



Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
E CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

LUCAS BRESEGHELO DO NASCIMENTO

ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Sclerotinia
sclerotiorum*

Goiânia

2010



Breseghele do Nascimento

ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Sclerotinia sclerotiorum*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Universidade Federal de Goiás, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biologia. Área do conhecimento: Biologia Molecular.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Silvana Petrofeza da Silva

Goiânia

2010

GRADECIMENTOS

Em primeiro lugar à Deus, por ter me auxiliado em todas as fases desse trabalho.

À professora Dr.^a Silvana Petrofeza, pela oportunidade oferecida desde a iniciação científica até a conclusão desse trabalho, orientando não só no sentido acadêmico, mas também no sentido moral e ético.

Ao Dr. Murillo Lobo Júnior, por ter cedido parte dos isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* utilizados no trabalho.

A Juliana de Carvalho pelo apoio moral e ajuda com a dissertação.

Aos colegas de laboratório Marília, Ana Paula, Camila, Elvira e Deyze que ajudaram direta e indiretamente na conclusão deste trabalho, e também aos que são vizinhos de laboratório e de prédio, Lorena, Sid e Rodolfo, obrigado pelo incentivo. Edevaldo e Arthur Melo pelo auxílio com os programas e figuras. Muito Obrigado.

RESUMO

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* está entre os fitopatógenos mais bem sucedidos, onívoros e sem hospedeiros definido, é considerado um dos patógenos fúngicos mais importantes no mundo. Está distribuído em todas as regiões produtoras, sejam elas temperadas, subtropicais ou tropicais. O fungo produz estruturas de resistência denominadas escleródios, na superfície e no interior dos tecidos colonizados. Estes retornam ao solo com os resíduos da cultura e são responsáveis pela sobrevivência do fungo na mesma área por até 8 anos. Os objetivos desse trabalho foram quantificar a variabilidade intra e inter populacional do fungo *S. sclerotiorum* em culturas de feijão e soja de diferentes localidades produtoras dessas espécies. Para isso foram coletados 46 isolados de *S. sclerotiorum* de seis locais de produção de grãos em diferentes regiões do Brasil. Os locais escolhidos foram Monte Carmelo-MG, Formosa-GO, Lucas do Rio Verde-MT, Montividiu-GO, Londrina-PR e Santo Antonio de Goiás-GO em todas as áreas o hospedeiro de origem da coleta foi o feijoeiro, com exceção de Londrina-PR, na qual o hospedeiro foi soja. Foi feito um estudo populacional do fungo através de marcadores do tipo RAPD com a utilização de 13 primers para a análise da variabilidade genética do fungo. Paralelamente também foram feitos testes para a formação de grupo de compatibilidade micelial entre os isolados e testes de produção de enzimas hidrolíticas. A análise estatística dos dados se deu através do programa Arlequin, o qual indicou variabilidade de 16,94% entre populações e 83,06% dentro de populações. Foram formados 10 grupos de compatibilidade micelial sem especificidade de populações. As atividades enzimáticas realizadas indicaram diferenças significativas dentro de populações de todas as enzimas. A comparação entre populações também indicou diferenças significativas entre populações nas enzimas poligalacturonases, 1,3- -glucanase e xilanase. Os resultados indicaram baixo nível de variabilidade entre populações e alta variabilidade dentro as populações.

ABSTRACT

The fungus *Sclerotinia sclerotiorum* is among the most successful pathogens, omnivores, and without specific hosts, is considered one of the most important fungal pathogens in the world. Is distributed in all producing regions, temperate, subtropical or tropical. The fungus produces resistant structures called sclerotia on the surface and within tissues colonized, they returned to the soil with crop residues and are responsible for the survival of the fungus in the same area for up to eight years. The objectives of this study were to quantify the variability within and between populations of the fungus *S. sclerotiorum* in bean and soybean crops in different producing places of those varieties. 46 isolates were collected of *S. sclerotiorum* in six locals of grain production in different regions of Brazil. The sites chosen were Monte Carmelo-MG, Formosa-GO, Lucas do Rio Verde-MT, Montividiu-GO, Londrina, PR and Santo Antonio de Goiás-GO. All areas of the original host of the gathering was the bean with the exception of Londrina-PR in which the host was soybeans. A population study of the fungus through RAPD markers using 13 primers was carried out for the analysis of genetic variability of the fungus. In parallel, tests were also made for the Mycelial compatibility groups among isolates and test production of hydrolytic enzymes. The statistical analysis was performed using the Arlequin software, which indicated variability among populations of 16.94% and 83.06% within populations. Were found 10 mycelial compatibility groups without specific populations. Enzyme activities performed indicated significant differences within the populations of all enzymes, a comparison between populations also showed significant differences among populations in polygalacturonases, 1,3- β -glucanase and xylanase. The results indicate a high level of variability within populations and low variability among populations

Figura 1. Mapa da localização das regiões onde os escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> foram coletados.	14
Figura 2. Teste de compatibilidade micelial entre dois isolados coletados.	22
Figura 3. Gráfico indicativo da quantidade de isolados contidos em cada grupo de compatibilidade micelial obtido.	23
Figura 4. Atividade enzimática das poligalacturonases em meio sobrenadante de isolados de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> crescidos em meio mínimo e extrato de parede de feijoeiro como fonte de carbono.....	24
Figura 5. Atividade enzimática das xilanases em meio sobrenadante de isolados de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> crescidos em meio mínimo e extrato de parede de feijoeiro como fonte de carbono.	26
Figura 6. Atividade enzimática das 1,3- -glucanase em meio sobrenadante de isolados de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> crescidos em meio mínimo e extrato de parede de feijoeiro como fonte de carbono.	27
Figura 7. Atividade enzimática das 1,4- -glucanase em meio sobrenadante de isolados de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> crescidos em meio mínimo e extrato de parede de feijoeiro como fonte de carbono.	28
Figura 8 - Perfil eletroforético do produto de amplificação dos primers OPC2 (A) e OPC4 (B) nas seis populações de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	29
Figura 9 - Dendograma representativo das distâncias genéticas entre as populações de <i>S. sclerotiorum</i>	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primers selecionados para amplificação do DNA dos isolados.....	18
Tabela 2 - Lista de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> coletados em diversas regiões do Brasil.....	20
Tabela 3 - Número de isolados e grupos de compatibilidade miceliais (MCGs) observados em cada local de coleta.....	23
Tabela 4 - Análise por marcadores RAPD da estrutura genética de populações de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> de diferentes regiões e plantas hospedeiras.	30
Tabela 5 - Resumo da análise de variância molecular (AMOVA).	30

AMOVA: Análise molecular de variância

DNA: deoxyribonucleic acid - Ácido desoxirribonucleico

PCR: Polimerase Chain Reaction-Reação em cadeia da polimerase

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA - Amplificação ao acaso dos polimorfismos do DNA

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism - Polimorfismo no comprimento de Fragmentos de restrição

G: gravidade

EDTA: Ethylene Diamine tetraacetic acid - Ácido Diamino Etano Tetracético

TBE : Tris Borate EDTA

CTAB : Cetyl trimethyl ammonium bromide - Brometo de amôniohexadecil trimetil catiônico

SUMÁRIO

	1
1.1. A ESPÉCIE.....	1
1.2. MARCADORES MOLECULARES	3
1.2.1. Marcadores RAPD.....	4
1.2.2. Variabilidade genética de <i>S. sclerotiorum</i> através de marcadores moleculares.....	5
1.3. ENZIMAS HIDROLÍTICAS	7
1.3.1. Poligalacturonases	7
1.3.2. Xilanases.....	9
1.3.3. Glucanases	9
1.4. COMPATIBILIDADE MICELIAL.....	11
2. JUSTIFICATIVAS.....	11
3. OBJETIVOS	13
4. METODOLOGIA DA PESQUISA.....	14
4.1. COLETA DOS ISOLADOS.	14
4.2. CRESCIMENTO DE <i>S. SCLEROTIORUM</i> EM MEIO LÍQUIDO.	15
4.3. TESTE DE COMPATIBILIDADE MICELIAL	15
4.4. TESTE DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS	15
4.4.1. Ensaio de atividade das Poligalacturonases.....	15
4.4.2. Ensaio de atividade das Xilanases.	16
4.4.3. Ensaio de atividade de -1,3-glucanase	16
4.4.4. Ensaio de atividade de -1,4-glucanase	16
4.5. EXTRAÇÃO DO DNA	17
4.6. SELEÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS	17
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA GERAL.....	19
5. RESULTADOS.....	20
5.1. COLETA DE ISOLADOS DE <i>SCLEROTINIA SCLEROTIORUM</i>	20
5.2. GRUPO DE COMPATIBILIDADE MICELIAL.....	21
5.3. PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS	24
5.3.1. Atividade das Poligalacturonases	24
5.3.2. Atividade das Xilanases.....	25
5.3.3. Atividade da 1,3- -glucanase	26
5.3.4. Atividade da -1,4-glucanase	27
5.4. SELEÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS	28
6. DISCUSSÃO	32
7. CONCLUSÕES	36
8. PERSPECTIVAS	37
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

1.1. A espécie

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) De Bary é um fungo fitopatogênico de amplo espectro de hospedeiros, infectando cerca de 75 famílias, 278 gêneros e 408 espécies ou variedades de plantas. Com exceção de uma espécie da divisão Pteridófitas, todos os hospedeiros de *S. sclerotiorum* pertencem às classes Gimnosperma e Angiosperma, sendo a maioria pertencente à subclasse dicotiledônea, e poucos exemplares da subclasse monocotiledônea (BOLAND; HALL, 1994). Entre estas se destacam várias culturas de interesse comercial como, feijão, amendoim, alface, batata, tremoço, cenoura, ervilha, fumo, girassol, soja e tomate (BOLAND; HALL, 1994). Dentre as culturas comerciais afetadas, a do feijoeiro é uma das que mais sofre perdas na produção, sendo o número de sementes por planta e seu peso os componentes de rendimento mais afetados, trazendo enormes prejuízos ao nosso país por sua importância socioeconômica (HALL; NASSER, 1996).

O fungo *S. sclerotiorum* ocorre em locais de clima ameno e úmido e ataca severamente quando as temperaturas variam de 15°C a 20°C (JONES *et al.*, 1991), as quais são comuns em várias regiões do Brasil. A ocorrência de alta umidade do ar e água livre nas plantas por certo período favorece a germinação de estruturas de resistência do fungo presentes no solo, um importante fator para o ciclo da doença causada pelo *S. sclerotiorum* (HUNTER *et al.*, 1984).

Essa doença é encontrada por todas as regiões onde o clima seja propício, o que engloba desde a Região Sul do Brasil, até regiões dos cerrados com altitudes superiores a 800 metros. É um patógeno comumente associado a perdas significativas de produção em plantações comerciais de feijão irrigadas por pivô central no Distrito Federal. Em soja, as perdas devido à ocorrência desse patógeno variaram de 11,5% a 61% durante a safra 2000/2001, na região sul do Paraná (YORINORI; FEKSA, 2001). Em feijão é estimado que as perdas possam chegar a 50% (EMBRAPA, 2007), ou mesmo a 100% (FERDINANDO, 1980).

Na agricultura o cultivo contínuo de espécies por tempo prolongado, principalmente de hortaliças como tomate, ervilha e feijão é comum. Isso provoca a ocorrência de vários tipos de patógenos dentre eles *S. sclerotiorum*, causado principalmente pela pouca diversidade de cultivares, rotação de culturas inadequada, alta densidade de inóculo, incidência de temperaturas e umidades favoráveis aos patógenos (LOBO JUNIOR, 1999).

luz uma série de enzimas, incluindo pectinases, beta-1,3-galactosidases, xilanasases e cutinases, que atuam no processo de infecção do hospedeiro. Muitas dessas são isoenzimas que se diferem pelo seu ponto isoelétrico, massa molecular, processamento e regulação na transcrição (KEON *et al.*, 1987). Em cultura, a expressão destas enzimas pelo *S. sclerotiorum* é regulada pelas características da fonte de carbono e nitrogênio presentes no meio em que se encontra (ALGHISI; FAVARON, 1995), ou seja, pode haver indução ou repressão dos genes ligados a enzimas de degradação dos compostos da planta, o que permite ao patógeno se adaptar a fonte de carbono presente no local, tornando a obtenção de nutrientes o mais eficiente possível.

Após a completa eliminação do hospedeiro ou na escassez de fonte de nutrientes o fungo finaliza seu ciclo de vida formando estruturas de resistência denominadas escleródios. Estes auxiliam a sobrevivência do fungo mantendo o potencial de germinação durante longo período em que uma nova fonte de alimento esteja disponível (ADAMS; AYERS, 1979). Os escleródios são estruturas formadas por hifas densamente entrelaçadas revestidas por uma camada negra de melanina, composto este importante para a proteção contra condições adversas e degradação microbiana (HENSON *et al.*, 1999). A formação de escleródios só ocorre em ambientes com baixo pH, sendo que mutantes de *S. sclerotiorum* incapazes de produzir ácido oxálico não produzem escleródios (DICKMAN; MITRA, 1992).

O micélio é composto por hifas hialinas multicelulares, o escleródio é formado pelo agrupamento de uma grande quantidade de hifas o que forma um corpo duro e compacto, de vários formatos e tamanhos o que varia de poucos milímetros até vários centímetros de comprimento (MASIREVIC; GULYA, 1992). Duas formas de germinação podem ocorrer a partir do escleródio: uma miceliogênica, formando somente hifas e outra carpogênica, produzindo apotécios (ZIMMER; HOES, 1978). Os apotécios são estruturas reprodutoras com formato de taça responsável pela disseminação dos esporos sexuais de *Sclerotinia sclerotiorum* (ascósporos), possuem cor bege e tamanho variando de 4 a 9 mm. Solos úmidos por um longo período são essenciais para a formação de apotécios. Estas condições variam com temperaturas de 15 a 18 °C durante 10 a 14 dias (WEISS, 1980).

Durante o ciclo de vida da *S. sclerotiorum* ocorrem dois tipos de reprodução dependendo das condições ambientais. A reprodução sexuada ocorre com a produção de apotécio e a assexuada com o micélio produzindo hifas as quais podem atacar diretamente os tecidos da planta. As hifas produzidas pelos dois tipos de reprodução são septadas e multinucleadas de cor branca.

S. sclerotiorum em campo pode iniciar-se através da germinação de escleródio no solo. Os ascósporos se

instalam em partes vegetais senescentes como pétalas, folhas ou frutos. Em condições ideais de temperatura, luz e umidade os escleródios podem germinar carpogênicamente e criar múltiplos apotécios os quais podem produzir na faixa de 3×10^7 ascósporos (ABAWI; GROGAN, 1979). Esses se instalam em partes vegetais senescentes como pétalas, folhas ou frutos e em geral, o ataque direto a tecidos saudáveis não ocorre (LUMSDEN, 1976). Aos poucos o processo de infecção se alastra pelas partes vivas da planta colonizando-a por completo. Essa invasão dos tecidos ocorre com auxílio de apressórios, estruturas multicelulares formadas pela ramificação de uma única hifa (HEGEDUS; RIMMER, 2005).

Os apressórios fornecem uma forte ligação entre o fungo e a superfície do hospedeiro exercendo força mecânica que auxilia na penetração do fungo através da cutícula da planta. Após a penetração ocorre a formação de uma vesícula na ponta do apressório, onde há várias enzimas de degradação. Após a instalação do fungo em tecidos saudáveis, ocorre liberação local de ácido oxálico. A função deste ácido já é bem conhecida em fungos necrotróficos possuindo vários papéis importantes durante o processo infeccioso (DUTTON; EVANS, 1996).

