com o objetivo de verificar possíveis formas de transferência de partículas virais.

Conforme pode ser observado na Figura 14, após 14 dias de crescimento, as linhagens de ECPR8 (*P. spinarum*) e PC7LB8 (*G. citricarpa*) crescem para os lados, mas não entram em contato. Existe, aparentemente, um forte antagonismo entre elas. Com as linhagens ECPR8 e PC13 (também de *G. citricarpa*) foi observado um comportamento semelhante, porém menos evidente. Deve haver um sutil antagonismo entre estas linhagens. Com estes resultados, pode-se sugerir que existe pouca probabilidade de transferência destes elementos entre estes fungos por fusão de células, conforme descrito por McCABE; PFEIFFER e VAN ALFEN (1999). Já as linhagens de *P. spinarum* (ECPR8 e ECPR6) parecem não sofrer nenhum tipo de antagonismo. Este fato, talvez explique os resultados obtidos em relação à existência de praticamente o mesmo padrão de bandas de RNAdf para linhagens desta espécie, sugerindo a existência de um sistema de transferência natural destes elementos entre estas linhagens, que foram isoladas do mesmo local e na mesma época. Para que isto ocorra, deve existir algum mecanismo de recombinação neste fungo que permita a fusão de hifas. Mesmo que a fase sexuada ainda não tenha sido observada *in vitro* (STRINGARI, 2004), esta pode ocorrer na natureza. Outros mecanismos de recombinação podem, potencialmente, ocorrer em fungos filamentosos além do ciclo sexual, como o ciclo parassexual, a paramiose e também mecanismos ainda pouco conhecidos. Recentemente DALZOTO et al. (2003) sugerem a existência de formas alternativas de recombinação em *Beauveria bassiana*.

A dificuldade de observação da fase sexuada nas linhagens de *P. spinarum* também pode estar associada ao tipo de RNAdf que estas linhagens possuem. Após transferência por meio de eletroporação do cDNA do vírus DaRV para o fungo *Diaporthe perijuncta*, MOLELEKI et al. (2003) observaram que este fungo perdeu a capacidade de produzir esporos da fase sexuada (ascósporos).

FIGURA 14 - COMPATIBILIDADE DE *P. spinarum* E *G. citricarpa* APÓS 14 DIAS DE CRESCIMENTO EM MC



FONTE: O autor

Apesar do ensaio de compatibilidade ter sido feito com o objetivo de identificar possíveis formas de transferência de RNA dupla fita entre estes fungos, os resultados obtidos em relação ao antagonismo observado em meio de cultura entre *P. spinarum* e *G. citricarpa*, abriram a possibilidade de se avaliar o potencial de *P. spinarum* como agente de controle biológico de *G. citricarpa*. Testes mais significativos deverão ser feitos *in vitro* e também *in vivo* para confirmar esta possibilidade. AZEVEDO et al. (2002) ressaltam a necessidade de diminuição do uso de agroquímicos, em especial os que causam danos ao meio ambiente, às comunidades microbiológicas e ao homem, desta forma, valorizando estratégias de controle biológico de pragas e de doenças de inúmeras espécies cultivadas. O uso de fungos do gênero *Phyllosticta* como agente de controle biológico já foi considerado contra insetos (PETRINI; PETRINI; LAFLAMME, 1989) e algumas toxinas isoladas deste fungo foram identificadas e testadas com sucesso contra uma larva parasita de pinheiros (CALHOUN et al., 1992).

Tradicionalmente, os microrganismos mais utilizados no controle biológico de fungos são principalmente bactérias e também algumas espécies de *Trichoderma* (GUTTERSON, 1990). No Brasil, o fungo *Trichoderma* vem sendo utilizado no controle do fungo *Crinipellis pernicioso*, agente causal da vassoura-de-bruxa (AZEVEDO et al., 2002).

O controle biológico de patógenos por microrganismos endofíticos do mesmo hospedeiro deve ser considerado, pois estes apresentam como vantagem a capacidade de colonização do hospedeiro. ARAÚJO et al. (2002) consideraram a possibilidade de controle biológico da bactéria *Xylella fastidiosa*, causadora da Clorose Variegada de Citros (CVC), pela bactéria *Curtobacterium flaccumfaciens*, pois esta só foi isolada com grande freqüência em plantas sem sintomas desta doença.

Alguns fungos endofíticos já tiveram seu potencial como antagonistas testados como o caso do fungo *Acremonium coenophialum*. O filtrado da cultura de *A. coenophialum* foi capaz de inibir o crescimento *in vitro* dos fungos *Nigrospora sphaerica*, *Periconia sorghina* e *Rhizoctonia cerealis*, patógenos de gramíneas (WHITE JR.; COLE, 1985). Mais recentemente, CASSIOLATO e SOUZA (2000) desenvolveram um modelo de controle biológico de *Rhizoctonia solani* por isolados de *Rhizoctonia* spp não-patogênicos ou hipovirulentos, porém estas linhagens apresentaram como desvantagem um crescimento mais lento que o patógeno. Ao contrário do observado por estes autores com *Rhizoctonia*, ainda algumas linhagens de *P. spinarum* apresentam um crescimento, pelo menos em meio de cultura, mais rápido que o agente causal da MPC.

Linhagens de *G. mangiferae* provavelmente não apresentam antagonismos em relação à *G. citricarpa*. *In vivo*, tem sido observado o isolamento de *G. mangiferae* simultaneamente com *G. citricarpa*, em lesões de citros. Este é o caso das linhagens EC01/96, EC16/96 (CHRISTO, 2002) e também EC196/01 (presente trabalho), que foram inicialmente isoladas em lesões de Mancha Preta de Citros (MPC) e posteriormente, por meio de características morfológicas e dados de RAPD, foram identificadas como *G. mangiferae*. Outros autores também relataram a co-existência de *G. mangiferae* e *G. citricarpa* em lesões de citros (BONANTS et al., 2003).

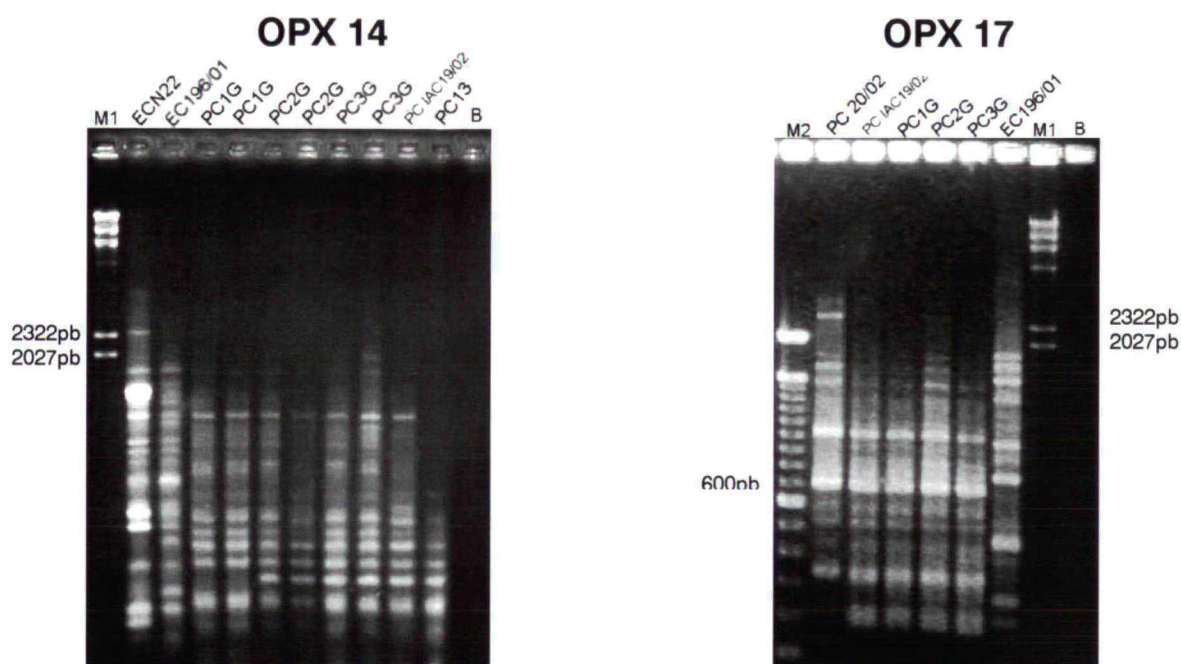
5.4 BIBLIOTECA GENÔMICA

5.4.1 Seleção da linhagem de *G. citricarpa*

Para a construção da biblioteca genômica, foi necessário utilizar uma linhagem de *G. citricarpa* recém isolada de lesão, para prevenir uma possível perda de material genético devido a sucessivos repiques em laboratório. Seis linhagens recém isoladas foram analisadas por RAPDs com oligonucleotídeos iniciadores que possibilitassem a confirmação da espécie *G. citricarpa*. Após várias amplificações por RAPD concluiu-se que cinco linhagens pertenciam realmente à espécie *G. citricarpa*, pois compartilhavam bandas características com linhagens comprovadamente desta espécie (Figura 15). Somente uma linhagem, a EC196/01, apesar de ter sido isolada de lesão, apresentou um perfil de bandas diferente, sendo identificada por características morfológicas e pelo padrão de bandas como pertencente à espécie *G. mangiferae*. Também esta linhagem que originalmente foi denominada PC196/01 foi renomeada para EC196/01.