1.2. Marcadores moleculares

Os marcadores moleculares representam qualquer tipo de informação molecular que possa fornecer um polimorfismo rastreável entre um conjunto de organismos que se deseja comparar. Estes marcadores permitem a possuir várias funções dentro da análise genética, entre elas a identificação de indivíduos, clones, na estimativa de variabilidade genética, fluxo gênico, taxa de cruzamento e na construção de cladogramas genéticos (WILLIAMS *et al.* 1990; WELSH; McCLELLAND 1990). Existem vários tipos de marcadores moleculares, entre eles os RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLPs, (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), ITS (*Internal Transcribed Spacer*), e destacando-se a técnica de Microsatélites (ZUCCHI, 2002).

O conhecimento sobre a estrutura genética populacional e as formas de transmissão de caracteres genéticos ao desenvolver estratégias de resistência ao patógeno e controle da doença auxilia na criação de novos métodos de controle da doença. Um exemplo é o estudo do patógeno *Ascochyta rabiei* que ataca o grão de bico (*Cicer arietinum*), que revelou diferenças genéticas entre populações de viveiros e campos comerciais, confirmando que a

1.2.1. Marcadores RAPD

A partir do descobrimento de que a utilização de um primer único, mais curto, de sequencia arbitrária para dirigir a reação de amplificação de DNA, poderia ser utilizado para analisar variabilidade genética, houve significativo avanço na análise genômica por marcadores moleculares baseados em PCR, o qual eliminava a necessidade de conhecimento prévio da sequencia do DNA. A utilização de marcadores genéticos baseados em polimorfismo de DNA tem crescido a cada ano e tem sido uma valiosa ferramenta complementar em pesquisas de diversidade genética e de virulência (DUTECH *et al.*, 2007).

A presença ou ausência de fragmento amplificado pela reação de PCR em DNAs diferentes determina o nível de polimorfismo existente dentro de uma população (CRUZ, 1998). A análise de RAPD é amplamente utilizada como ferramenta para análise de variabilidade genética mesmo possuindo dificuldades para padronização da técnica, devido as suas variações intrínsecas.

A técnica de RAPD se baseia no uso de marcadores moleculares, normalmente um por reação, contendo todas as bases nitrogenadas sendo que a quantidade de G + C entre 50 a 70 % (FRITSCH; RIESEBERG, 1996). Esses marcadores não possuem sequencia específica para a espécie, no geral são do tipo arbitrário contendo até 10 nucleotídeos. Por serem de tamanho pequeno, podem se anelarem durante a reação de polimerase em diferentes lugares do genoma gerando como produto da amplificação diversos fragmentos (WILLIAMS *et al.*, 1990). A alteração, deleção ou inserção de uma base em determinado local do genoma pode impedir o anelamento do primer e amplificação da região, essas alterações de bases permitem à técnica de RAPD detectar polimorfismos nos indivíduos da espécie estudada. Estas alterações são de característica binária, presença ou ausência do fragmento amplificado após separação em gel (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

Vantagens e limitações

O uso do RAPD se destaca principalmente por ser de simples utilização, rápida obtenção de resultados, necessidade de pequena quantidade de DNA para as amplificações e utilização da técnica em espécies as quais não se possui conhecimento prévio de genoma

ização de primer aleatórios permite obtenção de grande se um maior número de primers é possível localizar polimorfismos em espécies com alto nível de semelhança (HADRYIS, *et al.*, 1992). Essa amplificação ocorre sobre regiões condantes e não codantes, regiões repetitivas ou de sequência aleatória demonstrando a abrangência sobre o genoma (FRITSCH; RIESEBERG, 1996). A técnica tem como limitação a característica ser do tipo dominante, não consegue distinguir indivíduos heterozigotos e produz menor quantidade de informação por loco quando comparado com técnicas de utilizando marcadores co-dominantes. Outro fator que necessita de atenção especial no RAPD é a baixa repetibilidade das banda o que pode ser contornado utilizando de protocolos bem otimizados (RABOUAM *et al.*, 1999) e programa de PCR.

Aplicações da técnica de RAPD

A técnica de RAPD tem sido utilizada na realização de análises genéticas de diferentes microorganismos, animais e plantas, sendo principalmente utilizado na determinação da diversidade e estrutura genética em populações naturais como também no estabelecimento de relações filogenéticas e diferenciação de espécies próximas (WOLFF; MORGAN-RICHARDS, 1998).

É possível escanear por inteiro o genoma com esta técnica possuindo um conjunto de marcadores polimórficos de DNA. Os principais problemas com a técnica de RAPD é a reprodução dos resultados e obtenção de bandas homogêneas.

A técnica de RAPD já foi demonstrada eficiente por vários motivos, entre eles a confiabilidade dos dados, o fato de não ser influenciado por condições ambientais e rapidez e precisão na detecção (FALEIRO *et al.*, 2003) A análise do DNA é uma ferramenta muito eficiente para responder as questões relacionadas à distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações. O acesso imediato, baixo custo e a transferibilidade de utilização dos primers entre as espécies são características que tem tornado os marcadores RAPD intensamente usados.

1.2.2. Variabilidade genética de *S. sclerotiorum* através de marcadores moleculares

O fungo *S. sclerotiorum* tem se demonstrado ser em várias regiões de clima temperado como sendo de reprodução do tipo clonal. Cubeta *et al.* (1997) e Kohn (1995) mostraram que populações de *S. sclerotiorum* em culturas de repolho na região leste do Estado da Carolina

canola no Canadá são principalmente clonais. Kohn *et al.* marcadores genéticos como RFLPs, sondas nucleares e mitocondriais, foi verificado que isolados dentro do mesmo grupo de compatibilidade micelial eram geneticamente uniformes.

Trabalhos utilizando a técnica de DNA *fingerprint*, têm demonstrado que no sul da ilha de Nova Zelândia, onde foram coletados 75 isolados de *S. sclerotiorum* em quatro populações diferentes, existe alto nível de variação dentro e entre essas populações (CARPENTER, *et al.*, 1999).

No trabalho de SUN *et al.* (2005) foi analisada a diversidade e estrutura genética de uma população com isolados de *S. sclerotiorum* provenientes de diferentes regiões e plantas hospedeiras utilizando a técnica de RAPD. Dentre os isolados selecionados verificou-se alta taxa de similaridade genética, sendo que o cálculo do índice de diversidade de Nei obteve valor de 0,197, e o índice de Shannon's, valor de 0,300. A análise de variância molecular (AMOVA) revelou que a percentagem de variância entre e dentro das populações foi de 50.62% e 49.38%, respectivamente. A diferenciação genética entre e dentro das populações foram altamente significativas ($P < 0.001$).

Outro método de detecção de variabilidade genética como a amplificação de regiões microssatélites também já foram utilizados com sucesso em *S. sclerotiorum*. Sirjusingh e Kohn (2001) utilizaram esta técnica para obter marcadores moleculares em isolados de *S. sclerotiorum* provenientes do Canadá. A partir de 25 oligonucleotídeos utilizados, foram amplificados produtos não específicos de 23 *loci* contendo microssatélites e 2 *loci* polimórficos de microssatélites, com dois a dez alelos em cada *locus* deste fungo.

Sexton e Howlett (2004) trabalharam com isolados de *S. sclerotiorum* provenientes de cultura de canola na Austrália utilizando marcadores do tipo microssatélites. Nesse trabalho foram utilizados oito conjuntos de marcadores descritos por Sirjusingh e Kohn (2001) o qual foram obtidos variabilidade genotípica de 36% a 80% e diversidade alélica de 0,23 a 0,79. A análise desses dados dessas quatro populações indicou uma possível reprodução do tipo sexuada e assexuada.

Isolados de *S. sclerotiorum*, obtidos do estado de Washinton, EUA, foram utilizados por Atallah *et al.* (2004) em estudo com marcadores do tipo microssatélites. Foi detectado alta taxa de variabilidade genética entre os isolados sendo a maior parte dentro das subpopulações. Os dados também sugerem que o tipo de reprodução seja do tipo sexuada e assexuada.

genética com *S. sclerotiorum* no Brasil foram feitos com (HARDT *et al.*, 2002). Foram utilizados 23 isolados do fungo obtidos do estado de São Paulo e Minas Gerais, estes apresentaram variabilidade genética limitada, dos três oligonucleotídeos microssatélites testados, apenas um produziu padrão de bandas polimórfico em cinco isolados. Gomes *et al.* (2010) utilizaram 79 isolados de *S. sclerotiorum* de quatro populações diferentes em análise da diversidade gênica. Foram analisados 10 regiões de microssatélites, além da análise de região ITS (internal transcribed spacer) por RFLP e sequenciamento, para caracterizar a diversidade genética das quatro populações obtidas. Os resultados obtidos por RFLP falharam em indicar diferenças genéticas entre os isolados, porém a análise do sequenciamento indicou alta variabilidade entre e dentro as populações analisadas.

1.3. Enzimas hidrolíticas

Para penetrar a parede celular da planta o fungo libera uma série de enzimas com diferentes especificidades de substrato as quais facilitam a penetração do patógeno no hospedeiro. Dentre elas existem poligalacturonases, pectinases, xilanases e outras enzimas de função degradadora e/ou provedora de nutrientes para o fungo.

1.3.1. Poligalacturonases

A pectina é um heteropolissacarídeo de estrutura complexa composto principalmente de monômeros de ácido D-galacturônico ligados por uma ligação do tipo α -1,4 presente em grande parte da parede celular das plantas. A hidrólise da pectina pelas poligalacturonases (PGs) enfraquece a parede da célula e facilita a penetração e a colonização de vários fungos. Estas pectinases são de grande importância como fator de virulência para muitos fitopatógenos. Genes para as PGs foram descritos em vários fungos fitopatogênicos como *Sclerotinia sclerotiorum* (FRAISSINET-TACHET *et al.*, 1995), *Botrytis cinerea* (WUBBEN *et al.*, 1999), *Aspergillus flavus* e *Fusarium oxysporum*.

S. sclerotiorum produz várias formas de poligalacturonases, essas atuam no processo inicial de infecção do fungo degradando os polímeros de pectina presentes na lamela média e na parede celular primária de plantas superiores, e, portanto, são capazes de enfraquecer as células da parede celular e macerar seu tecido (SELLA *et al.*, 2005).

Um dos fatores essenciais que desencadeiam a infecção é a produção de ácido oxálico (HEGEDUS; RIMMER, 2005; BOLTON *et al.*, 2006). Isolados de *S. sclerotiorum* que produzem maiores quantidades de ácido oxálico tendem a ser mais infecciosas do que

O ácido oxálico possui uma série de funções na *S. sclerotiorum*, mas também em vários outros fungos (WALTON, 1994). Além de participar da acidificação do ambiente, o que maximiza a atividade das poligalacturonases e impede proteínas inibidoras de PGs (PGIPs) de agirem (FAVARON *et al.* 2004), o ácido oxálico sequestra o cálcio presente na lamela média em forma de cristais de oxalato, ajudando no enfraquecimento dos tecidos. A expressão de genes ligados as PGs é aumentada quando o pH fica abaixo de 3,8 (COTTON *et al.*, 2003). O ácido oxálico também inibe mecanismos de defesa da planta como a atividade da fenol oxidase e a ação de eventuais enzimas inibidoras de poligalacturonases liberadas pela planta na tentativa de combater o ataque do fungo (FAVARON *et al.*, 2004). Estudos mostram que mutantes deficientes neste ácido se mostraram não patogênicos (GODOY *et al.*, 1990) e soja transgênica capaz de oxidar o oxalato através de enzimas específicas são resistentes ao patógeno *S. sclerotiorum* (DONALDSON *et al.* 2001), isto indica a essencialidade deste ácido para a patogenicidade do fungo.

A atividade das PGs é induzida por pectina ou seus monômeros (monossacarídeos) como o ácido galacturônico, porém, é reprimida por açúcares simples como a glicose (FRAISSINET-TACHET; FÈVRE, 1996; RIOU *et al.*, 1992). Trabalhos indicam as poligalacturonases como possíveis fatores de virulência em que indivíduos mutantes não produtores desta enzima são incapazes de penetrar seu hospedeiro (GAO *et al.*, 1996).

Durante o crescimento saprofítico *in vitro* o aumento da atividade das PGs foi resultado da produção de pelo menos 16 isoformas com ampla variedade de pontos isoelétricos (MARTEL *et al.*, 1996). Atualmente foram isolados genes codificando apenas seis tipos de PGs (Li *et al.*, 2004). Modificações ocorridas após os processos de tradução (glicosilação) e de secreção (proteolíticas) podem vir a explicar a multiplicidade de enzimas hidrolíticas secretadas por fungos filamentosos (FRAISSINET-TACHET *et al.*, 1995). Estudos recentes mostram que dentre 5 endopoligalacturonases existem diferentes propriedades bioquímicas e atividades necrológicas em diferentes hospedeiros (KARS *et al.*, 2005), atuando em diversos estágios da infecção.

Diversas isoformas das poligalacturonases são produzidas por *S. sclerotiorum* tanto em cultura quanto em planta, entretanto, seu número total e propriedades diferem extensivamente entre os isolados fúngicos e na expressão temporal desses genes (FAVARON *et al.*, 1992; MARCIANO *et al.*, 1982; RIOU *et al.*, 1992). Por exemplo, estudos de Kasza *et al.* (2004) demonstram por Northern blot que os genes PG1, PG2 e PG3 são expressos apenas na colonização, em 96 horas não são mais detectados. Por RT-PCR foi observado que os

o final do período de 96 horas e PG5 apenas entre 48 e 72
grande variedade de enzimas garante ao fungo sua grande
flexibilidade e capacidade de adaptação a vários hospedeiros.

1.3.2. Xilanases

A xilana é um polissacarídeo é predominante na hemicelulose presente na parede celular de plantas, a β -1,4-Xilana é o segundo polissacarídeo mais abundante na Terra. As xilanases são uma classe de enzimas que degradam componentes da parede celular vegetal. Esta enzima atua degradando o polissacarídeo linear β -1,4-xilano em xilose (BELIËN *et al*, 2007). A xilanase é produzida por uma grande variedade de organismos incluindo bactérias, fungos e plantas. É de significativa importância em muitos processos fisiológicos, patológicos e também em muito processos biotecnológicos que envolvem degradação ou remodelamento da parede celular vegetal.

As xilanases secretadas por micro-organismos fitopatogênicos são considerados em alguns casos (BILIËN, *et al* 2006) componentes essenciais para a colonização do parasita no tecido vegetal. As xilanases são atualmente utilizadas em processos biotecnológicos como branqueamento de pasta base para papel (BAJPAI, *et al*, 2004) bioconversão de resíduos agrícolas para etanol (SAHA, *et al*, 2003) e processamento de alimentos industrializados (BRUFAU, *et al*, 2006).

1.3.3. Glucanases

Grande parte da parede celular de plantas é formada por celulose, este polissacarídeo é formado por β -Glucanas que são polímeros de D-glicose ligados por ligações β na configuração β . Estas são lineares quando formadas por apenas um tipo de ligação ou complexas quando possuem mais de um tipo de ligação nas cadeias lineares e ou nas ramificações. Sua classificação é feita de acordo com sua configuração e tipo de ligação predominante (PITSON *et al.*, 1993).

A função das β -glucanas na biologia dos fungos varia e depende do tamanho, estrutura, propriedades físico-químicas e principalmente sua localização. No citoplasma são utilizados como reserva de fonte de carbono de fácil metabolização. Quando presentes na parede celular agem na rigidez e proteção da célula. Além disto, podem ser utilizadas como fonte de nutrientes em decorrência de modificações da parede celular durante a morfogênese ou mesmo na exaustão do meio de cultura. Além disso, podem estar envolvidas na patogenicidade e proteção das células contra desidratação (PITSON *et al.*, 1993).

lolíticas em fungos consiste de no mínimo três grupos de (4), exoglucanase (E.C.3.2.1.91 e E.C.3.2.1.74) e -glucosidase (E.C.3.2.1.21). A interação sinérgica entre estas enzimas é necessária para a completa hidrólise de polímeros de celulose. -glucosidase catalisa a hidrólise de celobiose o que finaliza a completa hidrólise de celulose em moléculas de glicose. As -glucosidase são geralmente responsáveis pela regulação do processo celulolítico (KADAM; DEMAIN, 1999). -glucosidase foram caracterizadas em várias espécies de fungos (BHAT; BHAT, 1997) como os dos gêneros: *Aspergillus*, *Botrytis*, *Chaetomium*, *Fusarium*, *Humiola*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Piromonas*, *Piromyces*, *Sphaeromonas*, *Sporotrichum*, *Talaromyces* e *Trichoderma*.

Durante a interação fitopagênica de fungos, a celulose em plantas é degradada por várias celulasas (HENRISSAT *et al.*, 1985), partindo de várias enzimas dentre elas as -1,4-glucanases. Estas enzimas facilitam a penetração do fungo no tecido das plantas. A função das -1,4-glucanases é de quebrar a ligação -1,4-glicosídica que liga os monômeros de glicose formadores da parede celular (WOODWARD *et al.*, 1983; EDNEY *et al.*, 1991) auxiliando entrada fungo em seu hospedeiro. Possui como substrato a carboximetilcelulose dessa forma essa enzima também é chamada de carboximetilcelulase. Recentemente esta enzima foi aplicada na indústria têxtil para a remoção de fibrilas da superfície de tecidos a base de celulose elevando sua atividade.

As enzimas -1,3-Glucanase são amplamente distribuídas entre bactérias, fungos, e plantas (REESE; MANDELS, 1999), muitos delas foram purificadas e caracterizadas (COPAPATINO *et al.*, 1989; KAUFFMAN, *et al.* 1987; MRSA, *et al.*, 1993; STAHMANN, *et al.* 1993). Estas enzimas são classificadas de acordo com o modo de ataque ao substrato como exo- -1,3-glucanases (glucanohidrolase de -1,3-glucan [EC 3.2.1.58]) e endo- -1,3-glucanases (glucanohidrolase de -1,3-glucan [EC 3.2.1.6 ou EC 3.2.1.39]), estes dois mecanismos de ação são identificados pelos produtos de hidrólise (PITSON *et al.*, 1993). As exo- -1,3-glucanases hidrolisam o substrato, -1,3-glucana, pela clivagem sequencial de resíduos de glicose a partir da extremidade não redutora, o principal produto de hidrólise é glicose podendo gerar também dissacarídeos e outros oligossacarídeos. As endo- -1,3-glucanases clivam o substrato aleatoriamente ao longo da cadeia. Tanto as exo quanto as endo- -1,3-glucanases podem agir simultaneamente na hidrólise de -glucanas de uma forma sinérgica.

Os genes correspondente a -1,3-glucanase dos organismos acima mencionado também foram isolados e caracterizados, assim como genes de fungos de filamentosos

EFFER, *et al.* 1994; SPERISEN, *et al.* 1991). As funções dependem da sua origem. Em plantas estas enzimas são um tipo de sistema de defesa contra fungos fitopatogênicos (KAUFFMAN, *et al.* 1987), embora também fossem sugeridos papéis na diferenciação celular (NEALE, *et al.* 1990). Em bactérias mutantes para a α -1,3-glucana foi sugerido um papel nutricional (WATANABE, *et al.* 1992) para esta enzima. Em fungos, α -1,3-glucanases parecem ter funções diferentes: um papel fisiológico no processo de morfogênese durante desenvolvimento e diferenciação celular (PEBERDY, 1990) ou; relacionadas à mobilização de α -glucanas em condições de estresse nutricional (RAPP, 1992; STAHMANN, *et al.* 1992). Estas enzimas também estão envolvidas em interações de planta-patógeno, degradando celulose (β -D-1,3-glucana) nos tecidos vasculares da planta hospedeira durante o processo de invasão do fungo (SCHAEFFER, *et al.* 1994). Finalmente, um papel nutricional em fungos saprófitos e mico parasitas (LORITO, *et al.* 1994).

1.4. Compatibilidade micelial

O teste de compatibilidade micelial é um teste macroscópico que consiste na habilidade de dois isolados de fungo filamentosos da mesma espécie provocarem a anastomose de suas hifas e formarem uma única colônia, contínua. Este é um teste de fácil reconhecimento sendo extremamente útil em comparações intra-específicas de isolados. A aplicação do teste de compatibilidade micelial tem sido altamente utilizada e descrita por vários pesquisadores assim como os mecanismos por trás desse fenômeno (LESLI, 1993; GLASS; KULDAU, 1992; GLASS, *et al.*, 2000; SAUPE, 2000).

As hifas de isolados diferentes ao se ligarem provocam a mistura dos citoplasmas e a formação ou não do heterocário vegetativo (célula com dois ou mais núcleos geneticamente distintos em um citoplasma comum). A viabilidade destes heterocários é geneticamente controlada por loci específicos chamados de *het* (de heterocário) ou *vic* (de incompatibilidade vegetativa) (SAUPE, 2000). Um locus *het* pode ser definido como um locus no qual o heteroalelismo não pode ser tolerado em um heterocário. Quando dois isolados que se diferem geneticamente no locus *het* se fundem, a célula resultante é rapidamente destruída ou tem seu crescimento inibido dependendo do locus *het* envolvido (COPPIN *et al.*, 1997).

2. JUSTIFICATIVAS

Em função de uma série de fatores como o monocultivo, a sucessão de culturas com espécies suscetíveis (girassol, canola, feijão e algodão) e o plantio de sementes infectadas

é um dos principais problemas em várias regiões do país torna-se particularmente importante não somente pela ampla gama de hospedeiros, mas principalmente pela formação de estruturas de resistência, os escleródios. Tem se verificado em algumas áreas alta infestação do solo por escleródios do fungo, sendo comum encontrar até 80 escleródios/m². Desta forma, essas áreas estarão impróprias para a rotação ou sucessão de culturas com feijão, algodão, girassol e canola, caso esse inóculo inicial não seja reduzido (COSTA; COSTA, 2001).

Com a finalidade de minimização das perdas provocadas pela doença, várias medidas de controle têm sido adotadas, dentre elas estão as chamadas medidas de manejo integrado, como limpeza de implementos agrícolas, rotação de culturas com gramíneas, integração lavoura-pecuária, controle biológico e químico (FERRAZ *et al.*, 2003; VIEIRA *et al.* 2001). Pelo fato deste ser um fungo de ampla ocorrência, todas essas medidas tornam-se necessárias pelo fato do patógeno permanecer viável no solo por vários anos. Além disso, alterações causadas por mutações ou recombinações poderiam causar diferenças significativas entre isolados prejudicando métodos atuais e em desenvolvimento de combate ao fungo. Uma das formas de se comprovar este fato é realizando um estudo da genética populacional existente entre vários isolados da mesma espécie obtidos de várias regiões do país.

A maioria dos estudos de genética de populações em *S. sclerotiorum* foi conduzida na América do Norte, sendo baseados em DNA fingerprint gerados utilizando sondas para transposons em análises por Southern Blot (KOHLI *et al.* 1992). Estudos populacionais através de testes de compatibilidade micelial combinados com fingerprint de microssatélites sugerem que *S. sclerotiorum* na América do Norte apresenta reprodução predominantemente clonal e ocasionalmente recombinação sexual (HAMBLETON *et al.*, 2002). Atualmente existe um reduzido número de trabalhos envolvendo o estudo de *S. sclerotiorum* através de RAPD em conjunto com outras formas de determinar variabilidade genética, e no Brasil ainda existem poucos estudos desse tipo feitos com isolados de *S. sclerotiorum* (GOMES, *et al.* 2010; MEINHARDT *et al.* 2002). A produção de dados obtidos através desses experimentos contribuiria para aumentar o nível de conhecimento sobre este patógeno regionalmente, auxiliando também no desenvolvimento de novas pesquisas em diversas regiões do Brasil.

A partir do tema exposto acima, onde se demonstra a devida importância na avaliação da variabilidade genética de *Sclerotinia sclerotiorum* em várias áreas de grande cultivo de feijão e soja, o presente trabalho teve como objetivos:

Objetivo Principal:

- Avaliar a estrutura populacional do fungo *S. sclerotiorum* obtido de plantações das culturas de soja e feijão em diferentes regiões do Brasil.

Objetivos específicos:

- Verificar a Compatibilidade Micelial dos isolados;
- Analisar a produção de enzimas hidrolíticas liberadas pelo fungo.
- Analisar a variabilidade genética de isolados por marcadores moleculares do tipo RAPD;
- Identificar o grau de similaridade entre os isolados coletados no Brasil.

4.1. Coleta dos isolados.

Os isolados do patógeno de solo *S. sclerotiorum*, foram coletados em áreas de cultivo de feijão e soja. Foram coletadas amostras no PAD-DF (DF), em Goiás nos municípios de Formosa e Montividiu, em Minas Gerais foram obtidos isolados em Monte Carmelo. No estado de Mato Grosso, as amostras foram obtidas em Lucas do Rio Verde e no estado do Paraná em Londrina (Fig. 1).

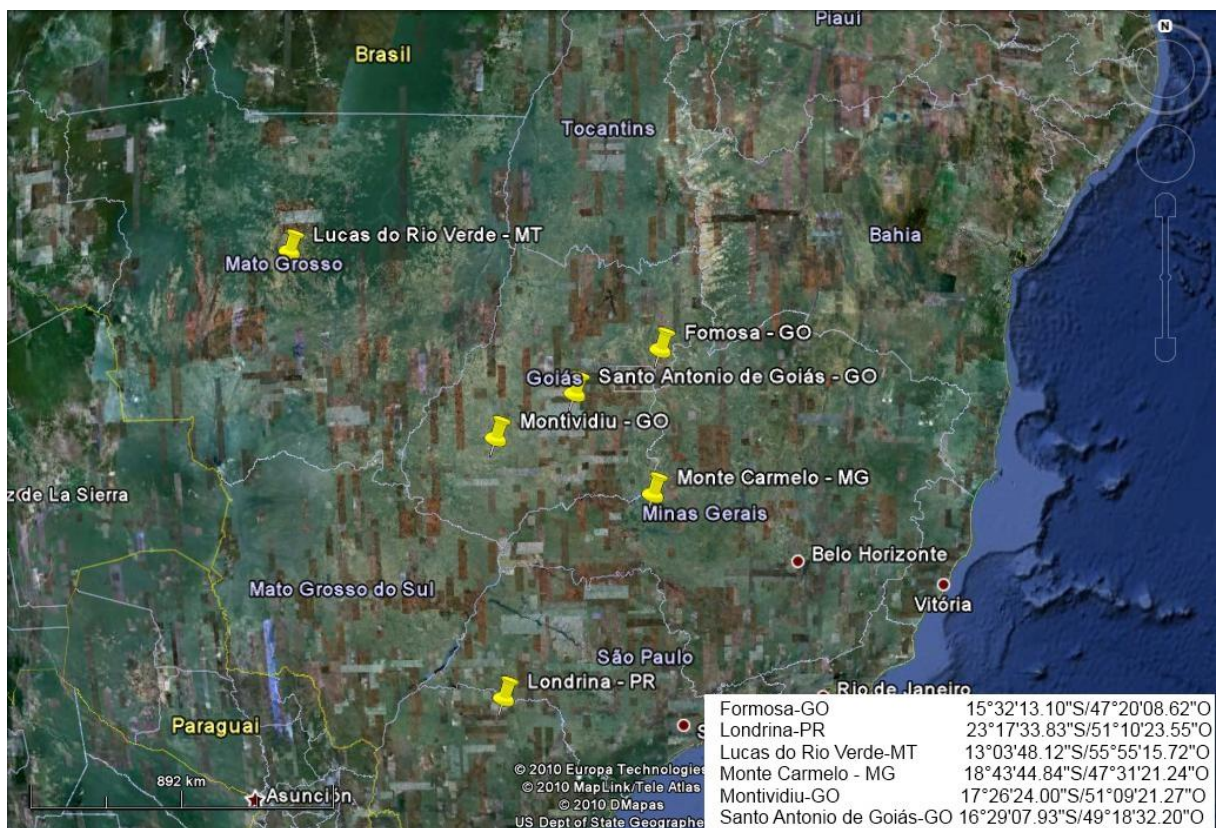


Figura 1. Mapa da localização das regiões onde os escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* foram coletados. As regiões de coleta estão indicadas com um marcador na cor amarela, as coordenadas geográficas das localidades estão descritas na parte inferior da imagem.

A distribuição dos isolados nas áreas de coleta foi considerada possibilitando a delimitação de grupos com base na variabilidade genética, origem e patogenicidade, e sua distribuição dentro e entre regiões.

Os isolados na forma de escleródios foram rotulados e passaram por processo de desinfecção. Essa foi feita mergulhando o escleródio em solução de hipoclorito de sódio 0,1% por 30 segundos, solução de álcool etílico 70% por 30 segundos e 3 lavagens consecutivas em

Os escleródios foram cultivados em meio BDA contendo cinco dias.

4.2. Crescimento de *S. sclerotiorum* em meio líquido.

Os Isolados de *S. sclerotiorum* foram inoculados em 50mL de meio mínimo (2g/L NH_4NO_3 , 1g/L KH_2PO_4 , 0,1g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5g/L extrato de levedura, 3g/L D-malic acid e 1g/L NaOH) suplementado com 2% de parede celular de planta feijoeiro. Esse foi obtido através da maceração em nitrogênio líquido de caules e folhas sadios de feijoeiro até a formação de um pó fino. As culturas em Erlenmeyers de 250 mL foram mantidas a temperatura de 20°C, com agitação constante (120 rpm) por 72 horas. Após esse período as amostras foram retiradas e filtradas em filtro Millipore de 0,45 μm sendo reservado o micélio e o sobrenadante a 620°C, para posterior estudo das respectivas atividades enzimáticas e extração de DNA.

4.3. Teste de compatibilidade micelial

O teste de compatibilidade micelial foi feito de acordo com Kohn e Schafer (2006), discos de micélio com 5 mm de diâmetro foram obtidos das bordas de colônias de *S. sclerotiorum* com 5 dias de crescimento em meio BDA. Dois discos miceliais foram colocados em lados opostos em placas de Petri contendo meio BDA adicionado de corante alimentício vermelho. As placas foram encubadas no escuro por 7 dias a 20°C. A compatibilidade entre os isolados foi determinada pela fusão do micélio dos dois isolados e a incompatibilidade foi observada através de uma linha vermelha no fundo das placas de Petri ou pela formação de micélio aéreo ao longo da linha divisória entre os dois isolados. Após uma pré-formação dos grupos, foram feitos testes apenas entre os grupos, não sendo necessário testar todos os isolados entre si. O experimento foi feito em triplicata.

4.4. Teste de produção de enzimas hidrolíticas

As atividades enzimáticas foram realizadas através do método da determinação do teor de açúcares redutores liberados pela reação enzimática através da solução de ácido dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959).