Optou-se pela linhagem PC IAC19/02 para a construção da biblioteca genômica. Ainda para confirmar que a linhagem PC IAC19/02 é realmente *G. citricarpa*, foi feita uma identificação por SCAR. Este SCAR utiliza um par de oligonucleotídeos iniciadores específico, que amplifica uma banda de aproximadamente 300pb somente em linhagens deste fungo (Figura 16). Os oligonucleotídeos iniciadores CGP1 e CGP2 foram desenhados por BLANCO (1999) a partir de uma sequência de DNA de um fragmento de RAPD exclusivo de linhagens de *G. citricarpa*. CHRISTO (2002) testou e comprovou a eficiência destes oligonucleotídeos iniciadores em 42 linhagens patogênicas e endofíticas de *Guignardia* spp originárias de diversos países (Brasil, Argentina, Costa Rica, EUA, África do Sul, Tailândia, México e Japão) e isoladas em diferentes épocas (1996 a 2001).

FIGURA 15 - PADRÃO DE BANDAS DE RAPD DE LINHAGENS DE *G. citricarpa* E *G. mangiferae*



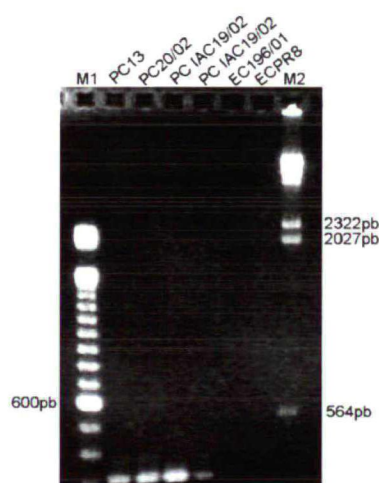
FONTE: O autor

M₁: marcador de peso molecular, DNA do fago lambda clivado com *Hind*III. M₂: marcador de peso molecular DNA ladder 100pb. B: controle sem DNA.

LINHAGENS DE *G. mangiferae*: ECN22, EC196/01.

LINHAGENS DE *G. citricarpa*: PC1G, PC2G, PC3G, PC IAC19/02, PC13, PC20/02.

FIGURA 16 – AMPLIFICAÇÃO DE *G. citricarpa*, *G. mangiferae* e *P. spinarum* COM OS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES GCP1 E GCP2



FONTE: O autor

M₁: marcador de peso molecular (*ladder*) de 100pb. M₂: marcador de peso molecular lambda *Hind*III.

LINHAGENS DE *G. citricarpa*: PC13 (controle); PC20/02; PC IAC19/02 (duas extrações de DNA).

LINHAGEM DE *G. mangiferae*: EC196/01. LINHAGEM DE *P. spinarum*: ECPR8.

Conforme pode ser observado na Figura 16, as linhagens PC20/02 e PC IAC19/02 como também a linhagem PC13, utilizada como controle por ter sido identificada anteriormente como *G. citricarpa*, apresentaram uma banda com tamanho estimado próximo ao esperado para este par de oligonucleotídeos iniciadores (aproximadamente 300pb). A linhagem EC196/01 não apresentou a banda amplificada, confirmando os resultados obtidos por RAPD, levando à conclusão que apesar desta linhagem ter sido isolada de lesão, ela não pertence à espécie *G. citricarpa* e deveria estar presente juntamente com a linhagem patogênica de *G. citricarpa* na lesão, na planta. Este par de oligonucleotídeos iniciadores também não foi capaz de amplificar nenhum fragmento para a linhagem de *P. spinarum*, ECPR8.

5.4.2 Construção da biblioteca genômica

Para garantir um DNA de alta qualidade e pureza da linhagem PC IAC19/02, foi feita uma extração de DNA convencional (4.7.1), e não com o kit da Promega, pois este, em outras ocasiões, gerou um DNA de baixa qualidade. A pureza do DNA foi estimada através da relação A_{260nm}/A_{280nm} e obteve-se um valor de 1,904. A concentração deste DNA foi estimada em 0,5 mg/mL por meio de eletroforese em gel de agarose e confirmada por espectrofotometria (A_{260nm}).

Diferentes concentrações da enzima de restrição *Sau3A* foram testadas e a concentração da enzima que produziu mais fragmentos com tamanho em torno de 15 kb foi identificada. Para que os fragmentos formados tivessem uma maior aleatoriedade em relação aos sítios de restrição do DNA genômico, a digestão em larga escala do DNA foi feita com metade da concentração da enzima *Sau3A* previamente determinada (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989), sendo utilizada a concentração final de 0,0025 unidades de enzima por μg de DNA. Após a digestão, foi feita uma eletroforese e, os fragmentos com tamanho médio de 15 kb foram extraídos do gel. A estimativa da concentração deste DNA (inserto) foi feita em eletroforese em gel de agarose e então se procedeu a ligação do inserto com o fago LambdaGeM® - 11. Problemas com o extrato de empacotamento inviabilizaram a

finalização desta biblioteca. A infecção, com os fagos utilizados como controle, ocorreu conforme o esperado.

Com a biblioteca genômica de *G. citricarpa*, várias investigações de genes envolvidos na patogenicidade deste fungo poderão ser feitas. Uma outra possibilidade será a investigação de elementos transponíveis no genoma deste fitopatogênico. Estes elementos podem ser responsáveis pela instabilidade que ocorre nas colônias deste fungo em meio de cultura. A freqüente formação de setores observada neste trabalho e também por outros autores (BLANCO, 1999; POSSIEDE, 2004) pode estar diretamente relacionada a estes elementos. Uma vez isolados, alguns transposons já se mostraram capazes de serem inseridos nos genomas de outros fungos, em localizações diversas da sua origem. Este é o caso do transposon *impala*, isolado originalmente no fungo *Fusarium oxysporum* dentro do gene *niaD* e que foi introduzido no fungo *Penicillium griseoroseum*, um produtor de pectinases. Com isto, abriu-se a possibilidade de desenvolvimento de um sistema de identificação e clonagem de genes relacionados com a produção destas enzimas (QUEIROZ; DABOUSSI, 2003). Em *Crinipellis pernicioso*, fungo causador da doença Vassoura-de-Bruxa em cacaueiro, um provável elemento transponível foi descrito recentemente (PEREIRA et al., 2004). Este elemento, denominado *Boto*, foi parcialmente seqüenciado e por comparação desta seqüência com seqüências no banco de dados, foi verificada uma maior homologia com elementos transponíveis de plantas. Os autores consideraram a possibilidade de uma transferência horizontal deste elemento a partir de plantas. Ainda, esta seqüência está sendo utilizada como sonda, para o isolamento do elemento completo em uma biblioteca genômica deste fungo, construída no bacteriófago Lambda. Apesar de elementos deste tipo serem encontrados em vários fungos fitopatogênicos como em *Magnaporthe grisea* (KITO et al., 2003) e *Fusarium oxysporum* (CHALVET et al., 2003), a presença destes elementos ainda não foi relatada nos gêneros *Guignardia* ou *Phyllosticta*.

6 CONCLUSÕES

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

- Condições de cultura contribuem diferentemente para o crescimento radial e para a produção de esporos em *Guignardia citricarpa* e *Phyllosticta spinarum* e algumas destas características podem ser úteis na identificação preliminar destes fungos.
- *Guignardia citricarpa*, *G. mangiferae* e *Phyllosticta spinarum* podem apresentar RNA dupla fita e partículas semelhantes a vírus sendo que as linhagens de *G. citricarpa* analisadas devem estar infectadas com vírus da família Totiviridae enquanto em *G. mangiferae* pode haver infecção com vírus da família Partitiviridae e as linhagens de *P. spinarum* podem estar infectadas com vírus das famílias Partitiviridae e/ou Chrysoviridae.
- Em *G. citricarpa* a presença de RNA dupla fita parece não alterar a morfologia das colônias bem como a taxa de crescimento em meios de cultura. O tamanho dos conídios e espermácios também não são influenciados por estes elementos, porém, parece haver uma correlação positiva entre a presença de RNA dupla fita e a taxa de produção de esporos nestas linhagens.
- Marcadores obtidos por RAPD para *G. citricarpa* e *G. mangiferae* podem ser convertidos em SCARs para diagnóstico molecular.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, I.P.; LEE, Y.H. A viral double-stranded RNA up regulates the fungal virulence of *Nectria radicola*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 14, p. 496-507, april, 2001.

AIMI, T.; KANO, S.; YOTSUTANI, Y.; MORINAGA, T. Telomeric fingerprinting of the white root rot fungus, *Rosellinia necatrix*: a useful tool for strain identification. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 217, p. 95-101, 2002.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4^a ed. Porto Alegre: Artmed Editora. 2004.

ALFENAS, A. 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.

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, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

APPIAH, A.A.; FLOOD, J.; BRIDGE, P.D.; ARCHER, S.A. Inter- and intraspecific morphometric variation and characterization of *Phytophthora* isolates from cocoa. **Plant Pathology**, Oxford, v.52, p. 168-180, 2003.

ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JR., W.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS, 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, p. 229-236, 2001.

ARAUJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JR., W.; VAN ELSAS, J.D.; VAN VUURDE, J.W.L.; AZEVEDO, J.L. Diversity of Endophytic Bacterial Populations and Their Interaction with *Xylella fastidiosa* in Citrus Plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 10, p. 4906-4914, 2002.

ARNOLD, A.E.; MEJIA, L.C.; KYLLO, D.; ROJAS, E.I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E.A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences - USA**, Washington, v. 100, n. 26, p. 15649-15654, 2003.

AZEVEDO, A.C.S.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; FARIA, M.R.; FUNGARO, M.H.P. Effects of double-stranded RNA on virulence of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the silverleaf whitefly, *Bemisia tabaci* strain B (homóptera: Aleyrodidae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, p. 61-63, 2000.

AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Genetically modified crops: environmental and human

health concerns. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 544, p. 223-233, 2003.

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

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JR., W.; ARAÚJO, W.L.; PEREIRA, J.O. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. 433 p.

BAAYEN, R.P.; BONANTS, P.J.M.; VERKLEY, G.; CARROLL, G.C.; VAN DER AA, H.A.; DE WEERDT, M.; VAN BROUWERSHAVEN, I.R.; SCHUTTE, G.C.; MACCHERONI JR., W.; GLIENKE DE BLANCO, C.; AZEVEDO, J.L. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*), **Phytopathology**, St. Paul, v.92, n. 5, p. 464-477, 2002.

BAILEY, A.; MUELLER, E.; BOWYER, P. Ornithine decarboxylase of *Stagonospora* (*Septoria*) *nodorum* is required for virulence toward wheat. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.275, n.19, p. 14242-14247, 2000.

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

BATTEN, J.S.; SCHOLTHOF, K.B.; MILLER, M.E.; MARTYN, R.D. cDNA probes for detection of specific dsRNAs from the fungal pathogen, *Monosporascus cannonballus*. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 84, p. 209-215, 2000.

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

BENEN, J.A.E.; SÁNCHEZ-TORRES, P.; WAGEMAKER, M.J.M.; FRAAIJE, M.W.; VAN BERKEL, W.J.H.; VISSER, J. Molecular cloning, sequencing, and heterologous expression of the *vaoA* gene from *Penicillium simplicissimum* CBS170.90 encoding vanillyl-alcohol oxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 273, n. 14, p. 7865-7872, 1998.

BENITO, B.; GARCIADEBLÁS, B.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, A. Molecular cloning of the calcium and sodium ATPases in *Neurospora crassa*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 35, n. 5, p. 1079-1088. 2000.

BIDOCHKA, M.J.; MELZER, M.J.; LAVENDER, T.M.; KAMP, A.M.; Genetically related isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* harbour homologous dsRNA virases. **Mycological Research**, Cambrigde, v. 104, p. 1094-1097, 2000.

BLANCO, C.G. ***Guignardia citricarpa* Kiely: Análise Genética, Cariotípica e Interação com o Hospedeiro**. Piracicaba, 1999. 196p. Tese (doutorado).

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/USP.

BOGO, M.R.; QUEIROZ, M.V.; SILVA, D.M.; GIMÉNEZ, M.P.; AZEVEDO, J.L.; SCHRANK, A. Double-stranded RNA and isometric virus-like particles in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, p.1468-1472, 1996.

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

BONANTS, P.J.M.; CARROLL, G.C.; 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.

BRODRICK, H.T.; RABIE, C.J. Light and temperature effects on symptom development and sporulation of *Guignardia citricarpa* Kiely, on *Citrus sinensis* (Linn) Osbeck. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 2, p. 157-164, 1970.

BROWN, T.A. **Clonagem Gênica e Análise de DNA**. Uma Introdução. Artmed Editora S.A. Porto Alegre. 375p. 2003.

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

BUCK, K.W. Fungal virology – An overview. In: **Fungal virology**. Ed. K.W. Buck, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, p. 1-84, 1986.

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.

CAPELARI, M.; FUNGARO, M.H.P. Determination of biological species and analysis of genetic variability by RAPD of isolates of *Pleurotus* subgenus *Coremiopleurotus*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, n. 9, p. 1050-1054, 2003.

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.

CARTER, J.P.; REZANOOR, H.N.; HOLDEN, D.; DESJARDINS, A.E.; PLATTNER, R.D.; NICHOLSON, P. Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of *Fusarium graminearum*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, p. 573-583, 2002.

CASSIOLATO, A.M.R.; SOUZA, N.L. Controle biológico de *Rhizoctonia solani* por isolados de *Rhizoctonia* spp. não-patogênicos ou hipovirulentos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Eds.) **Controle Biológico**. Volume 3. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 308p.

CASTRILLO, L.A.; VANDENBERG, J.D.; WRAIGHT, S.P. Strain-specific detection of introduced *Beauveria bassiana* in agricultural fields by use of sequence-characterized amplified region markers. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 82, p. 75-83, 2003.

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

CELIKUR, N.M.; ONOGUR, E. Determining the hypovirulence in the isolates of chestnut blight *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr.) in Turkey. **Journal of Turkish Phytopathology**, Estambul, v.27, p.145-146, 1998.

CERKAUSKAS, R.F. Latent colonization by *Colletotrichum* spp.: epidemiological considerations and implications for mycoherbicides. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 10, p. 297-310, 1988.

CHALVET, F.; GRIMALDI, C.; KAPER, F.; LANGIN, T.; DABOUSSI, M.J. *Hop*, an active *Mutator*-like element in the genome of the fungus *Fusarium oxysporum*. **Molecular Biology and Evolution**, Lawrence, v. 20, n. 8, p. 1362-1375, 2003

CHENG, J.; JIANG, D.; FU, Y. ; LI, G.; PENG, Y. GHABRIAL, S.A. Molecular characterization of a dsRNA totivirus infecting the sclerotial parasite *Coniothyrium minitans*. **Virus Research**, Shannon, v. 93, p. 41-50, 2003.

CHRISTO, D. **Variabilidade genética e diferenciação molecular de isolados endofíticos e patogênicos de *Guignardia* spp e *Phyllosticta* sp.** Curitiba, 2002, 78p. Dissertação (Mestrado). Orientadora: Profa. Dra. Chirlei Glienke de Blanco. Universidade Federal do Paraná.

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

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

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

1987.

CLAY, K. Clavicipitaceous endophytes of grasses: their potential as biocontrol agents. **Mycological Research**, Cambridge, v.92, n.1, p. 1-12, 1989.

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.

COHEN, S.; ALLASIA, V.; VENARD, P.; NOTTER, S.; VERNIERE, C.; PANABIÈRES, F. Intraspecific Variation in *Phytophthora citrophthora* from Citrus Trees in Eastern Corsica. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, n. 8, p. 791-805, 2003.

COMPEL, P.; PAPP, I.; BIBO, M.; FEKETE, C.; HORNOR, L. Genetic interrelationships and genome organization of double-stranded RNA elements of *Fusarium poae*. **Virus Genes**, Dordrecht, v. 18, p. 49-56, 1999.

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.

CROWHURST, R.N.; HAWTHORNE, B.T.; RIKKERING, E.H.A.; TEMPLETON, M.D. Differentiation of *Fusarium solani* sp *cucurbitae* races 1 and 2 by random amplification of polymorphic DNA. **Current Genetics**, Berlin, v.20, p.391-396, 1991.

DALE, J.L.; MANNERS, J.M.; IRWIN, J.A.G. *Colletotrichum gloeosporioides* isolates causing different anthracnose diseases on *Stylosanthes* in Australia carry distinct double-stranded RNAs. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 91, p. 671-676, 1988.

DALZOTO, P.R.; GLIENKE-BLANCO, C.; KAVA-CORDEIRO, V.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L. RAPD analyses of recombination processes in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Mycological Research**, Cambridge, v.107, p. 1069-1074, 2003.

DALZOTO, P.R. **Parameiose e caracterização de RNAs dupla fita no deuteromiceto *Beauveria bassiana* (Vuill.)**. Curitiba, 2004, 164p. Tese (Doutorado). Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo. Universidade Federal do Paraná.

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

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

p.1393-1396, 1977.

DE WIT, P.J.G.M. Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 391-418, 1992.

DE WIT, P.J.G.M. The molecular basis of gene-for-gene systems in plant-pathogen interactions. In: ZAMBOLIM e DO VALE (Eds.) **Resistência de Plantas a Doenças**: Palestras do XXX Congresso Brasileiro de Fitopatologia. P.64-69, 1997.

DE WIT, P.J.G.M.; VAN DEN ACKERVEKEN, G.F.J.M.; VOSSEN, P.M.J.; JOOSTEN, M.H.A.J.; COZIJNSEN, T.J.; HONEE, G.; WUBBEN, J.P.; DANHASH, N.; VAN KAN, J.A.L.; MARMEISSE, R.; VAN DEN BROEK, H.W.J. Molecular cloning and functions of avirulence and pathogenicity genes of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. In: NESTER, E.W.; VERMA, D.P.S. (Eds.). **Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1993. P.289-298.

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

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

DERISI, J.L.; IYER, V.R. Genomics and array technology. **Current Opinion in Oncology**, Hagerstown, v.11, p.76-79, 1999.

DERISI, J.L.; IYER, V.R.; BROWN, P.O. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. **Science (Washington, D.C.)**, Washington, v.278, p. 680-686, 1997.

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

FAHEY, J.W. Endophytic bacteria for the delivery of agrochemicals to plants. In: CUTLER, H.O., ed. **Biologically active natural products: potential use agriculture**. Washington, ACS Symposium Ser., 380, p. 120-128, 1988.

FELIPE, M.S.S.; AZEVEDO, M.A.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. **Biologia molecular de fungos filamentosos: Construção de banco genômico**. Manual técnico. Piracicaba: FEALQ, 1992. 99p.

FISHER, P.J.; ANSON, A.E.; PETRINI, O. Fungal endophytes in *Ulex europaeus* and *Ulex gallii*. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 86, p. 153-156, 1986.

FISHER, P.J.; ANSON, A.E.; PETRINI, O. Novel antibiotic activity of an endophyte *Cryptoporiopsis* sp isolated from *Vaccinium myrtillus*. **Transactions of the British**

Mycological Society, Cambridge, v. 83, p. 145-148, 1984.

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

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

GALAGAN, J.E. et al. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Nature (London)**, London, v. 422, p. 859-868, 2003.