4.4.1. Ensaio de atividade das Poligalacturonases.

uronas foi determinada através da quantificação dos
o de pectina. A mistura de reação foi feita em placa de 96
poços e constituiu-se de 22 L de solução de pectina cítrica 0,5% em tampão acetato de sódio
0,05 M, pH 5,0 mais 7 L de amostra de sobrenadante de cultura. Depois de completada a
homogeneização, os preparados foram incubados a 50°C; decorrido 10 minutos, foram
adicionados 75 L de DNS, seguido de imediata agitação e incubação a 100 °C, por 5
minutos. Após a homogeneização, 75 L da reação foram transferidos para uma placa de
ELISA, a leitura foi realizada em leitor de placas em comprimento de onda de 575 nm e os
valores obtidos foram comparados com a curva padrão da reação. A atividade liberadora de
açúcares redutores foi expressa em U.mg⁻¹ (unidade de atividade enzimática por miligrama de
proteína), com os ensaios realizados em triplicata.

4.4.2. Ensaio de atividade das Xilanases.

A atividade das xilanases foi determinada através da quantificação dos grupos
redutores liberados da solução de xilana. A mistura de reação foi feita em placa de 96 poços e
constituiu-se de 40 L de solução de xilana 1% em tampão acetato de sódio 0,05M, pH 5,0
mais 25 L de amostra de sobrenadante de cultura. Depois de completada a homogeneização,
os preparados foram incubados a 50°C; decorrido 10 minutos, foram adicionados 100 L de
DNS, seguido de imediata agitação e incubação a 100 °C, por 5 minutos. Após a
homogeneização, 75 L da reação foram transferidos para uma placa de ELISA, a leitura foi
realizada em leitor de placas em comprimento de onda de 575 nm. Os ensaios foram
realizados em triplicata.

4.4.3. Ensaio de atividade de -1,3-glucanase

A atividade foi determinada medindo-se a quantidade de açúcar redutor liberado após
incubação das amostras com laminarina (Sigma Chemical Company 95%). Foram
acrescentados 10 L da amostra a 20 L de laminarina 0,25%, diluída em tampão acetato de
sódio 0,05 M, pH 5,0. Depois de completada a homogeneização, os preparados foram
incubados a 50°C; decorrido 10 minutos, foram adicionados 100 L de DNS, seguido de
imediate agitação e incubação a 100 °C, por 5 minutos. Após a homogeneização, 75 L da
reação foram transferidos para uma placa de ELISA, a leitura foi realizada em leitor de placas
em comprimento de onda de 575 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.4.4. Ensaio de atividade de -1,4-glucanase

canase foi feita medindo-se a quantidade de açúcares
incubação das amostras com solução de CMC
(CarboxiMetilCelulose). Foram adicionados 12 L da amostra a 29 L de CMC 1% pH 5,0. A
incubação foi a 50°C por 1 hora sendo em seguida a reação parada pela adição de 59 L de
DNS (MILLER, 1959) e aquecida em água fervente por 5 minutos Depois de completada a
homogeneização, 75 L da reação foram transferidos para uma placa de ELISA, a leitura foi
realizada em leitor de placas em comprimento de onda de 575 nm. Os ensaios foram
realizados em triplicata.

4.5. Extração do DNA

A extração do DNA foi feita pelo método de CTAB (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998) com modificações. Aproximadamente 15 a 20 mg de micélio foram transferidos para 500 µL de tampão de extração formado por: 0.7 M NaCl, 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0 e 10 mM de EDTA. Um volume igual de clorofórmio foi adicionado e a mistura foi agitada vigorosamente através de vortex e centrifugada por 5 min a 10.000 rpm. A extração com clorofórmio foi repetida e a fase aquosa do sobrenadante transferida para um novo tubo. O DNA foi precipitado com a adição de 50 µL de dois volumes de etanol gelado e centrifugado por 10 min a 4°C. O pellet formado foi lavado com etanol a 70% gelado e seco a temperatura ambiente antes de ser dissolvido em 50 µL de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) e 2 µL de ribonuclease A (10mg/mL). A qualidade do DNA foi atestada pela verificação da integridade do mesmo em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. O DNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro e sua concentração aferida em torno de 10 a 100 µg mL⁻¹.

4.6. Seleção de oligonucleotídeos

As reações de amplificação foram feitas em termociclador, num volume de reação de 30 L contendo: 1 ng DNA molde, 0,5 M de primer (Operon Technologies), 0,8 M de dNTP, 2,5 L de tampão 10X, 1,5 mM de MgCl₂, 2,5 unidades de TaqDNApolimerase e H₂O (q.s.p.). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94 °C por dois minutos; 40 ciclos de um minuto e meio a 92 °C, um minuto a 37 °C, e dois minutos e meio a 72 °C. A extensão final foi de cinco minutos a 72 °C. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese com corrida (3V/cm) em géis de agarose 1,5% (P/v) em tampão TBE 1X. O

o RI+Hind III (Invitrogen) foi usado como marcador de

O teste para seleção foi realizada com oligonucleotídeos iniciadores da série OPC e OPE da Operon Technologies (Huntsville, Alabama, USA). Para verificação do perfil de amplificação de cada oligonucleotídeo foram utilizados DNA de três amostras, sendo uma de cada população, gerando uma matriz binária, onde a presença de banda é representada pelo número um (1) e a ausência de banda pelo zero (0). A eletroforese foi executada em cuba horizontal com corrida (3V/cm) em géis de agarose 1,5% (P/v) e tampão TBE 1X. Foram selecionados 13 primers (Tab. 1) para o processo de amplificação, dentre 23 oligonucleotídeos. A triagem foi feita analisando a quantidade de bandas amplificadas para cada primer utilizando-se um indivíduo de cada população, optou-se pelos primers que apresentaram maior número e bandas mais intensas no gel.

Tabela 1- Primers selecionados para amplificação do DNA dos isolados.

Primer	Sequencia	Locos obtidos
	5' → 3'	Nº
OPC-1	TTCGAGCCAG	3
OPC-2	GTGAGGCGTC	8
OPC-3	GGGGGTCTTT	3
OPC-4	CCGCATCTAC	9
OPC-9	CTCACCGTCC	3
OPC-10	TGTCTGGGTG	10
OPE-12	TTATCGCCCC	6
OPC-13	AAGCCTCGTC	4
OPC-20	ACTTCGCCAC	6
OPE-2	GGTGCGGGAA	4
OPE-6	AAGACCCCTC	4
OPE-9	CTTCACCCGA	6
OPE-17	CTACTGCCGT	7
Total		73

A partir dos dados do experimento de produção de enzimas hidrolíticas realizou-se a análise de variância (ANOVA) e o teste de diferença mínima significativa (teste de Tukey) para as médias, utilizando o programa Assistat (SILVA; AZEVEDO, 2002).

A análise dos dados foi feita com base nos polimorfismos gerados pelas bandas mais evidentes do marcador RAPD pela análise das fotos dos géis. A planilha com os dados binários foi construída no Microsoft Excel. Os dados foram interpretados como binários, gerando-se uma matriz com a genotipagem dos indivíduos quanto à presença (1) e ausência (0) de bandas. A porcentagem de polimorfismos obtida nos géis com as amplificações foi calculada dividindo-se o número de bandas polimórficas pelo número total de bandas de cada *primer*. O programa Arlequin, versão 2.001 (SCHNEIDER, *et al.* 2000) foi usado para calcular a frequência de haploides, índice de fixação F_{st} , que indica a distribuição da variabilidade genética entre as populações (WEIR; COCKERHAM, 1984) e análise hierárquica da variância molecular (AMOVA) entre e dentre as populações.

O dendograma foi construído baseado em uma matriz de distância genética obtida pelo coeficiente de distância de Rogers modificado (WRIGHT, 1978), também chamado de Rogers-W. Os indivíduos foram agrupados pelo método de UPGMA, disponível no software NTSYS (Rohlf, 1998). Esse programa também foi utilizado para calcular o coeficiente de correlação cofenética r entre as matrizes de distância pelo teste de Mantel (MANTEL, 1976).

5.1. Coleta de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*

Foram obtidos isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*, amostrados em um mínimo de dois campos por região, conforme pode ser verificado na Tabela 2. O fungo foi coletado na forma de escleródio presente no solo ou planta, estes foram embalados em sacos plásticos e catalogados. Os escleródios em laboratório passaram por processo de desinfecção dentro de câmara de fluxo laminar onde foram lavados em solução de hipoclorito 0,1% e logo após álcool 70%. Após desinfecção os escleródios foram incubados para crescimento em meio BDA em placa de *Petri*. Possíveis isolados contaminados foram retirados do grupo e novos escleródios foram utilizados.

Dos escleródios coletados 30 isolados obtidos de cultura de feijoeiro nas regiões de Santo Antônio de Goiás (2 isolados) , Formosa (13 isolados) e Montividiu (4 isolados) no estado de Goiás, Lucas do Rio Verde (6 isolados) em Mato Grosso e Monte Carmelo (5 isolados) em Minas Gerais. Outros 16 isolados de *S. scleroriorum* foram obtidos de cultura de soja na região de Londrina no Paraná, totalizando 46 indivíduos.

Tabela 2 ó Lista de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* coletados em regiões do Brasil

Isolados	Hospedeiro	Localização
ss30	Feijão	Santo Antônio de Goiás ó GO
ss32	Feijão	Santo Antônio de Goiás ó GO
ss39,1	Feijão	Formosa ó GO
ss39,2	Feijão	Formosa ó GO
ss40,0	Feijão	Formosa ó GO
ss40,1	Feijão	Formosa ó GO
ss40,2	Feijão	Formosa ó GO
ss41,0	Feijão	Formosa ó GO
ss41,1	Feijão	Formosa ó GO
ss41,2	Feijão	Formosa ó GO
ss41,3	Feijão	Formosa ó GO
ss41,4	Feijão	Formosa ó GO
ss43,0	Feijão	Formosa ó GO
ss43,1	Feijão	Formosa ó GO
ss43,3	Feijão	Formosa ó GO

da tabela 2.

	io	Lucas do Rio Verde ó MT
	io	Lucas do Rio Verde ó MT
ss46,4	Feijão	Lucas do Rio Verde ó MT
ss46,5	Feijão	Lucas do Rio Verde ó MT
ss46,6	Feijão	Lucas do Rio Verde ó MT
ss46,7	Feijão	Lucas do Rio Verde ó MT
mc07	Feijão	Monte Carmelo ó MG
mc08	Feijão	Monte Carmelo ó MG
mc14	Feijão	Monte Carmelo ó MG
mc19	Feijão	Monte Carmelo ó MG
mc21	Feijão	Monte Carmelo ó MG
m14	Feijão	Montividiu ó GO
m24	Feijão	Montividiu ó GO
m48	Feijão	Montividiu ó GO
m96	Feijão	Montividiu ó GO
pr01	Soja	Londrina ó PR
pr02	Soja	Londrina ó PR
pr03	Soja	Londrina ó PR
pr04	Soja	Londrina ó PR
pr05	Soja	Londrina ó PR
pr06	Soja	Londrina ó PR
pr07	Soja	Londrina ó PR
pr08	Soja	Londrina ó PR
pr10	Soja	Londrina ó PR
pr11	Soja	Londrina ó PR
pr12	Soja	Londrina ó PR
pr15	Soja	Londrina ó PR
pr13	Soja	Londrina ó PR
pr18	Soja	Londrina ó PR
pr21	Soja	Londrina ó PR
pr23	Soja	Londrina ó PR

5.2. Grupo de compatibilidade micelial

idade micelial dos isolados estudados, indivíduos que não provocaram fusão de micélio foram considerados antagônicos, ou seja, de diferentes grupos de compatibilidade micelial. A combinação entre dois isolados antagônicos de *Sclerotinia sclerotiorum* causou a formação de uma fina banda de micélio morto a qual pode ser visualizada na placa pelo corante adicionado ao meio de cultura, esta faixa indica a incompatibilidade entre os dois isolados. Assim, isolados compatíveis entre si, cresceram livremente pela placa produzindo a anastomose entre as hifas da margem da colônia e uma massa contínua de micélio (Fig. 2). Na figura é possível observar a compatibilidade entre o isolado ss41,3 de Formosa-GO e o isolado ss46,6 de Lucas do Rio Verde-MT (A) e a incompatibilidade entre o mesmo ss41,3 e o isolado m14 de Montividiu-GO (B).

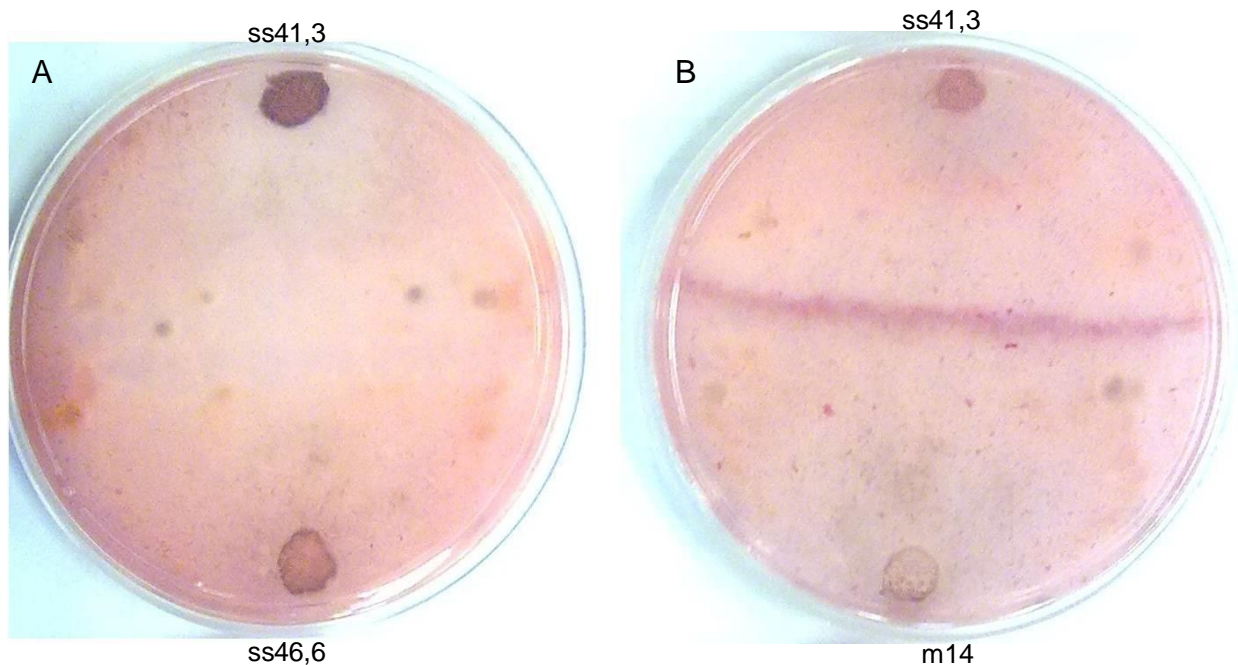


Figura 2. **Teste de compatibilidade micelial entre dois isolados coletados.** O teste demonstra a compatibilidade entre os isolados ss41,3 e ss46,6 com crescimento micelial contínuo (A) e a incompatibilidade entre os isolados ss41,3 e m14 com formação de linha escura entre os dois indivíduos (B).

Foram feitos 120 testes de confrontos entre os isolados para determinar a compatibilidade entre eles. Indivíduos compatíveis entre si foram classificados como de um mesmo grupo de compatibilidade.. Na medida em que os grupos foram montados, os isolados restantes eram confrontados apenas com representantes desses grupos, não sendo necessário o teste entre todos os isolados.

A partir dos testes realizados foi possível formar 10 grupos de compatibilidade micelial (Fig. 3). O grupo 1 (g1) conteve o maior numero de isolados chegando a abranger 47

se conteve individuos obtidos de todas as áreas de coleta como de soja. Dois grupos (G8 e G10) tiveram apenas um

isolado representativo.