GHABRIAL, S.A. New developments in fungal virology. **Advances in Virus Research**, San Diego, v. 43, p. 303-388, 1994.

GILLINGS, M.R.; TESORIERO, L.A.; GUNN, V. Detection of double-stranded RNA and virus-like particles in Australian isolates of *Pythium irregulare*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 42, p. 6-15, 1993.

GILLIS, M.; KERSTERS, K.; HOSTE, B.; JANSSENS, D.; KROPPESTEDT, R.M.; STEPHEN, M.P.; TEIXEIRA, K.R.S.; DÖBEREINER, L.; DE LEY, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp. Nov., a nitrogen acetic bacterium associated with sugarcane. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 39, p. 361-364, 1989.

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

GLIENKE, C. **Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa* Kiely detectada por RAPD**. Curitiba, 1995, 115p. Dissertação (Mestrado). Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo. Universidade Federal do Paraná.

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

GOODWIN, P.H.; ANNIS, S.L. Rapid identification of genetic variation and pathotype of *Leptosphaeria maculans* by random amplified polymorphic DNA assay. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.57, p.2482-2486, 1991.

GRAJAL-MARTIN, M.J.; SIMON, C.J.; MUEHLBAUER, F.J. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*. **Phytopathology**, St. Paul, v.83, n.6, p.612-614, 1993.

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

GUTTERSON, N. Microbial fungicides: Recent approaches to elucidating mechanisms. **Critical Reviews in Biotechnology**, Philadelphia, v. 10, n. 1, p. 69-82, 1990.

HAMMAR, S.; FULBRIGHT, D.W.; ADAMS, G.C. Association of double-stranded RNA with low virulence in an isolate of *Leucostoma persoonii*. **Phytopathology**, St. Paul, v.79, p. 568-572, 1989.

HAYWARD, R.E.; DERISI, J.L.; ALFADHLI, S.; KASLOW, D.C.; BROWN, P.O.; RATHOD, P.K. Shotgun DNA microarrays and stage-specific gene expression in *Plasmodium falciparum* malaria. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 35, n. 1, p.6-14, 2000.

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.

HERMOSA, M.R.; GRONDONA, I.; DÍAZ-MÍNGUEZ, J.M.; ITURRIAGA, E.A.; MONTE, E. Development of a strain-specific SCAR marker for the detection of *Trichoderma atroviride* 11, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. **Current Genetics**, Berlin, v. 38, p. 343-350, 2001.

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

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

HOLMES, G.J.; ECKERT, J.W.; PITT, J. I. Revised description of *Penicillium ulaiense* and its role as a pathogen of Citrus fruits. **Phytopathology**, St. Paul, v.84, p.719-727, 1994.

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

HOWITT, R.L.J.; BEEVER, R.E.; PEARSON, M.N.; FORSTER, R.L.S. Presence of

double-stranded RNA and virus-like particles in *Botrytis cinerea*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 99, p. 1472-1478, 1995.

HULBERT, S.H.; ILOTT, T.W.; LEGG, E.J.; LINCOLN, S.E.; LANDER, E.S.; MICHELMORE, R.W. Genetic analysis of the fungus, *Bremia lactucae*, using restriction fragment length polymorphisms. **Genetics**, Bethesda, v.120, p.947-958, 1988.

HUNST, P.L.; LATERELL, F.M.; ROSSI, A.E. Variation in double-stranded RNA from isolates of *Pyricularia oryzae*. **Phytopathology**, St Paul, v.76, p.674-678, 1986.

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.

IHRMARK, K.; ZHENG, J.; STENSTRÖM, E.; STENLID, J. Presence of double-stranded RNA in *Heterobasidion annosum*. **Forest Pathology**, Berlin, v.31, p.387-394, 2001.

IKEDA, K.; NAKAMURA, H.; ARAKAWA, M.; MATSUMOTO N. Diversity and vertical transmission of double-stranded RNA elements in root rot pathogens of trees, *Helicobasidium mompa* and *Rosellinia necatrix*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, n.6, p.626-634, 2004.

JOHNSON, R.D.; JOHNSON, L.; KODAMA, M.; OTANI, H.; KOHMOTO, K. Cloning and characterization of a cyclic peptide synthetase gene from *Alternaria alternata* apple pathotype whose product is involved in AM-toxin synthesis and pathogenicity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.13, n.7, p. 742-753, 2000.

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

JUDELSON, H.S.; MICHELMORE, R.W. Strategies for cloning avirulence genes from *Bremia lactucae*. In: STASKAWICZ, P.; AHLQUIST, P.; YODER, O. Molecular biology of plant-pathogen interactions. **Symp. Mol. Cell. Biol.**, v. 101, p.71-85, 1989.

KITO, H.; TAKAHASHI, Y.; SATO, J.; FUKIYA, S.; SONE, T.; TOMITA, F. *Occan*, a novel transposon in the *Fot1* family, is ubiquitously found in several *Magnaporthe grisea* isolates. **Current Genetics**, Berlin, v. 42, p. 322-331, 2003.

KONSTANTINOVA, P.; BONANTS, P.J.M.; GENT-PELZER, M.P.E.; ZOUWEN, P.; BULK, R. Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp. In carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays. **Mycological Research**, Cambridge, v.106, n. 1, p. 23-33, 2002.

KUBO, Y.; TAKAMO, Y.; ENDO, N.; YASUDA, N.; TAJIMA, S.; FURUSAWA, I. Cloning

and structural analysis of the melanin biosynthesis gene SCD1 encoding scytalone dehydratase in *Colletotrichum lagenarium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 12, p. 4340-4344, 1996.

KUTIL, B.L.; LIU, G.; VREBALOV, J.; WILKINSON, H.H. Contig assembly and microsynteny analysis using a bacterial artificial chromosome library for *Epichloë festucae*, a mutualistic fungal endophyte of grasses. **Fungal Genetics and Biology**, Kansas City, v. 41, p. 23-32, 2004.

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

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

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

LIEW, E.C.Y.; IRWIN, J.A.G. Comparative studies on *Phytophthora megasperma* isolates from chickpea collected in Australia and Spain. **Mycological Research**, Cambridge, v.98, n.11, p.1284-1290, 1994.

LIU, D.; VAN HEESWIJCK, R.; LATCH, G.; LEONFORTE, T.; PANACCIO, M.; LANGFORD, C.; CUNNINGHAM, P.; REED, K. Rapid identification of *Acremonium lolii* and *Acremonium coenophialum* endophytes through arbitrarily primed PCR. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.133, n.1-2, p.95-98, 1995.

MAGAE, Y.; HAYASHI, N. Double-stranded RNA and virus-like particles in the edible basidiomycete *Flammulina velutipes* (Enokitake). **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 180, p. 331-335, 1999.

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.

MAOR, R.; PUYESKY, M.; HORWITZ, B.A.; SHARON, A. Use of green fluorescent protein (GFP) for studying development and fungal-plant interaction in *Cochliobolus heterostrophus*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, n. 4, p. 491-496, 1998.

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

MAZZAGLIA, A.; ANSELMINI, N.; GASBARRI, A.; VANNINI, A. Development of a

polymerase chain reaction (PCR) assay for the specific detection of *Biscogniauxia mediterranea* living as an endophyte in oak tissues. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, n. 8, p. 952-956, 2001.

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

McMILLAN JR., R.T. *Guignardia citricarpa* a cause of black spot on mango foliage in Florida. **Journal of Phytopathology (Berlin)**, 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.

MEIJER, G.; MEGNEGNEAU, G.; LINDERS, E.G.A. Variability for isozyme, vegetative compatibility and RAPD markers in natural populations of *Phomopsis subordinaria*. **Mycological Research**, Cambridge, v.98, n.3, p.267-276, 1994.

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

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

MIAZZI, M.; HAJJEH, H.; FARETRA, F. Observations on the population biology of the grape powdery mildew fungus *Uncinula necator*. **Journal of Plant Pathology**, Milan, v. 85, n. 2, p. 123-129, 2003.

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.

MIÑAMBRES, B.; OLIVERA, E.R.; GARCÍA, B.; NAHARRO, G.; LUENGO, J.M. From a short amino acidic sequence to the complete gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 272, n. 2, p. 477-479, 2000.

MOLELEKI, N.; VAN HEERDEN, S.W.; WINGFIELD, M.J.; WINGFIELD, B.D.; PREISIG, O. Transfection of *Diaporthe perijuncta* with *Diaporthe RNA Virus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 3952-3956, 2003.

MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the fungi**, 4th ed., Ed. Prentice-Hall, New Jersey, p. 501-513, 1996, 574p.

MURRAY, F.R.; LATCH, G.C.M.; SCOTT, D.B. Surrogate transformation of perennial ryegrass *Lolium perenne* using genetically modified *Acremonium*

endophyte. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v.233, p.1-9, 1992.

NEWHOUSE, J.R.; TOOLEY, P.W.; SMITH, O.P.; FISHEL, R.A. Characterization of double-stranded RNA in isolates of *Phytophthora infestans* from Mexico, the Netherlands, and Peru. **Phytopathology**, St. Paul, v. 82, p. 164-169, 1992.

NICHOLSON, P.; REZANOOR, H.N. The use of random amplified polymorphic DNA to identify pathotype and detect variation in *Pseudocercospora herpotrichoides*. **Mycological Research**, Cambridge, v.98, n.1, p.13-21., 1994.

NOGAWA, M.; NAKATANI, A.; GONDA, K.; SHIMOSAKA, M.; OKAZAKI, M. Replication of double-stranded RNA in micovirus from the plant pathogenic fungus *Fusarium solani*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 137, p. 45-49, 1996.

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

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

OSAKI, H.; NOMURA, K.; MATSUMOTO, N.; OHTSU, Y. Characterization of double-stranded RNA elements in the violet root rot fungus *Helicobasidium mompa*. **Mycological Research**, Cambridge, v.108, n.6, p.635-640, 2004.

OSAKI, H.; WEI, C.Z.; ARAKAWA, M.; IWANAMI, T.; NOMURA, K.; MATSUMOTO, N.; OHTSU, Y. Nucleotide sequences of double-strand RNA segments from a hypovirulent strain of the white root rot fungus *Rosellinia necatrix*: Possibility of the first member of the *Reoviridae* from fungus. **Virus Genes**, Dordrecht, v. 25, n.1, p.101-107, 2002.

PAMPHILE, J.A.; AZEVEDO, J.L. Molecular characterization of endophytic strains of *Fusarium verticillioides* (= *Fusarium moniliforme*) from maize (*Zea mays* L). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 18, 391-396, 2002.

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

PAPP, T.; NYILASI, I.; FEKETE, C.; FERENCZY, L.; VAGVOLGYI, C. Presence of double-stranded RNA and virus-like particles in *Rhizopus* isolates. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 443-447, 2001.

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

PENNA, E.B.S. **Microrganismos endofíticos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e variabilidade genética em *Phyllosticta* sp por RAPD**. Curitiba, 2000, 123p.

Dissertação (Mestrado). Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo. Universidade Federal do Paraná.

PEREIRA, J.F.; ARAÚJO, E.F.; CASCARDO, J.; CARAZZOLE, M.; PEREIRA, G.A.G.; QUEIROZ, M.V. *Boto*, um elemento transponível putativo da classe II em *Crinipellis pernicioso*: análise e distribuição em diferentes biótipos e regiões geográficas. **Anais da XXIV Reunião de Genética de Microrganismos**. Gramado, Resumo GMF-050, p.125, 2004.

PETRINI, L.E.; PETRINI, O.; LAFLAMME, G. Recovery of endophytes of *Abies balsamiae* from needles and galls of *Paradiplosis tumifex*. **Phytoprotection**, Saint Jean sur Richelieu, v. 70, n. 2, p. 97-103, 1989.

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

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.

PFEIFFER, I.; LITTER, J.; PÉNZES, Z.S.; KUCSERA, J. Effects of double-stranded RNA viruses on the reproduction of *Phaffia rhodozyma*. **Acta Biologica Hungarica**, Budapest, v. 52, p. 299-306, 2001.

PONS, N. Estudio taxonomico de especies de *Phoma* y *Phyllosticta* sobre caña de azucar (*Saccharum* sp). **Fitopatologia Venezolana**, Maracay, v. 3, p.34-43, 1990.

PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MaC DONALD, K.D.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, San Diego, v. 5, p. 141-238, 1953.

POSSIEDE, Y.M. **Estudos morfofisiológicos e genéticos em *Guignardia* spp e *Phyllosticta* sp**. Curitiba, 2004, 129p. Tese (Doutorado). Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo. Universidade Federal do Paraná.

PREISIG, O.; MOLELEKI, N.; SMIT, W.A.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. A novel RNA micovírus in a hipovirulent isolate of the plant pathogen *Diaporthe ambigua*. **Journal of General Virology**, Reading, v. 81, p. 3107-3114, 2000.

PREISIG, O.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. Coinfection of a fungal pathogen by two distinct double-stranded RNA viruses. **Virology**, San Diego, v. 252, p. 399-406, 1998.

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

PUNJA, Z.K. Influence of double-stranded RNA on growth, sporulation, pathogenicity, and survival of *Chalara elegans*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. 1001-1009, 1994.

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, v.70, p.604-618. 1993.

QUEIROZ, M.V.; DABOUSSI, M.J. *Impala*, a transposon from *Fusarium oxysporum*, is active in the genome of *Penicillium griseoroseum*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 218, p. 317-321, 2003.

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

REISSINGER, A.; VILICH, V.; SIKORA, R.A. Detection of fungi in planta: effectiveness of surface sterilization methods. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, p. 563-566, 2001.

RIBEIRO, J. Z. **Presença, influência e transmissão de RNA dupla fita no fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin**. 2002. Curitiba, PR. 115p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná.

ROBIN, C.; HEINIGER, U. Chestnut blight in Europe: Diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. **Forest Snow and Landscape Research**, v. 76, n. 3, p. 361-367, 2001.

ROBINSON, H.L.; DEACON, J.W. Double-stranded RNA elements in *Rhizoctonia solani* AG3. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, p. 12-22, 2002.

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 ITS1-5.8S-ITS2 sequences. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, n.1, p. 45-52, 2004.

ROGERS, H.J.; BUCK, K.W.; BRASIER, C.M. Transmission of double-stranded RNA and a disease factor in *Ophiostoma ulmi*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 35, p. 277-287, 1986.

RONG, R.; RAO, S.; SCOTT, S.W.; TAINTER, F.H. Common multiple dsRNA are present in populations of the fungus *Discula destructiva* originating from widely separated geographic locations. **Current Microbiology**, New York, v. 42, p. 144-148, 2001.

RUDGERS, J.A.; KOSLOW, J.M.; CLAY, K. Endophytic fungi alter relationships between diversity and ecosystem properties. **Ecology Letters**, Oxford, v. 7, n. 1, p. 42-51, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

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

SASAKI, A.; ONOUE, M.; KANEMATSU, S.; SUZAKI, K.; MIYANISHI, M.; SUZUKI, N.; NUSS, D.L.; YOSHIDA, K. Extending chestnut blight hypovirus host range within Diaporthales by biolistic delivery of viral cDNA. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 15, n. 8, p. 780-789, 2002.

SCHÄFER, C.; WÖSTEMEYER, J. Random Primer Dependent PCR differentiates Aggressive from Non-Aggressive isolates of the Oilseed Rape Pathogen *Phoma lingam* (*Leptosphaeria maculans*). **Journal of Phytopathology (Berlin)**, Berlin, v.136, p.124-136, 1992.

SCHMIDT, H.; EHRMANN, M.; VOGEL, R.F.; TANIWAKI, M.H.; NIESSEN, L. Molecular typing of *Aspergillus ochraceus* and construction of species specific SCAR-primers based on AFLP. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v.26, p. 138-146, 2003.

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.

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

SIMPSON, A.J.G. et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature (London)**, London, v. 406, p. 151-159, 2000.

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

SMITHSON, S.L.; PATERSON, I.C.; BAILEY, A.M.; SCREEN, S.E.; HUNT, B.A.; COBB, B.D.; COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K.; CLARKSON, J.M. Cloning and characterisation of a gene encoding a cuticle-degrading protease from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Gene (Amst.)**, Amsterdam, v. 166, n. 1, p. 161-165, 1995.

SOLOMON, P.S.; TAN, K.; OLIVER, R.P. The nutrient supply of pathogenic fungi; a fertile field for study. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 4, n. 3, p. 203-210, 2003.

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.

St LEGER, R.J., MAY, B., ALLEE, L.L., FRANK, D.C., STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. Genetics differences in allozymes and formation of infection structures among isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v.60, p. 89-101. 1992.

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

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreane*, an endophytic fungus of Pacific Yew. **Science**, Washington, v. 260, p. 214-216, 1993.

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.

STRAUSS, E.E.; LAKSHMAN, D.R.; TAVANTZIS, S.M. Molecular characterization of the genome of a partitivirus from the basidiomycete *Rhizoctonia solani*. **Journal of General Virology**, Reading, v.81, p. 549-555, 2000.

STRINGARI, D. **Estudo da variabilidade genética de *Guignardia* spp por meio de marcadores RAPD e seqüências ITS**. Curitiba, 2004, 101p. Dissertação (Mestrado). Orientadora: Profa. Dra. Chirlei Glienke de Blanco. Universidade Federal do Paraná.

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.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, p.4673-4680, 1994.

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

TUDZYNSKI, B.; MENDE, K.; WELTRING, K.M.; KINGHORN, J.R.; UNKLES, S.E. The *Gibberella fujikuroi niaD* gene encoding nitrate reductase: isolation, sequence, homologous transformation and electrophoretic karyotype location. **Microbiology (Reading)**, Reading, v.142, n.3, p. 533-539, 1996.

VALENT, B.; CHUMLEY, F.G. Molecular genetic analysis of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 29, p. 433-467, 1991.

VAN DE KAMP, M.; PIZZININI, E.; VOS, A.; VAN DER LENDE, T.R.; SCHUURS, T.A.; NEWBERT, R.W.; TURNER, G.; KONINGS, W.N.; DRIESSEN, A.J.M. Sulfate transport in *Penicillium chrysogenum*: cloning and characterization of the *sutA* and *sutB* genes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 181, n. 23, p. 7228-7234, 1999.

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

VAN DER MERWE, N.A.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. Primers for the amplification of sequence-characterized loci in *Cryphonectria cubensis* populations. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 3, p. 494-497, 2003.

VARGA, J.; KEVEI, F.; VÁGVÖLGYI, C. Double-stranded RNA mycoviruses in section *Nigri* of the *Aspergillus* genus. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 40, p. 325-329, 1994.

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

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

VETTORE, A.L.; SILVA, F.R.; KEMPER, E.L.; ARRUDA, P. The libraries that made SUCEST. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 24, n. 1-4, p. 1-7, 2001.

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

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting 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.

WICKNER, R.B. Double-stranded and single-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 46, p. 347-75, 1992.

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.

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.

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.