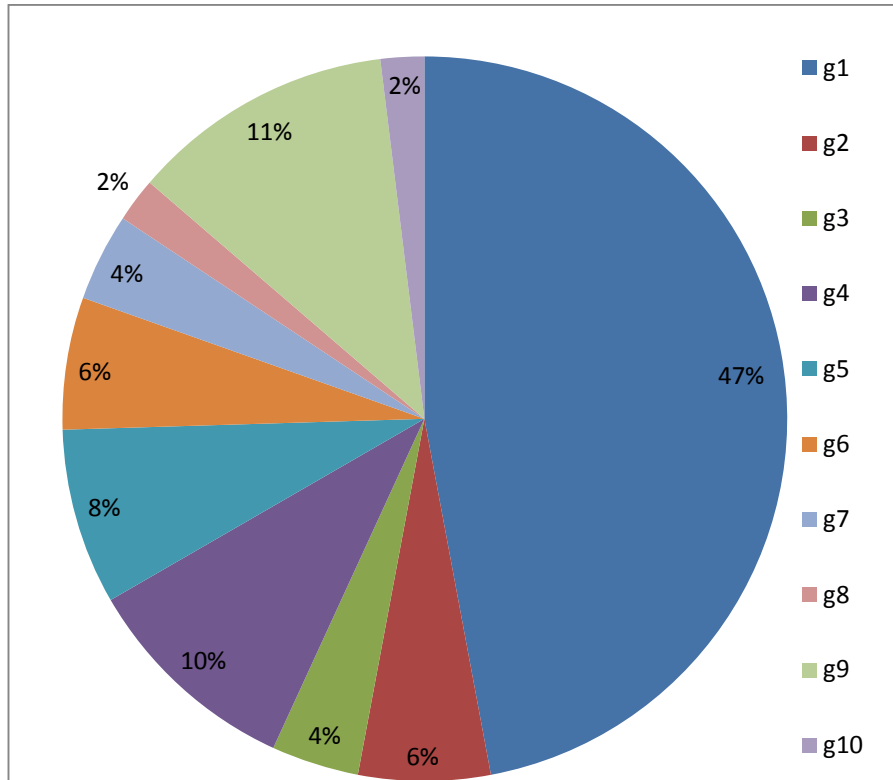


Figura 3. Gráfico indicativo da proporção de isolados contidos em cada grupo de compatibilidade micelial obtido. O maior grupo (G1) conteve isolados de todas as áreas de coleta, outros grupos contiveram regiões específicas.

Apenas o Grupo 1 foi contido em todas as áreas de cultivo, outros os grupos formados foram de regiões específicas, Monte Carmelo-MG conteve isolados dos grupos G1, G6, G7 e G8, Formosa-GO conteve G1, G2, G3 e G5, Lucas do Rio Verde-MT conteve G1, G4 e G5, St. Antônio de Goiás-GO conteve apenas G1 e Londrina conteve G1, G9 e G10 (Tab. 3). A região de Londrina, cuja coleta foi feita de campos de soja, conteve três grupos de compatibilidade micelial dois desses não foram encontrados em outras regiões. Essa exclusividade de pode ser devida a diferenciação entre isolados obtidos de feijão e de soja.

Tabela 3ó Número de isolados e grupos de compatibilidade miceliais (MCGs) observados em cada local de coleta.

Localidade	Nº de isolados	Nº de MCGs obtidos	MCGs identificados
Monte Carmelo-MG	5	4	G1, G6, G7, G8

	3	4	G1, G2, G3, G5
	6	3	G1, G4, G5
Montividiu-GO	4	2	G1, G4
Londrina-PR	16	3	G1, G9, G10
St. Antônio de Goiás-GO	2	1	G1

Analisando a esclerogênese durante os testes de compatibilidade micelial, de forma geral houve a formação de escleródios apenas na borda da zona lítica (área de contato entre os dois isolados) de cada isolado testado.

5.3. Produção de enzimas hidrolíticas

Em todas as atividades enzimáticas analisadas foi possível verificar a produção de enzimas hidrolíticas pelo fungo em meio de sobrenadante de cultura tendo como fonte de carbono extrato de parede celular de feijoeiro. Os isolados produziram diferentes níveis de atividade, em todas as enzimas analisadas houveram diferenças estatisticamente significativas entre os isolados ($p < 0,05$).

5.3.1. Atividade das Poligalacturonases

Analisando a atividade das poligalacturonases (Fig. 4) do meio sobrenadante de cultura de *S. sclerotiorum* obteve-se um nível mediano de 25 unidades enzimáticas por micrograma de proteína entre todos os isolados provenientes das localidades Santo Antônio de Goiás-GO, Formosa-GO, Montividiu-GO, Lucas do Rio Verde-MT e Monte Carmelo-MG, exceção feita por a Londrina-PR, com 55 unidades enzimáticas por micrograma de proteína, atividade bem acima da média dos outros Estados ($p < 0,01$).

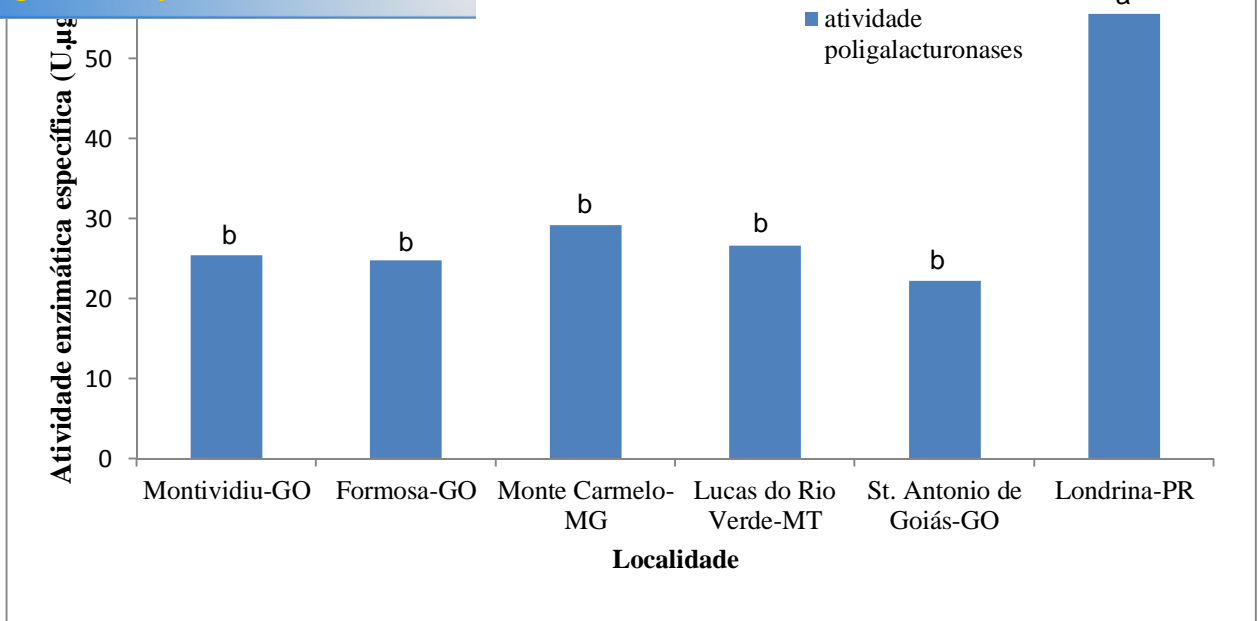


Figura 4. **Atividade enzimática das poligalacturonases em meio sobrenadante de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* crescidos em meio mínimo e extrato de parede de feijoeiro como fonte de carbono.** A região de Londrina-PR apresentou nível de atividade significativamente maior que as outras regiões analisadas ($p < 0,01$). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os níveis de atividade.

5.3.2. Atividade das Xilanases

A atividade das xilanases (Fig. 5) apresentou diferentes níveis de produção de enzima entre os isolados, dentro das populações essas diferenças foram significativas ($p < 0,05$). Ao analisar a atividade entre populações houve diferenças significativas, a atividade da população de Londrina foi significativamente maior que a população de Formosa ($p < 0,05$). Para as populações de Montividiu, Monte Carmelo, Lucas do Rio Verde e St. Antônio de Goiás as diferenças não foram significantes.

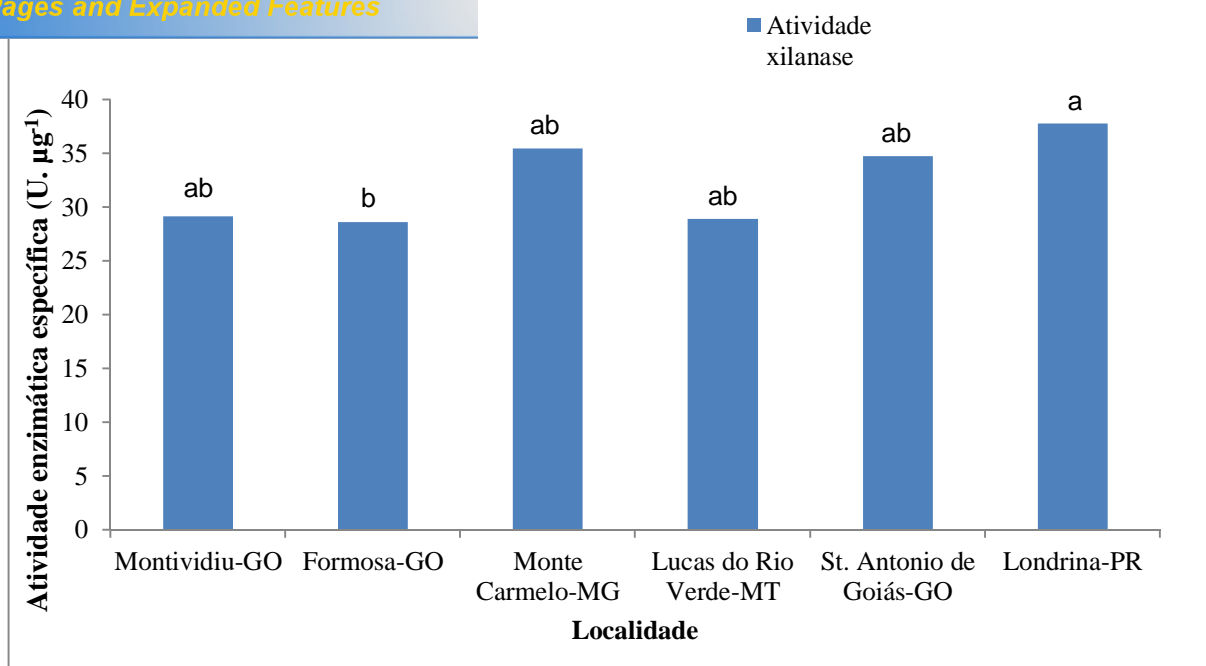


Figura 5. **Atividade enzimática das xilanases em meio sobrenadante de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* crescidos em meio mínimo e extrato de parede de feijoeiro como fonte de carbono.** Letras diferentes representam diferenças significativas entre os níveis de atividade ($p < 0,05$).

5.3.3. Atividade da 1,3- -glucanase

A atividade das 1,3- -glucanase (Fig. 6) apresentou diferentes níveis de produção de enzima entre os isolados, dentro das mesmas populações de uma localidade essas diferenças foram significativas ($p < 0,05$). A análise entre populações indicou diferentes níveis de atividade, sendo que a regiões de Monte Carmelo-MG e Londrina-PR, com nível de atividade dessa enzima semelhante entre si, tiveram produção significativamente maior que a população de Formosa-GO. As variações entre Montividiu, Lucas do Rio Verde e Santo Antônio de Goiás não foram significantes quando comparadas entre si.

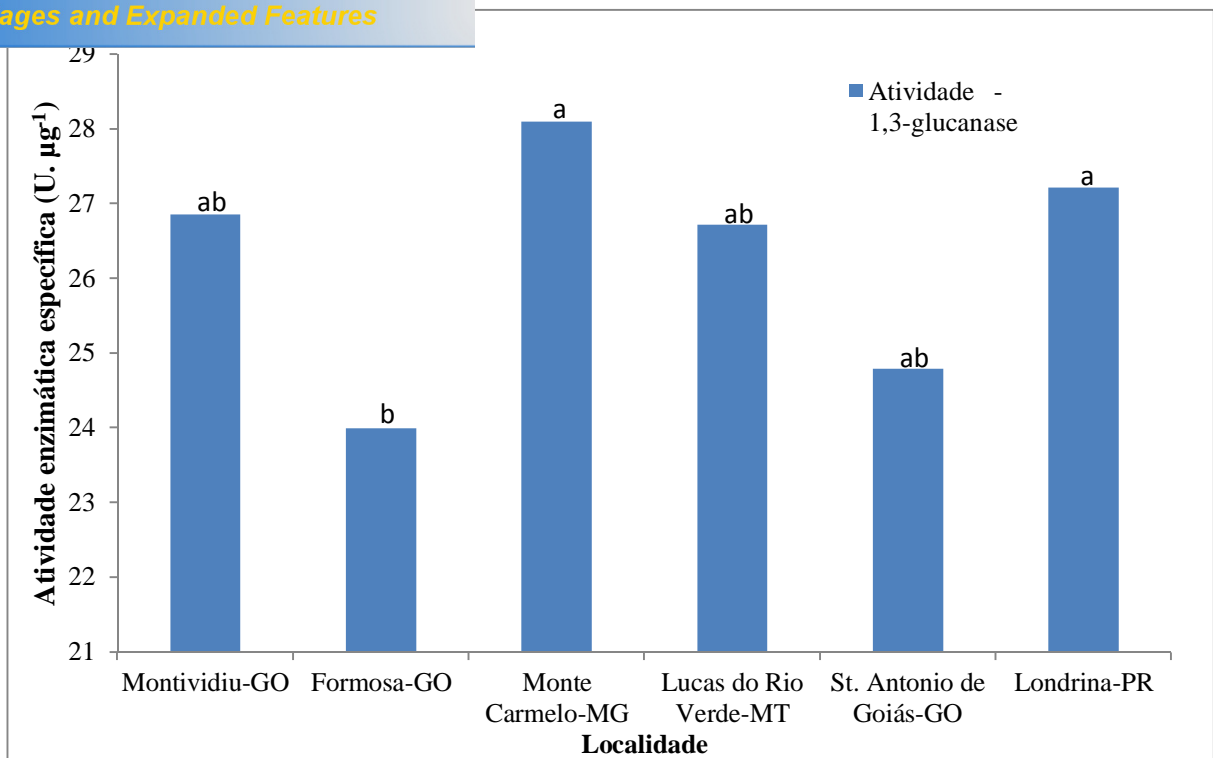


Figura 6. **Atividade enzimática das β -1,3-glucanase em meio sobrenadante de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* crescidos em meio mínimo e extrato de parede de feijoeiro como fonte de carbono.** Letras diferentes representam diferenças significativas entre os níveis de atividade ($p < 0,05$).

5.3.4. Atividade da β -1,4-glucanase

A atividade enzimática das β -1,4-glucanase (Fig. 7) em meio sobrenadante de cultura de *S. sclerotiorum* foi positiva em todos os isolados analisados. A análise da atividade dentro das populações indicou variação significante entre os isolados ($p < 0,05$), porém não foram encontradas diferenças significativas na atividade enzimática entre as populações estudadas.