WRIGHT, G. F. K.; GUEST, D. I. ; WIMALAJEewa, D. L. S.; VAN HEESWIJCK, R. Characterisation of *Fusarium oxysporum* isolated from carnation in Australia based on pathogenicity, vegetative compatibility and random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 102, p. 451-457, 1996.

XOCONOSTLE-CÁZARES, B.; LÉON-RAMIREZ, C.; RUIZ-HERRERA, J. Two chitin synthase genes from *Ustilago maydis*. **Microbiology, (Reading)**, Reading, v.142, p.377-387, 1996.

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

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

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - DADOS E TESTES ESTATÍSTICOS DO CRESCIMENTO RADIAL E ESPORULAÇÃO

LINHAGEM E LUMINOSIDADE: ECPR3 24 horas						
MEIOS⇒	V8		MC		BDA	
REPETIÇÕES ↓	DIÂMETRO (cm)	Nº DE ESPOROS (x10 ⁶)	DIÂMETRO (cm)	Nº DE ESPOROS (x10 ⁶)	DIÂMETRO (cm)	Nº DE ESPOROS (x10 ⁶)
A	6,0	4,84	6,0	0,6	4,7	4,84
B	5,5	2,16	6,7	0,24	5,0	4,32
C	4,2	1,88	7,0	0,32	4,2	5,48
LINHAGEM E LUMINOSIDADE: ECPR3 12 horas						
MEIOS⇒	V8		MC		BDA	
REPETIÇÕES ↓	DIÂMETRO (cm)	Nº DE ESPOROS (x10 ⁶)	DIÂMETRO (cm)	Nº DE ESPOROS (x10 ⁶)	DIÂMETRO (cm)	Nº DE ESPOROS (x10 ⁶)
A	6,0	3,76	7,0	1,6	6,0	4,16
B	7,0	3,64	7,5	1,44	6,8	2,84
C	6,5	2,12	8,0	0,8	7,5	3,64
LINHAGEM E LUMINOSIDADE: PC7LB8 24 horas						
MEIOS⇒	V8		MC		BDA	
REPETIÇÕES ↓	DIÂMETRO (cm)	Nº DE ESPOROS (x10 ⁶)	DIÂMETRO (cm)	Nº DE ESPOROS (x10 ⁶)	DIÂMETRO (cm)	Nº DE ESPOROS (x10 ⁶)
A	4,5	0,25	4,0	2,40	4,5	2,05
B	4,0	0,80	6,0	1,30	3,0	0,90
C	5,0	0,30	6,0	1,30	2,8	2,80
LINHAGEM E LUMINOSIDADE: PC7LB8 12 horas						
MEIOS⇒	V8		MC		BDA	
REPETIÇÕES ↓	DIÂMETRO (cm)	Nº DE ESPOROS (x10 ⁶)	DIÂMETRO (cm)	Nº DE ESPOROS (x10 ⁶)	DIÂMETRO (cm)	Nº DE ESPOROS (x10 ⁶)
A	4,4	0,85	6,2	1,00	4,0	0,65
B	4,3	0,65	6,3	4,35	4,5	2,15
C	6,3	1,05	5,5	1,00	4,0	1,45

ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA CRESCIMENTO RADIAL

FV	GL	QM	F
Tratamentos	11	4,399	8,331 *
Meio	2	7,915	14,99 *
Linhagem	1	19,22	36,40 *
Luz	1	9,72	18,41 *
Meio x Linhagem	2	0,477	0,90 ^{n.s.}
Meio x Luz	2	0,352	0,66 ^{n.s.}
Linhagem x Luz	1	1,471	2,78 ^{n.s.}
Meio x Lin. x Luz	2	0,244	0,462 ^{n.s.}
Resíduo	24	0,528	
Total	35		

média geral = 5,469

c.v. = 13,28%

* = significativo ao nível de 5%

n.s. = não significativo

ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA ESPORULAÇÃO

FV	GL	QM	F
Tratamentos	11	5,5278	6,467 *
Meio	2	7,8085	9,135 *
Linhagem	1	15,249	17,841 *
Luz	1	0,004	0,0046 ^{n.s.}
Meio x Linhagem	2	12,5445	14,677 *
Meio x Luz	2	2,074	2,426 ^{n.s.}
Linhagem x Luz	1	0,082	0,0959 ^{n.s.}
Meio x Lin. x Luz	2	0,308	0,3603 ^{n.s.}
Resíduo	24	0,8547	
Total	35		

média geral = 2,053

c.v. = 45,02%

* = significativo ao nível de 5%

n.s. = não significativo

TESTE DE TUKEY PARA CRESCIMENTO RADIAL

MEIOS

$$q(3, 24) = 3,53$$

$$DMS = 0,74$$

- Linhagem ECPR3:

$$MC = 7,0 \quad a$$

$$V8 = 5,9 \quad b$$

$$BDA = 5,7 \quad b$$

- Linhagem PC7LB8:

$$MC = 5,7 \quad a$$

$$V8 = 4,8 \quad b$$

$$BDA = 3,8 \quad c$$

LINHAGENS

$$q(2, 24) = 2,92$$

$$DMS = 0,87$$

MC

$$ECPR3 = 7,0 \quad a$$

$$PC7LB8 = 5,7 \quad b$$

V8

$$ECPR3 = 5,9 \quad a$$

$$PC7LB8 = 4,8 \quad b$$

BDA

$$ECPR3 = 5,7 \quad a$$

$$PC7LB8 = 3,8 \quad b$$

TESTE DE TUKEY PARA ESPORULAÇÃO

MEIOS:

$$q(3, 24) = 3,53$$

$$DMS = 1,3323$$

- Linhagem ECPR3:

$$BDA = 4,213 \quad a$$

$$V8 = 3,067 \quad a$$

$$MC = 0,833 \quad b$$

- Linhagem PC7LB8:

$$MC = 1,892 \quad a$$

$$BDA = 1,667 \quad a$$

$$V8 = 0,65 \quad a$$

LINHAGENS:

$$q(2,24) = 2,92$$

$$DMS = 1,102$$

BDA

$$ECPR3 = 4,213 \quad a$$

$$PC7LB8 = 1,667 \quad b$$

V8

$$ECPR3 = 3,067 \quad a$$

$$PC7LB8 = 0,65 \quad b$$

MC

$$PC7LB8 = 1,892 \quad a$$

$$ECPR3 = 0,833 \quad a$$

CORRELAÇÃO ENTRE CRESCIMENTO RADIAL E ESPORULAÇÃO

	Diâmetro	Nº esporos	Parâmetros	Estimativas
PR3 24 horas	6	4,84	Coeficiente de correlação (r) = Valor de t (Student)= Nível de significância (Unilateral)=	-65,75% 2,308501849 2,72%
	5,5	2,16		
	4,2	1,88		
	6	0,6		
	6,7	0,24		
	7	0,32		
	4,7	4,84		
	5	4,32		
	4,2	5,48		
PR3 12 horas	6	3,76	Coeficiente de correlação (r) = Valor de t (Student)= Nível de significância (Unilateral)=	-65,46% 2,290688112 2,79%
	7	3,64		
	6,5	2,12		
	7	1,6		
	7,5	1,44		
	8	0,8		
	6	4,16		
	6,8	2,84		
	7,5	3,64		
7` 24 horas	4,5	0,25	Coeficiente de correlação (r) = Valor de t (Student)= Nível de significância (Unilateral)=	-33,13% 0,928934738 19,19%
	4	0,8		
	5	0,3		
	4	2,4		
	6	1,3		
	6	1,3		
	4,5	2,05		
	3	0,9		
	2,8	2,8		
7` 12 horas	4,4	0,85	Coeficiente de correlação (r) = Valor de t (Student)= Nível de significância (Unilateral)=	40,48% 1,171409784 13,99%
	4,3	0,65		
	6,3	1,05		
	6,2	1		
	6,3	4,35		
	5,5	1		
	4	0,65		
	4,5	2,15		
	4	1,45		
			Correlação geral Coeficiente de correlação (r) = Valor de t (Student)= Nível de significância (Unilateral)=	 3,10% 0,180785017 43,08%

APÊNDICE 2 - RESULTADOS DA SUBMISSÃO DAS SEQUÊNCIAS AO BANCO DE DADOS (BLAST) DO "NCBI"

- SEQUÊNCIA 14E1 / PROGRAMA BLAST X

SEQUÊNCIAS QUE PRODUZIRAM ALINHAMENTOS SIGNIFICATIVOS:

>[gi|40745674|gb|EAA64830.1|](#) hypothetical protein AN1710.2 [Aspergillus nidulans FGSC A4]

Length = 658

Score = 197 bits (500), Expect = 2e-49
Identities = 95/177 (53%), Positives = 122/177 (68%)
Frame = +3

Query: 216 ISRIDHLLPADLISKIGPHAFPAVDVFKLRLEDTPPSKVSRLISNFMKSPEARPFNIENPD 395
I R++HLLP DLI+KI P P V++FK+ D P+ +S I+ F+ SP PF ENP+

Sbjct: 348 IYRVEHLLPVDLINKITPLTNPIVEIFKINGNDNDPAAMSEFITKFLDSPAGAPFNENPE 407

Query: 396 GQPGVAVIDSSKPLRGLQIFGFEEAERXXXXXXXXXXVIMIQARKDEPFSGGSTKIGQL 575
G PG+ V D+ KPL GLQ FGF+AAE ++++QAR+ PF+GGST IG L

Sbjct: 408 GGP GIFVYDARKPLCGLQPF GFGQAAEYVEEIIIEPDHGDLLVMQAREAAPFTGGSTPIGDL 467

Query: 576 RLALHKAABAAGYLPQPEGFKFLWINDFPLFSPTNDTDPGQGGTAGLASTHHPFTAP 746
R AL+ AAV G+ P GF FLWI DFPLFSP+ D++PGQGG AG++STHHPFTAP

Sbjct: 468 RRALYSAAVETGFKPAAVGFDLWIVDFPLFSPSTDSEPGQGGAGISSTHHPFTAP 524

Score = 62.4 bits (150), Expect = 9e-09
Identities = 32/66 (48%), Positives = 42/66 (63%), Gaps = 1/66 (1%)
Frame = +2

Query: 11 EDVMDICIEGLIRRLWSEMPQSQTLP-LKFPRMTYNEAMAKYGSDKPDIRLGMEARFHPDLI 187
EDVM +EG+IRRLWS + P F R++Y +AM +YGSDKPD R GME L+

Sbjct: 296 EDVMRVVEGIIRRLWSTLMDTEAPSGPFRRLSYQDAMTRYGSDKPDTRYGMEIYRVEHLL 355

Query: 188 *IELSN 205
++L N

Sbjct: 356 PVDLIN 361

>[gi|32422681|ref|XP_331784.1|](#) hypothetical protein [Neurospora crassa]
[gi|28927528|gb|EAA36430.1|](#) hypothetical protein [Neurospora crassa]

Length = 715

Score = 140 bits (353), Expect(2) = 2e-37
Identities = 75/189 (39%), Positives = 104/189 (55%), Gaps = 8/189 (4%)
Frame = +3

Query: 207 PF*ISRIDHLLPADLISKIGPHAFPAVDVFKLRL----EDTPPSKVSRLISNFMKSPEAR 374
PF + R+DH+LPA +S I P V+ F++R E P ++ + M +

Sbjct: 388 PFELHRVDHVLPAQFVSMITHTEQPIVEAFRIRPQFDGETVTPGTIAEFVDKLMQDLP-K 446

Query: 375 PFIENPDGQPGVAVIDSSKPLRGLQIFGFEAAERXXXXXXXXXX--VIMIQARKDEPF 545
 P NPDG P + +S KPL GL GFE + V++ QARK+ PF
 Sbjct: 447 PLANNPDGAPALMFNSKKPLCGLSSLGFEFGDALTSMEAFSDLEDGDVLVVFQARKNAPF 506

Query: 546 SG-GSTKIGQLRLALHKAABAAGYLPQPEGFKFLWINDFPLFSPTNDTDPGQGGTAGLAS 722
 G GST +G R +++ V+AG LPQ KFLW+ +FP+F+P + DPGQGG AG +
 Sbjct: 507 QGEGSTALGVARTHFYRSFVSAGLLPQSFDLKFLWVNFPMFTPDGIDPGQGGQAGFKA 566

Query: 723 THHPFTAPV 749
 THHPFTAP+
 Sbjct: 567 THHPFTAPL 575

Score = 38.1 bits (87), Expect(2) = 2e-37
 Identities = 17/35 (48%), Positives = 24/35 (68%)
 Frame = +2

Query: 59 EMPSQTLPLKFPRMTYNEAMAKYGSDKPDIRLGME 163
 + P T P F R+TY+EAM ++G DKPD+R+ E
 Sbjct: 358 QWPEPTAP--FLRLTYDEAMTRFGIDKPDLRIPFE 390

>gi|33567122|emb|CAE76417.1| related to aspartate--tRNA ligase,
 mitochondrial (fragment)
 [Neurospora crassa]
 Length = 683

Score = 140 bits (353), Expect(2) = 2e-37
 Identities = 75/189 (39%), Positives = 104/189 (55%), Gaps = 8/189 (4%)
 Frame = +3

Query: 207 PF*ISRIDHLLPADLISKIGPHAFPAVDVFKLRL---EDTPPSKVSRLISNFMKSPEAR 374
 PF + R+DH+LPA +S I P V+ F++R E P ++ + M +
 Sbjct: 356 PFELHRVDHVLPAQFVSMITHTEQPIVEAFRIRPQFDGETVTPGTIAEFVDKLMQDLP-K 414

Query: 375 PFIENPDGQPGVAVIDSSKPLRGLQIFGFEAAERXXXXXXXXXX--VIMIQARKDEPF 545
 P NPDG P + +S KPL GL GFE + V++ QARK+ PF
 Sbjct: 415 PLANNPDGAPALMFNSKKPLCGLSSLGFEFGDALTSMEAFSDLEDGDVLVVFQARKNAPF 474

Query: 546 SG-GSTKIGQLRLALHKAABAAGYLPQPEGFKFLWINDFPLFSPTNDTDPGQGGTAGLAS 722
 G GST +G R +++ V+AG LPQ KFLW+ +FP+F+P + DPGQGG AG +
 Sbjct: 475 QGEGSTALGVARTHFYRSFVSAGLLPQSFDLKFLWVNFPMFTPDGIDPGQGGQAGFKA 534

Query: 723 THHPFTAPV 749
 THHPFTAP+
 Sbjct: 535 THHPFTAPL 543

Score = 38.1 bits (87), Expect(2) = 2e-37
 Identities = 17/35 (48%), Positives = 24/35 (68%)
 Frame = +2

Query: 59 EMPSQTLPLKFPRMTYNEAMAKYGSDKPDIRLGME 163
 + P T P F R+TY+EAM ++G DKPD+R+ E

Sbjct: 326 QWPEPTAP--FLRLTYDEAMTRFGIDKPDLRIPFE 358

>gi|46120751|ref|XP_385110.1| hypothetical protein FG04934.1 [Gibberella
zeae PH-1]
gi|42551953|gb|EAA74801.1| hypothetical protein FG04934.1 [Gibberella
zeae PH-1]
Length = 813

Score = 108 bits (270), Expect(2) = 1e-26
Identities = 58/166 (34%), Positives = 89/166 (53%), Gaps = 9/166 (5%)
Frame = +3

Query: 279 PAVDVFKLRLEDTPPSKVSRLISNFMKSPEARPFIEPNPDGQPGVAVIDSSKPLRGLQIFG
458
P ++ F L P++ +L++ FM + + +NPDG+P + V D PL+G G
Sbjct: 509 PLIEAFTFPLSTEDPNEARKLVTKFMDNLPSS-LADNPDGKPQILVCDRKAPLQGFSSLG
567

Query: 459 FEAAE--RXXXXXXXXXXVIMIQARKDEP--FSGGSTKIGQLRLALHKAABAAGYLPQP
626
FE + +++ QAR+ + GSTKIG +R AL K V G + +P
Sbjct: 568 FEFQDVIDLVAGEGVEQGD LVIFQAREKPKGQYCSGSTKIGDIRNALWKFLVEEGQMEKP
627

Query: 627 E-----GFKFLWINDFPLFSPTNDTDPGQGGTAGLASTHHPFTAPV 749
+F+W+ DFP+F PT +PGQ G AG+A++HHPFTAP+
Sbjct: 628 RLGDPGSLQFVWVTDFFPMFKPTEKGEPGQEGAAGIAASHHPFTAPL 673

Score = 33.9 bits (76), Expect(2) = 1e-26
Identities = 17/49 (34%), Positives = 26/49 (53%), Gaps = 6/49 (12%)
Frame = +2

Query: 56 SEMPSQTLPLK-----FPRMTYNEAMAKYGSDKPDIRLGMEARFHPDL 184
SE+P T P F + + + ++ YGSDKPD+R+ + PDL
Sbjct: 445 SEIPQGTRPADEPVAHTFTTLKFQDCISSYGS DKPDLRIPNKIHALPDL 493

>gi|23111406|ref|ZP_00097065.1| COG0173: Aspartyl-tRNA synthetase
[Desulfitobacterium hafniense]
Length = 572

Score = 62.0 bits (149), Expect = 1e-08
Identities = 28/51 (54%), Positives = 36/51 (70%)
Frame = +2

Query: 11 EDVMDCIEGLIRRLWSEMPSTLPLKFPRMTYNEAMAKYGSDKPDIRLGME 163
ED++ +E L+ R++ E + +P FPRMTY EAM YGSDKPDIR GME
Sbjct: 247 EDILPMMEELMARIFKETIGRIDIPRPFPRMTYQEAMELYGSDKPDIRFGME 297

Score = 34.7 bits (78), Expect = 2.0
Identities = 20/62 (32%), Positives = 30/62 (48%)

Frame = +3

Query: 564 IGQLRLALHKAABAAGYLPQPEGFKFLWINDFPLFSPTNDTDPGQGGTAGLASTHHPFTA 743
 +G LRL L K G +P+ + FLW+ +FPL + HHPFT+
 Sbjct: 406 LGHLRLELGKRL---GLIPE-DALNFLWVTEFPLLQWDEE-----DKRFVAIHHPFTS 454

Query: 744 PV 749
 P+
 Sbjct: 455 PM 456

>gi|19075277|ref|NP_587777.1| aspartyl-trna synthetase
 [Schizosaccharomyces pombe]
 gi|7491972|pir|T41563 hypothetical protein SPCC736.06 - fission yeast
 (Schizosaccharomyces pombe)
 gi|3845470|emb|CAA19270.1| SPCC736.06 [Schizosaccharomyces pombe]
 Length = 611

Score = 61.6 bits (148), Expect = 1e-08
 Identities = 32/80 (40%), Positives = 46/80 (57%), Gaps = 2/80 (2%)
 Frame = +3

Query: 513 IMIQARKDEPFSGGSTKIGQLRLALHKAABAAGYLPQPEG--FKFLWINDFPLFSPTNDT 686
 I+ + + G+T +G+LRL LH+ V LP+ + KF+W+ DFPLFSPT +
 Sbjct: 401 IVFMTNRPKYLVSGTTPLGKLRLLLLHELLVKKKALPELDKDLLKFVWVDFPLFSPTTEK 460