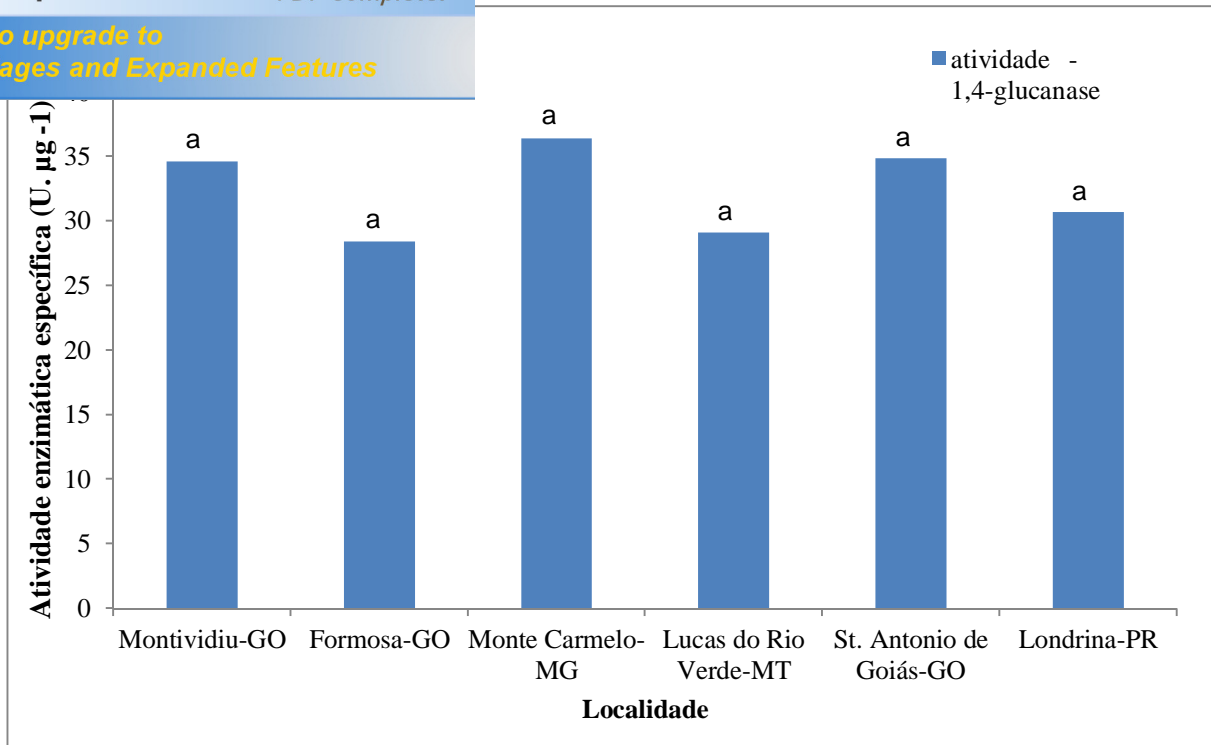


Figura 7. Atividade enzimática das α -1,4-glucanase em meio sobrenadante de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* crescidos em meio mínimo e extrato de parede de feijoeiro como fonte de carbono. Não houve diferenças significativas entre as regiões.

5.4. Seleção de oligonucleotídeos

Os fragmentos de DNA amplificados por RAPD, produtos provenientes das ampliações, foram separados em géis de agarose 1,5%. Todos os oligonucleotídeos que foram analisados produziram bandas com tamanho e intensidade passíveis de serem computadas, como no exemplo da amplificação do *primer* OPC2 e OPC4 (Fig. 8).

No *primer* OPC2 foi possível verificar polimorfismos em bandas amplificadas, este se deram principalmente em isolados provenientes de Londrina, em outras regiões houve homogeneidade nas bandas. O *primer* OPC4 amplificou um maior número de polimorfismos em comparação ao OPC2, sendo possível verificar vários isolados de Santo Antonio de Goiás, Formosa, Monte Carmelo e Londrina apresentando bandas polimórficas. Atenção especial é dada aos isolados pr10 e ss39,1 os quais foram observados nos perfis eletroforéticos da amplificação dos dois primers maior nível de diferenciação no padrão de bandas em comparação aos outros indivíduos. No total foram produzidas 73 bandas das quais 94% eram polimórficas (Tab. 4). Quando se remete à população, a maior porcentagem de bandas polimórficas obtidas foi da região de Londrina-PR com 66,27% e a menor porcentagem foi da região de Santo Antônio de Goiás-GO com 17,8%.

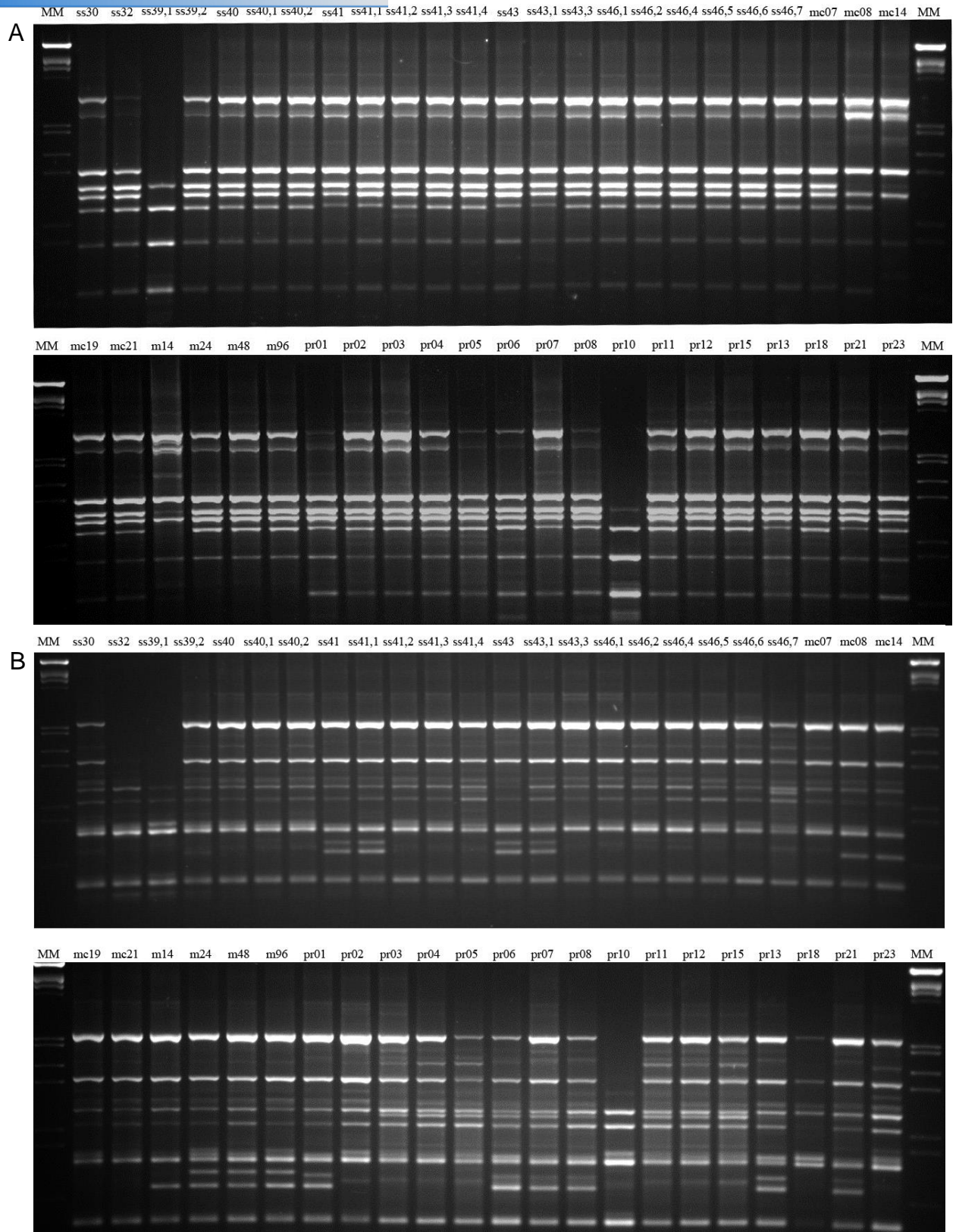


Figura 8 - Perfil eletroforético do produto de amplificação dos primers OPC2 (A) e OPC4 (B) nas seis populações de *Sclerotinia sclerotiorum*. Produtos separados em gel de

de etídeo e utilizando um marcador de massa molecular rogen) como referência.

Tabela 4ó Análise por marcadores RAPD da estrutura genética de populações de *Sclerotinia sclerotiorum* de diferentes regiões e plantas hospedeiras

População	Tamanho da amostra	Nº de bandas polimórficas	% de bandas polimórficas
St. Antônio de Goiás-GO	2	13	17,8%
Formosa-GO	13	42	57,53%
Lucas do Rio Verde-MT	6	13	17,8%
Monte Carmelo-GO	5	29	39,72%
Montividiu-GO	4	15	20,54%
Londrina-PR	16	44	60,27%

Nos testes realizados pelo método AMOVA, os resultados indicaram que 16,94% da variação total foi atribuída a diferenças entre populações, enquanto 83,06% foi devido a variações intrapopulacional (Tab. 5). Percebeu-se, assim, que os níveis de variação entre populações foram menores do que os níveis de variação dentro das populações. O índice de fixação (Fst) obtido no trabalho foi de 0,16937.

Tabela 5- Resumo da análise de variância molecular (AMOVA).

Fonte de variação	Graus de Liberdade	Média dos quadrados	Componente de variação	Total (%)
Entre populações	5	68,834	1,15646	16,94
Dentro de populações	40	226,862	5,67155	83,06
Total	45	295,696	6,82801	
Índice de fixação (Fst)	0,16937			

A partir dos dados da tabela de presença e ausência, foi calculado uma matriz de distância genética entre as populações utilizando-se o coeficiente de distância Rogers-W. A partir da matriz obtida foi criada a matriz cofenética para ser utilizada no Teste de Mantel, obtendo-se índice de correlação cofenética 0.978. Dessa forma o dendograma gerado

erca de 97,8% da matriz obtida, indicativo de que a la.

O dendograma foi produzido com base nos valores da matriz segundo o Método de UPGMA utilizando-se o programa NTSYS (ROHLF, 1998), as 6 populações foram divididas em 4 grupos principais. Tanto o grupo formado por Formosa-GO e Lucas do Rio Verde-MT quanto o grupo de Monte Carmelo-GO e Montividiu-GO apresentaram distância genética de aproximadamente 0.12. O grupo de S. Antônio de Goiás-GO foi o mais divergente e apresentou distância genética de 0.39 em relação aos outros grupos (Fig. 9).

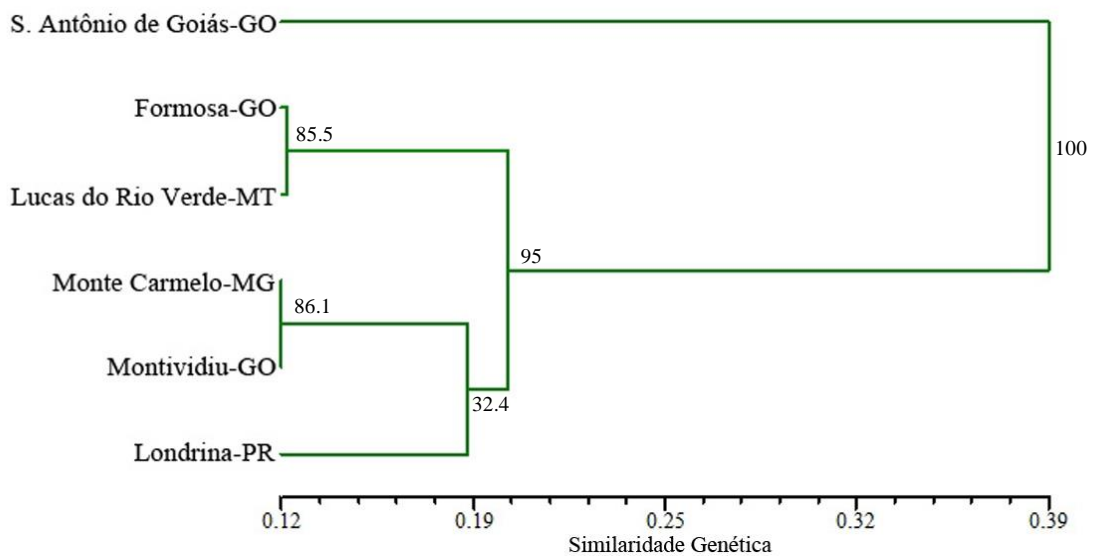


Figura 9 ó **Dendograma representativo das distâncias genéticas entre as populações de *S. sclerotiorum***. As distâncias foram obtidas com base em marcadores RAPD entre seis populações de *Sclerotinia sclerotiorum* agrupado por UPGMA utilizando índice de distância Rogers-W. A consistência dos agrupamentos foi determinada pela análise de *bootstrap*, os valores estão demonstrados na figura.

No presente trabalho foram estudados 46 isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* provenientes de 6 regiões diferentes. Desse total, 30 isolados foram obtidos de cultura de feijoeiro e 16 de cultura de soja. Com o objetivo de avaliar a diversidade genética desses indivíduos foram analisadas características como a capacidade de formar anastomose entre hifas de diferentes isolados, produção de enzimas de importante função patogênica para o fungo e análise genética através da utilização de marcadores do tipo RAPD.

A formação de grupos de compatibilidade micelial através da fusão de hifas de diferentes isolados indica nível de parentesco entre diferentes isolados. Isolados que foram capazes de fundir hifas foram classificados como sendo do mesmo grupo. Os 46 indivíduos coletados foram classificados em 10 grupos de compatibilidade micelial. O maior grupo, G1, representou praticamente a metade dos isolados analisados, com 47% de todos os isolados. Nesse grupo não houve especificidade de região, pois ele continha isolados de todas as áreas analisadas. Em experimento semelhante com isolados obtidos no Canadá, pesquisadores coletaram 213 isolados de diferentes campos, foram formados 21 grupos de compatibilidade micelial, sendo que 5 grupos representavam 84% dos isolados (HAMBLETON *et al*, 2002). Nesse experimento houve também a formação de um grande grupo de compatibilidade micelial contendo 46% de todos os isolados obtidos, dado bastante próximo ao ocorrido com os isolados estudados neste trabalho. Não foi observado especificidade de grupos de compatibilidade micelial e hospedeiro de origem de *S. sclerotiorum*, tanto a cultura de soja quanto a de feijão obtiveram números variados de grupos.

Apesar de terem sido obtidos 10 grupos de compatibilidade micelial dentre os 46 isolados analisados, não foi observado especificidade com a região de origem do isolado. A região de Monte Carmelo-MG com apenas 5 isolados possui 4 grupos, proporcionalmente a maior quantidade obtida, sendo que a região de Londrina obteve o menor número proporcional de grupos, dentre 16 isolados somente 3 grupos foram identificados. Resultado semelhante foi obtido por Meinhardt *et al* (2002) os quais trabalharam com 18 isolados obtidos da região de Guaíra-SP (13 isolados de feijoeiro) e Unai/Bonfinópolis-MG (5 isolados de feijoeiro, batata e pimentão) estes produziram apenas dois grupos de compatibilidade miceliais. Mesmo as duas localidades estando separadas por cerca de 500 km não houve especificidade de grupo de compatibilidade com relação a região de coleta nem com relação

S. sclerotiorum é conhecido por secretar uma grande quantidade de enzimas que degradam polissacarídeos e proteínas responsáveis por degradar polímeros da parede celular vegetal (POUSSEREAU *et al.* 2001). Essas enzimas contribuem com a nutrição geral do microrganismo e facilitam a invasão do patógeno no hospedeiro. De acordo com LI *et al.* (2004), isolados de *S. sclerotiorum* capazes de produzir maiores quantidades de poligalacturonases possuem vantagem no processo de infecção sobressaindo sobre aqueles com menor capacidade de produzir essa enzima. No presente trabalho houve diferenças significativas de atividades das poligalacturonases entre os isolados estudados o que pode ser visualizado com um grande aumento da atividade do grupo de Londrina-PR (Fig. 4). Esta população foi coletada de culturas de soja indicando um maior nível de atividade enzimática em comparação a isolados obtidos de cultura de feijoeiro. As médias das atividades entre populações obtidas de feijoeiro não apresentaram diferenças significativas.