Query: 687 DPGQGGTAGLASTHHPFTAP 746
 + + STHHPFTAP
 Sbjct: 461 N-----QSITSTHHPFTAP 474

Score = 44.7 bits (104), Expect = 0.002
 Identities = 22/46 (47%), Positives = 29/46 (63%)
 Frame = +2

Query: 14 DVMDICIEGLIRRLWSEMPSTLPLKFPRMTYNEAMAKYGSDKPDIR 151
 ++M+ +E L+ RL S TL F +TY A+ KYGSDKPDIR
 Sbjct: 265 EIMEVVEDLLVRLVVSFAKGITLAKPFQHITYQHAIIDKYGSDKPDIR 310

- SEQUÊNCIA 17P3 / PROGRAMA BLAST X

SEQUÊNCIAS QUE PRODUZIRAM ALINHAMENTOS SIGNIFICATIVOS:

```
>gi|32422823|ref|XP_331855.1| predicted protein [Neurospora crassa]
gi|28927238|gb|EAA36193.1| predicted protein [Neurospora crassa]
gi|38567173|emb|CAE76466.1| hypothetical protein [Neurospora crassa]
Length = 1005
```

Score = 61.6 bits (148), Expect = **9e-09**
 Identities = 59/167 (35%), Positives = 71/167 (42%)
 Frame = +2

```
Query: 41 LEAIISSAALSKRAEMILANAKKRLNVCR*ISAKDLEARRQLTRLQLMEGNLRGARQSLLP 220
          L S+ ALS+RAE ILANAKKRL MEGNL AR SL
Sbjct: 273 LSTYSTTALSRRAEQILANAKKRLTT-----MEGNLSRARSSL-- 310

Query: 221 PPRPKYNSYIAPKRPSSVSPPIKGQGPFYIPQAQHAARSNATTPGHTRRHSEVSDMSQEN 400
          Y AP S +P P + + S+A GHTR SD++ N
Sbjct: 311 -----HYTAPSLSSDGTSPSPQRTASANSRNGGYRSSSANYSGHTRM---TSDIAMRN 360

Query: 401 TTPQRRRAQRAVSAMGSFRMQWPQTNPRQSMITLRGAKSQETIRHTW 541
          + QR+ SAMGS NPRQS + +KS E IR W
Sbjct: 361 GLPYRISVQRSHSAMGSH----GGNPRQS---ITASKSAEAIRGGW 399
```

```
>gi|46106321|ref|XP_380594.1| hypothetical protein FG00418.1 [Gibberella
zeae PH-1]
gi|42545924|gb|EAA68767.1| hypothetical protein FG00418.1 [Gibberella
zeae PH-1]
Length = 901
```

Score = 44.7 bits (104), Expect = 0.001
 Identities = 43/166 (25%), Positives = 66/166 (39%)
 Frame = +2

```
Query: 29 EELDLEAIISSAALSKRAEMILANAKKRLNVCR*ISAKDLEARRQLTRLQLMEGNLRGARQ 208
          E++ + S+++LS RAE ILANAK+RL MEGNL A+
Sbjct: 220 EDISNQRYSTSSLSRAEQILANAKQRLTA-----MEGNLYRAKG 259

Query: 209 SLLPPPRPKYNSYIAPKRPSSVSPPIKGQGPFYIPQAQHAARSNATTPGHTRRHSEVSDM 388
          SL P +P P P + A + + GH+R SE
Sbjct: 260 SLYSP-----TSDGSTPSPSIARPATSLRESGAGLGSGSVQGHSRNTSENKFH 307

Query: 389 SQENTTTPQRRRAQRAVSAMGSFRMQWPQTNPRQSMITLRGAKSQET 526
          + + T +R+ A+ A G +R + ++ GA SQ +
Sbjct: 308 NGIASPTFPQRSASALGAAGGYRQPLTSSRSADALGIGYGASSQRS 353
```

```
>gi|38101823|gb|EAA48726.1| hypothetical protein MG00384.4 [Magnaporthe
grisea 70-15]
Length = 878
```

Score = 38.9 bits (89), Expect = 0.062
 Identities = 42/170 (24%), Positives = 67/170 (39%)

Frame = +2

```

Query: 59  AALSKRAEMILANAKKRLNVCR*ISAKDLEARRQLTRLQLMEGNLRGARQSLLPPRPKY 238
          A+LS+RAE+ILANAK+RL                      MEGNL  AR +L      +
Sbjct: 208 ASLSQRAELILANAKRRLTT-----MEGNLNRARNTL-----HSH 242

Query: 239 NSYIAPKRPSSVSPPIKGQGPFIYIPQAQHAARSNATTPGHTRRHSEVSDMSQENTTTPQR 418
          +  ++          +P P                      R+  +PGH+R  SE  +      +
Sbjct: 243 SPSLSSLGSECSTPSP-----TRAFVVSPGHSRMGSENTFRIGLPVKVYPQ 288

Query: 419 RAQRAVSAMGSFRMQWPQTNPRQSMITLRGAKSQETIRHTWVSGEQQSYR 568
          R+  A+ A G +R                      L  ++S + IRH+  G  +  ++
Sbjct: 289 RSASAMGAAGGYRQ-----PLTTSRSVDNIRHSAHDGPRSDHK 326

```

>gi|40746670|gb|EAA65826.1| hypothetical protein AN1233.2 [Aspergillus
nidulans FGSC A4]
Length = 757

Score = 37.7 bits (86), Expect = 0.14
Identities = 47/149 (31%), Positives = 59/149 (39%), Gaps = 13/149 (8%)
Frame = +2

```

Query: 44  EAISSAALSKRAEMILANAKKRLNVCR*ISAKDLEARRQLTRLQLMEGNLRGARQSLLPP 223
          E +S+  L   AE IL NAK+RL+                      LMEGNL  AR S  +
Sbjct: 215 EDLSAIIIESEAERILENAKRRLS-----LMEGNLTRAR-STMRS 253

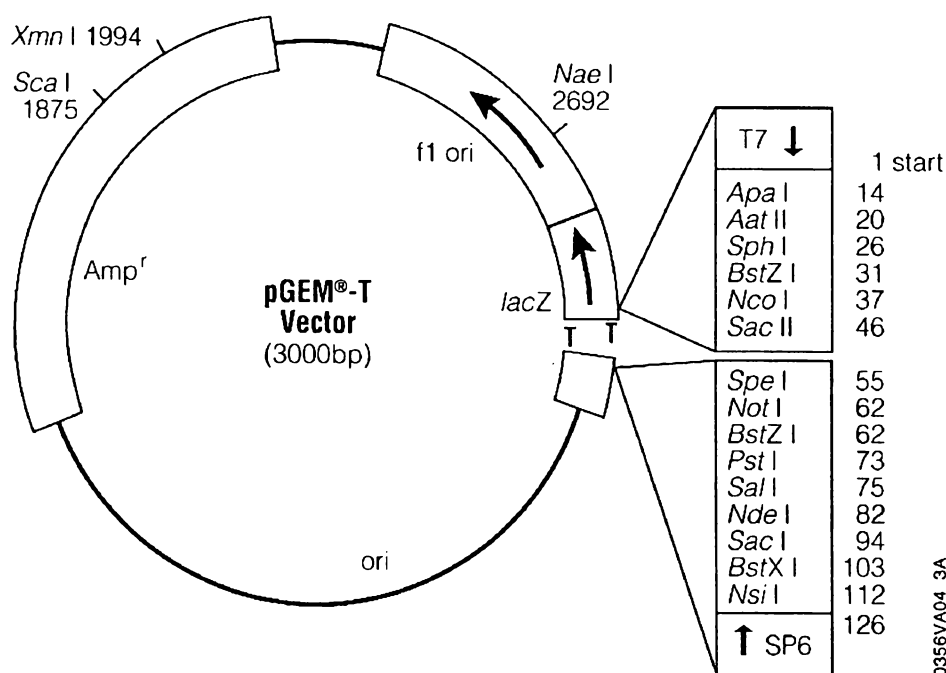
Query: 224 PRPKYNSYIAPKRPSSVSPPIKGQGPFIYIPQAQHAA---RSNATTPGHT-----RRH 370
          P  +S  P  PS      P G      + Q+ H A  RS+  P  T      RH
Sbjct: 254 TTPSLSSSPVPSAPSPGLGQPVGG----LYQSIHRAADRRSSNLRPRQTYKSQVTSNNRH 309

Query: 371 SEVSDMSQ--ENTTTPQRRRAQRAVSAMGS 451
          S V  +  N      +  R+VSAMGS
Sbjct: 310 SRVYSETNLPSNPRDVGKTMSRSVSAMGS 338

```

ANEXO

MAPA DO PLASMÍDEO pGEM-T



pGEM®-T Vector Sequence - Promega Corporation, Madison WI.

pGEM®-T Vector sequence reference points:

Base pairs	3000
T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10-113
SP6 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	124-143
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	126
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	161-177
lacZ start codon	165
lac operator	185-201
beta-lactamase (Amp ^r) coding region	1322-2182
phage f1 region	2365-2820
lac operon sequences	2821-2981, 151-380
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2941-2957
T7 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	2984-3

The sequence supplied below is that of the circular pGEM(R)-5zf(+) Vector from which the pGEM(R)-T Vector is derived. The pGEM(R)-T Vector has been linearized with EcoR V at base 51 (*) and a T-residue has been added to both 3'-ends. The added T is not included in this sequence.