A -1,4 Xilana é uma fração da hemicelulose muito abundante em vegetais, a Endo-1,4- α -xilanase e α -xilosidase são responsáveis pela hidrólise da xilana. A atividade enzimática das xilanases pelos isolados de *S. sclerotiorum* demonstrou um maior nível na população de Londrina (Fig. 5), porém esta diferença foi significativa apenas com relação à população de Formosa. Entre as outras populações a atividade das xilanases não obteve diferenças significantes. Observando as variações entre isolados obtidos de feijoeiro e soja, estes não apresentaram variações importantes.

A Glucanases produzidas pelo fungo possuem grande importância no processo infeccioso principalmente como fonte de carbono (MARTIN *et al.* 2007). A análise da atividade das α -1,3-Glucanases demonstrou maiores níveis nas populações de Londrina-PR e Monte Carmelo-MG, as quais foram significativamente maiores em comparação a atividade da população de Formosa-GO (Fig. 6), nas demais populações analisadas as diferenças não foram significativas. Analisando α -1,4-Glucanases, houve atividade enzimática em todos os grupos porém não foi possível detectar diferenças significativas entre as populações ou entre isolados coletados de hospedeiros diferentes, diferenças foram encontradas apenas entre isolados da mesma população.

Estudos filogenéticos baseados em RAPD propiciam informações suficiente para diferenciar indivíduos de mesma espécie. Hsiang e Mahuku (1999) trabalharam com isolados

zando como método RAPD e IGS-RFLP os quais os do presente trabalho com relação à distância genética entre populações. Os autores estudaram populações de Ontário no Canadá, nas quais se observou 50,7% de variação genética entre populações de Ontário e 49,3% de variação entre essas populações. Comparando-se a população do Canadá às populações do Japão houve completa distinção entre as duas localidades.

No presente trabalho, os marcadores de RAPD foram efetivos na detecção de diferenças genéticas entre os isolados de *S. sclerotiorum*. Foram amplificadas regiões do DNA dos isolados a partir de 13 primers aleatórios, sendo obtidos 73 fragmentos de DNA amplificados passíveis de análise. As diferenças entre os marcadores de RAPD foram analisadas para indicar a relação genética entre os grupos de isolados. Do total de bandas obtidas 94% foram polimórficas, sendo que os oligonucleotídeos variaram na quantidade de fragmentos de DNA polimórficos amplificados.

A maior parte da variabilidade genética obtida, neste trabalho foi dentro das populações com 83% do total de variação, sendo o restante taxa de variabilidade entre as populações com 16% do total de variabilidade. Resultado semelhante foi obtido por Sun *et al.* (2004) os quais analisaram isolados de *S. sclerotiorum* obtidos no Canadá em plantações de cenoura e na Polônia coletados em plantações de canola. Mesmo existindo diferentes hospedeiros de origem e grande distância geográfica entre os isolados foi observado nesse trabalho baixa variabilidade genética entre as duas populações. Não foi encontrado relação entre hospedeiro de origem e variabilidade genética entre os isolados. Fato semelhante ocorreu no presente trabalho em que não se observou existir correlação entre variabilidade e os tipos de hospedeiro.

Gomes *et al.* (2010) analisaram 79 isolados divididos em quatro populações de *S. sclerotiorum* obtidos plantações de feijão. As coletas foram realizadas de forma aleatória na região de cerrado do Brasil com distância entre os pontos de 50 km. A diversidade genética foi verificada por meio de análise de regiões microssatélites e sequenciamento de região ITS. Nesse trabalho foi observado 28,79% de variabilidade genética entre as populações obtidas. Quando a análise foi feita dentro das populações obtidas essa variabilidade se estendeu para 71,21% de variabilidade genética. Essa variabilidade genética de *S. sclerotiorum* no Brasil pode ser suportada por vários fatores, entre eles o manejo das lavouras e pelo próprio ciclo propagação do fungo. Dos vários fatores que afetam essa diversidade estão: a baixa de

como campo ou utilização de culturas susceptíveis
amenas com períodos de inverno brando, baixo controle
de qualidade das sementes utilizadas e ciclo de germinação do fungo carpogênico e
miceliogênico (Malvarez, *et al.* 2007)

Segundo YEH (2000), uma estimativa de F_{ST} menor que 0,05 representa um baixo nível de diferenciação genética, de 0,051 a 0,150 um nível médio e de 0,151 a 0,250 um alto nível de diferenciação. O índice de fixação (F_{ST}) calculado para os isolados deste trabalho foi de (F_{ST}) = 0,16937 demonstrando a grande diversidade genética das populações estudadas, e consequentemente indicando que há uma alta variabilidade genética. Hemmati *et al.* (2009) classificaram como alto e/ou moderado os níveis de diversidade genotípica entre 276 isolados do Irã de quatro populações de *S. sclerotiorum* separadas geograficamente, sendo que a diversidade genotípica não diferiu significativamente. Isto pode ser devido à alta taxa de mutação no DNA de isolados de *S. sclerotiorum*, o que também foi obtido por outros estudos de Kohn *et al.* (1991).



Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Os resultados deste trabalho permitiram concluir que a técnica do RAPD mostrou-se eficiente na determinação da variabilidade genética em *Sclerotinia sclerotiorum*. Os isolados de *S. sclerotiorum* obtidos de diferentes regiões do Brasil apresentam alto índice de variabilidade intrapopulacional com base em análise de dados moleculares AMOVA do RAPD. A formação dos grupos de compatibilidade miceliais indicou um grande grupo envolvendo isolados de todas as regiões sendo que este não se correlacionou com os ramos do dendograma representativo das distâncias genéticas. Houve baixo índice de variabilidade interpopulacional indicado pela análise RAPD e pelos níveis de enzimas hidrolíticas produzidas pelo fungo entre as populações.

O estudo da diversidade de *S. sclerotiorum* neste trabalho poderá ser complementado através de:

1. Ampliação do número de isolados com amostras de mais localidades do país para traçar um melhor perfil dos isolados brasileiros.
2. Analisar outras características de determinantes de agressividade como produção de ácido oxálico.
3. Utilizar técnicas com melhor abrangência de detecção de variabilidade genética como microssatélites ou sequenciamento de região ITS.

ABAWI, G.S.; GROGAN, R.G. Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia species*. **Phytopathology**. v. 69, p. 8996904, 1979.

ADAMS, P.B.; AYERS, W.A. *Sclerotinia sclerotiorum*: ecology of *Sclerotinia species*. **Phytopathology**. v. 69, p.8966899, 1979.

ALGHISI, P.; FAVARON, F. Pectin-degrading enzymes and plant parasite interactions. **Eur. J. Plant Pathol.**, v. 101, p.3656375, 1995.

ATALLAH Z. K.; LARGET B.; CHEN X.; JOHNSON D. A. High Genetic Diversity, Phenotypic Uniformity, and Evidence of Outcrossing in *Sclerotinia Sclerotiorum* in the Columbia Basin of Washington State. **Phytopathology**, v. 94, p. 737 ó 742. 2004.

BAJPAI, P. Biological bleaching of chemical pulps. **Crit. Rev. Biotechnol.** v.24, p.1658, 2004.

BELIËN T.; CAMPENHOUT, S.V.; ROBBEN, J.; VOLCKAERT G.; Microbial endoxylanases: effective weapons to breach the plant cell-wall barrier or, rather, triggers of plant defense systems? **Mol. Plant-Microbe Interact.** v.19, p.107261081, 2006.

BELIEN, T.; CAMPENHOUT, S.V.; ACKER, M.A.; ROBBEN, J.; COURTIN, C.M.; DELCOUR, J.A.; VOLCKAERT, G. Mutational analysis of endoxylanases XylA and XylB from the phytopathogen *Fusarium graminearum* reveals comprehensive insights into their inhibitor insensitivity. **Applied and environmental microbiology**, p. 460264608, 2007.

BHAT, M.K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzimas and their potential industrial applications. **Biotechnology advances**. v. 15, p. 583-620, 1997.

BINNECK, E.; NEDEL, J.L.; DELLAGOSTIN, O.A. Análise de RAPD na identificação de cultivares: uma metodologia útil? **Revista Brasileira de Sementes** n. 24, p. 183-196, 2002.

BOLAND, G.J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology** n. 16, p. 93-108, 1994.

H.J.; NELSON, B.D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de
f a cosmopolitan pathogen. **Mol Plant Pathol.** v. 7, p. 16
16, 2006.

BRUFAU, J.; FRANCESCH, M.; PEREZ-VENDRELL, A. M. The use of enzymes to
improve cereal diets for animal feeding. **J. Sci. Food Agric.** v.86, p.170561713, 2006.

CARPENTER, M. A.; FRAMPTON, C.; STEWART, A. Genetic variation in New Zealand
populations of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **New Zealand Journal of Crop
and Horticultural Science**, v. 27, p. 13 ó 21. 1999

COPA-PATINO, J.; REYES, F.; PEREZ-LEBLIC, M. I. Purification and properties of a 1,3-
-glucanase from *Penicillium oxalicum* autolysates. **FEMS Microbiol. Lett.** v.65 p. 2856292,
1989.

COPPIN, E; DEBUCHY, R; ARNAISE, S; PICARD, M. Mating types and sexual
development in filamentous ascomycetes. **Microbiol Mol Biol Rev.** v. 61 n. 4, p. 411-428,
1997.

COSTA, G. R.; COSTA, J.L.S. Influência do solo e de substratos para produção de
escleródios na germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesquisa Agropecuária
Tropical**, n. 36 v. 2 p. 83-87, 2006.

COTTON, P.; KASZA, Z.; BRUEL, C.; RASCLE, C.; FE'VRE, M. Ambient pH controls the
expression of endopolygalacturonase genes in the necrotrophic fungus *Sclerotinia
sclerotiorum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 227, p.163-169, 2003.

CUBETA, M. A.; CODY, B. R.; KOHLI, Y. & KOHN, L. M. Clonality in *Sclerotinia
sclerotiorum* on infected cabbage in eastern North Carolina. **Phytopathology**, v. 87, p. 1000 ó
1004, 1997.

CRUZ, C. D. **Genes versão 98.2.0**: Programa para análise e processamento de dados baseado
em modelos de genética e estatística experimental. Viçosa, MG: UFV, 1998.

DICKMAN, M.B.; MITRA, A. Arabidopsis thaliana as a model for studying *Sclerotinia
sclerotiorum* pathogenesis. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** v. 41, p.2556263, 1992.

..., T.; LANE, B.G.; DAVIDSON, A.L.; SIMMONDS, J. Active oligomeric oxalate oxidase from the wheat *gf-2.8* (germin) gene are resistant to the oxalate-secreting pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Physiol Mol Plant Pathol** v. 59, p. 297-307, 2001.

DUTECH, C.; ENJALBERT, J.; FOURNIER, E.; FRANÇOIS, D.; BARRES, B.; CARLIER, J.; THARREAU, D.; GIRAUD, T. Challenges of microsatellite isolation in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v.44, p.933-949, 2007.

DUTTON, M.V.; EVANS, C.S. Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the environment. **Can. J. Microbiol.** v.42, p.881-895, 1996.

EDNEY, M.J.; MARCHYLO, B.A.; MACGREGOR, A.W. Structure of total barley-glucan. **J. Inst. Brew.** v. 97 p. 39-44, 1991.

FALEIRO, F.G.; LUZ, E. D. M.N.; CERQUEIRA, A. O.; C. ROCHA, S.S. Uso de marcadores RAPD na classificação de isolados de *Phytophthora* spp. causadores da podridão parda do cacauero no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**. v.28, p. 312-315, 2003.

FAVARON, F.; SELLA, L.; D'AMORIM, R. Relationships Among Endo-Polygalacturonase, Oxalate, pH, and Plant Polygalacturonase-Inhibiting Protein (PGIP) in the Interaction Between *Sclerotinia sclerotiorum* and Soybean. **The American Phytopathological Society**, n. 12, v.17, p. 1402-1409, 2004.

FERDINANDO, G. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: vol. 1. 2^a. Ed. Agronômica Ceres, 1980.

FERRAZ, L.C.L.; BERGAMIN, A.; AMORIM, L.; NASSER, L.C.B. Viabilidade de *Sclerotinia sclerotiorum* após a solarização do solo na presença de cobertura morta. **Fitopatol. bras.** v.28, n.1, 2003.

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

FRAISSINET-TACHET L.; REYMOND-COTTON P.; FEVRE M. Characterization of a multigene family encoding an endo-galacturonase in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Curr Genet**, v. 29, p. 96-99, 1995.

E, M. Regulation by galacturonic acid of pectinolytic
Sclerotinia sclerotiorum. **Curr. Microbiol.** v.33, p.49653, 1996.

FRITSCH, P.; RIESEBERG, L. H. The use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics. *In*: Smith, T. B. & Wayne, R. K. (Ed.). **Molecular genetic approaches in conservation**, New York: Oxford University Press, pp. 54-73, 1996

GAO, S., CHOI, G.H., SHAIN, L. AND NUSS, D.L. Cloning and targeted disruption of *enpg-1*, encoding the major in vitro extracellular endopolygalacturonase of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. **Appl. Environ. Microbiol.** v.62, p.198461990, 1996.

GARNJOBST, L.; WILSON, J. F.; Heterokaryosis and protoplasmic incompatibility in *Neurospora crassa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.42, p.6136618, 1956.

GLASS, N.L.; JACOBSON, D.J.; SHIU, P.K. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. **Annu Rev Genet** v.34, p.1656186, 2000.

GLASS, N.L.; KULDAU, G.A. Mating type and vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes. **Annu Rev Phytopathol** v.30, p.2016224, 1992.

GODOY, G.; STEADMAN, J.R.; DICKMAN, M.B.; DAM, R. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. **Physiol. Mol. Plant. Pathol.** v.37, p.179-191, 1990.

GOMES, E.V., NASCIMENTO, L.B.; FREITAS, M.A.; NASSER, L.C.B.; PETROFEZA, S. Microsatellite Markers Reveal Genetic Variation within *Sclerotinia sclerotiorum* Populations in Irrigated Dry Bean Crops in Brazil. **J Phytopathol**, doi:10.1111/j.1439-0434.2010.01724.x

HADRYIS, H.; BALICK, M.; SCHIERWATER, B. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. **Molecular Ecology**, v. 1, p. 55-63, 1992.

HALL, R.; NASSER, L.C.B. Practice and precept in cultural management of bean diseases. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 18, p. 176-185, 1996.

HAMBLETON, S.; WALKER, C.; KOHN, L.M. Clonal lineages of *Sclerotinia sclerotiorum* previously known from other crops predominate in 1999-2000 samples from Ontario and Quebec soybean. **Can. J. Plant Pathol.** v.24, p.309-315, 2002.

Sclerotinia sclerotiorum: when to be or not to be a
. 251, p. 1776184, 2005.

HEMMATI, R., JAVAN-NIKKHAH, M.; LINDE, C.C. Population genetic structure of *Sclerotinia sclerotiorum* on canola in Iran. **Eur. J. Plant Pathol.**, v.125, p.617-628, 2009.

HENRISSAT, B.; DRIGUEZ, H.; VIET, C.; SCHULTEIN, M., Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. **Bio/Technology**. v. 3, p. 7226726, 1985.

HENSON, J.M.; BUTLER, M.J.; DAY, A.W. The dark side of mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. **Annu. Rev. Phytopathol.** v. 37, p. 4476471, 1999.

HSIANG, T.; MAHUKU, G.S. Genetic variation within and between southern Ontario populations of *Sclerotinia homoeocarpa*. **Plant Pathol** v.48, p.83694, 1999.

HUNTER, J. E.; PEARSON, R. C.; SEEM, R. C.; SMITH, C. A.; ALUMBO, D. R. Relationship between soil moisture and occurrence of *Sclerotinia sclerotiorum* and white mold disease on snap beans. **Protection Ecology**, n.7, p.269-280, 1984.

JONES, J. B.; JONES, J.P.; STALL, R. E.; ZITTER, T. A. (ED.). Compendium of tomato diseases. **St. Paul: APS**, 1991.

KADAM, S.K.; DEMAIN, A.L. Addition of cloned β -glucosidase enhances the degradation of crystalline cellulose by *Clostridium thermocellum* cellulose complex. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 161 p. 706-711, 1999.

KARS, I.; KROOSHOF, G.; WAGEMAKERS, L.; JOOSTEN, R.; BENEN, J.; VAN KAN, J.A. Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*. **Plant J.** v. 43, p. 2136225, 2005.

KASZA Z., VAGVOLGYI C., FEVRE M., COTTON P. 2004. Molecular characterization and *in planta* detection of *Sclerotinia sclerotiorum* endopolygalacturonase genes. **Current Microbiology** v. 48 p. 208-213, 2004

KAUFFMANN, S.; LEGRAND, M.; GEOFFREY, P.; FRITIG, B. Biological function of pathogenesis-related proteins: four PR proteins of tobacco have β -1,3-glucanase activity. **EMBO J.** v.11 p.320963212, 1987.

), P.; GEOFFREY; B. FRITIG. Biological function of
PR proteins of tobacco have α -1,3-glucanase activity.
EMBO J. 11:320963212, 1987.

KEON, J.P.R., BYRDE, R.J.W. AND COOPER, R.M. Some aspects of fungal enzymes that
degrade plant cell walls. In *Fungal Infection of Plants* (Pegg, G.F. and Ayres, P.G., eds).
Cambridge: Cambridge University Press, p.1336157 1987.

KLEBL, F.; TANNER, W. Molecular cloning of a cell wall α -1,3- glucanase from
Saccharomyces cerevisiae. **J. Bacteriol.** v.171, p.625966264, 1989.

KOHLI, Y.; KOHN, L.M. Detection of random association among loci in clonal populations
of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal Genetics and Biology.** v. 23, p. 139-149, 1998.

KOHLI, Y.; MORRALL, R.A.A.; ANDERSON, J.B.; KOHN, L.M. Local and trans-
Canadian clonal distribution of *Sclerotinia sclerotiorum* on canola. **Phytopathology** n. 82, p.
8756880, 1992.

KOHN, L. M. The clonal dynamic in wild and agricultural plant-pathogen populations.
Canadian Journal Botanical, v. 73 , p. S1231 ó S1240. 1995.

KOHN, L. M.; SCHAFER, M. R. An optimized method for mycelial compatibility testing in
Sclerotinia sclerotiorum. **Mycologia**, v. 98, p. 5936597, 2006.

KOHN, L. M.; STASOVSKI, E.; CARBONE, I.; ROYER, J.; ANDERSON, J. B. Mycelial
incompatibility and molecular markers identify genetic variability in field populations
of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology** v.81, p.480-485, 1991.

LACERDA, D.R.; ACEDO, M.D.P.; LEMOS FILHO, J. P.; LOVATO, M.B. A técnica de
RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. Belo Horizonte-
UFMG, **Lundiana**, v.3, n. 2, p.87-92, 2002.

LEITE, R.M.V.B.C.; OLIVEIRA, M.F.; VIEIRA, O.V.; CASTIGLIONI, V.B.R. Incidência
da podridão branca causada por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol semeado após a colheita
da safra de verão, no Estado do Paraná. **Summa Phytopathologica**, v.26, p.81-84, 2000.

LI, R., RIMMER, R., BUCHWALDT, L., SHARPE, A.G., SE'GUIN-SWARTZ, G. AND HEGEDUS, D.D. Interaction of *Sclerotinia sclerotiorum* with *Brassica napus*: cloning and characterization of endoand exo-polygalacturonases expressed during saprophytic and parasitic modes. **Fungal Genet. Biol.** v.41, p.7546765, 2004.

LOBO JÚNIOR, M. Epidemiologia da podridão de esclerotínia em tomateiro para processamento industrial. 1999. 117 f. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

LORENZO, G.; D'AMICO, R.; CERVONE, F. The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. **39**, p. 3136335, 2001.

LORITO, M.; HAYES, C. K.; DI PIETRO, A.; WOO, S. L.; HARMAN, G. F. Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan 1,3-b-glucosidase and an N-acetyl-b-glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**. v.84, p.3986405, 1994.

LUMSDEN, R.D. Pectolytic enzymes of *Sclerotinia sclerotiorum* and their localization on infected bean. **Can. J. Bot.** v. 54, p.263062641 1976.

MALVAREZ, G.; CARBONE, I.; GRUNWALD. N.J.; SUBBARAO. K.V.; SCHAFFER. M.; KOHN. L.M. New populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from lettuce in California and peas and lentils in Washington. **Phytopathology**. v. 97p. 470-483, 2007.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, v.27, p. 209-220, 1967.

MARCIANO, P., DI LENNA, P. AND MAGRO, P.; Oxalic acid, cell alldegrading enzymes and pH in pathogenesis and their significance in the virulence of two *Sclerotinia sclerotiorum* isolates on sunflower. **Physiol. Plant Pathol.** v.22, p.3396345 1983.

MARTEL, M.B.; LETOUBLON, R.; FEVRE, M. Purification of endopolygalacturonases from *Sclerotinia sclerotiorum*: multiplicity of the complex enzyme system. **Curr. Microbiol.** v. 33, p. 2436248, 1996.

McLLROY, S., JAYUS, CHEN, J., SEVIOUR, R. J.
y of exocellular fungal α -(1,3) and α -(1,6) glucanases.

FEMS Microbiol. v. 31 p. 168-192, 2007.

MASIREVIC, S.; GULYA, T.J. Sclerotinia and Phomopsis - two devastating sunflower pathogens. **Field Crops Research**, v. 30, p. 271- 300, 1992.

MEINHARDT, L. W.; WULFF, N, A.; BELLATO, C, M.; TSAI, S. M. Telomere and microsatellite primers reveal diversity among Sclerotinia sclerotiorum isolates from Brazil. **Fitopatol. bras**, vol.27, n.2, p.211-215, 2002

MILLER G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** V.31, p.426-428, 1959.

MRSA, V.; KLEBL, F.; TANNER, W. Purification and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* BGL2 gene product, a cell wall endo- β -1,3-glucanase. **J. Bacteriol.** v. 175, p. 2102-2106, 1993

NEALE, A. D.; WAHLEITHNER, J. A.; LUND, M.; BONNET, H. T.; KELLY, A.; RY MEEKS-WAGNER, D.; PEACOCK, W. J.; DENNIS, E. S. Chitinase, β -1,3-glucanase, osmotin, and extensin are expressed in tobacco explants during flower formation. **Plant Cell** v.2, p.673-684, 1990.

NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restrictions endonucleases. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, DC, v. 74, p. 5267-5273, 1979.

POUSSEREAU, N. ; GENTE. S.; RASCLE. C. ; BILLON-GRAND. G.; FÈVRE. M. aspS encoding an unusual aspartyl protease from *sclerotinia sclerotiorum* is expressed during phytopathogenesis. **Fems Microbiol Lett.** n. 194, v. 1, p. 27-32, 2001.

PEBERDY, J. F.; KUHN, P. J. A.. Fungal cell wall, a review. **In Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Fungi.** p. 5-24. 1990.

PEEVER, T.L.; SALIMATH, S.S.; SU G.; KAISER, W.J.; MUEHLBAUER, F.J. Historical and contemporary multilocus population structure of *Aschocyta rabiei* (teleomorph: *Didymella rabiei*) in the Pacific Northwest of the United States. **Mol Ecol**, n. 13, p. 291-309, 2004

CDOUGALL, R. J. Noncellulolytic fungal α -glucanases: *Appl. Environ. Microb. Technol.* v. 15 p. 1786192, 1993.

RABOUAM, C.; COMES, A. M.; BRETAGNOLLE, V.; HUMBERT, J.; PERIQUET, G.; BIGOT, Y. Features of DNA fragments obtained by random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays. *Molecular Ecology*. v. 8, p. 493-503, 1999.

RAPP, P. Formation, separation and characterization of three β -1,3-glucanases from *Sclerotium glaucum*. *Biochim. Biophys. Acta* v.1117, p.7614, 1992.

REESE, E. T., M. MANDELS. α -D-1,3-Glucanases in fungi. *Can. J. Microbiol.* v.5 p.1736-185, 1959.

RIOU, C., FREYSSINET, G. AND FÈVRE, M. Purification and characterization of extracellular pectinolytic enzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Appl. Environ. Microbiol.* v.58, p.5786583, 1992.

ROHLF, J. F. **NTSYSpc**: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.0. New York. 1998.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* v.30, p.2796291, 2003.

SAUPE, S.J.; Molecular genetics of heterokaryon incompatibility in filamentous ascomycetes. *Microbiol Mol Biol Rev* v.64, p.4896502, 2000.

SCHAEFFER, H. J.; LEYKAN, J.; WALTON, J. D. Cloning and targeted gene disruption of *EXG1*, encoding α -D-1,3-glucanase, in the hytopathogenic fungus *Cochliobolus carbonum*. *Appl. Environ. Microbiol.* v.60, p.5946598, 1994.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin ver. 2000**: a software for population data analysis. (software). Geneva: University of Geneva: Genetic and Biometry Laboratory, 2000.

SCOTT, J.; STRAUS, N. A Review of the Current Methods in DNA Finger Printing. In: Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification, Samson, R.A. and J.I. Pitt (Eds.). **Harwood Academic Publishers Netherlands**, p. 2096224, 2000.

VIDIO, R.; FAVARON, F. Expression of two *Sclerotinia* species with endo-polygalacturonase activity during *glycine max* colonization. **Journal of Plant Pathology**, v. 87, p. 199-205, 2005.

SEXTON, A. C.; HOWLETT, B. J. Microsatellite markers reveal genetic differentiation among populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from Australian canola fields. **Current Genetics**, v. 46, p. 357-365, 2004.

SIRJUSINGH, C. & KOHN, L. M. Characterization of microsatellites in the fungal plant pathogen, *Sclerotinia sclerotiorum*. **Molecular Ecology Notes**, v. 1(4), p. 267 ó 269. 2001.

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

SPERISEN, C.; RYAHS, J.; MEINS, F. Comparison of cloned genes provides evidences for intergenomic exchange of DNA in the evolution of a tobacco glucan endo-1,3-b-glucosidase family. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v.88, p.1820ó1824, 1991.

STAHMANN, K. P., PIELKEN, P.; SCHIMZ, K. L.; SAHM, H. Degradation of extracellular -(1,3)-(1,6)-D-glucan by *Botrytis cinerea*. **Appl. Environ. Microbiol.** v.58 p.3347ó3354, 1992.

STAHMANN, K. P., SCHIMZ, K. L.; SAHM, H. Purification and characterization of four extracellular 1,3-b-glucanases of *Botrytis cinerea*. **J. Gen. Microbiol.** v.139, p.2833ó2840, 1993.

STAHMANN, P.; SCHIMZ, K.L.; SAHM, H. Purification and characterization of four extracellular 1,3- -glucanases of *Botrytis cinerea*. **Journal of General Microbiology**, v.139 p.2833-2840, 1993.

SUN, J.; IRZYKOWSKI, W.; JEDRYCZKA, M.; HAN, F. Analysis of the Genetic Structure of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary Populations from Different Regions and Host Plants by Random Amplified Polymorphic DNA Markers. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.47, p.385-395, 2005.

S, A.P. MACHADO, J.C. Fungicidas aplicados via água
panco no feijoeiro e incidência do patógeno na semente.

Fitopatol. Brás. vol. 26 n. 4, 2001.

VOIGT, K.; SCHLEIER, S.; BRÜCKNER, B. Genetic variability in *Gibberella fujikuroi* and some related species of the genus *Fusarium* based on random amplification of polymorphic DNA (RAPD). **Current Genetics**, n.27, p.361-368, 1995.

WALTON, J.D. Deconstructing the cell wall. **Plant Physiol.** v.104, p. 1113-1118, 1994.

WATANABE, T., KASAHARA, N.; AIDA, K.; TANAKA H. Three N-terminal domains of b-1,3-glucanase A1 are involved in binding to insoluble b-1,3-glucan **J. Bacteriol.** v. 174, p.1866-1890, 1992.

WAUGH, R. RAPD Analysis: use for genome characterization tagging traits and mapping. In: CLARK, M.S. (Ed.). **Plant Molecular Biology: a laboratory manual.** Germany: Springer-Verlag, p. 302-330, 1997.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population-structure. **Evolution**, v. 38 (6), p. 1358-1370. 1984.

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

WILLIAMS, J.G., 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 Res.**, v.18, p.6531-6535, 1990.

WOLFF, K.; MORGAN-RICHARDS, M. PCR markers distinguish *Plantago major* subspecies. **Theoretical and Applied Genetics.** v. 96, p. 282-286, 1998.

WOODWARD, J.R.; PHILLIPS, D.R.; FINCHER, G.B. Water soluble (1-3), (1-4)- β -D-glucans from barley (*Hordeum vulgare*) endosperm. **Physicochemical properties. Carbohydr. Polym.**, v. 3, p. 143-156, 1983.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of population:** variability within and among natural populations. Chicago: University of Chicago Press, 1978. 590p.

N HAVE, A.; VAN KAN J.A.; VISSER, J. Cloning and
galacturonase genes from *Botrytis cinerea*. **Appl Environ**

Microbiol, v. 65, p. 1596-1602, 1999.

YEH, F.C. Population genetics. *In: Forest conservation genetics: principles and practice*.
A.Young, D. Boshier & T.Boyle (eds.), p. 21-37. Collingwood: CSIRO Publishing. 2000.

YORINORI, J. T.; FEKSA, H. Importância da podridão branca da haste da soja (*Sclerotinia
sclerotiorum*) no Sul do Paraná. *In: Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil*,
Londrina, PR. Resumos. Londrina, PR : Embrapa Soja, p. 119-120, 2001.

ZIMMER, D.E.; HOES, J.A. Diseases. *In: Sunflower science and technology* (Ed. by Carter,
J.F.), **American Society of Agronomy**, Madison, USA pp. 225-262, 1978.

ZUPPINI, A.; NAVAZIO, L.; SELLA, L.; CASTIGLIONI, J.; FAVARON, F.; MARIANI, P.
An endopolygalacturonase from *Sclerotinia sclerotiorum* induces calcium-mediated signaling
and programmed cell death in soybean cells. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. **18**,
p. 849-855, 2005.

ZUCCHI, M. I. Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando
marcadores RAPD e SSR. **Tese de Doutorado** ó Universidade de São Paulo ó USP, Escola
Superior de Agricultura ó Luiz de Queiroz, São Paulo ó SP. 2002.