



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIAS – UFG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

Análise de Populações de *Sclerotinia sclerotiorum* em Cultura de Feijoeiro Através de Marcadores SSR.

ERISTON VIEIRA GOMES

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

GOIÂNIA – GO
2005



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIAS – UFG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

Análise de Populações de *Sclerotinia sclerotiorum* em Cultura de Feijoeiro Através de Marcadores SSR.

ERISTON VIEIRA GOMES

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

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Goiás, para a obtenção do título de mestre em Biologia. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

GOIÂNIA – GO
2005

Dedico este trabalho à minha família pelo apoio a mim dedicado. A minha mãe Sebastiana, meu pai Eurípedes, minha filha Evelin, desculpe a ausência, meus irmãos Sérgio, Elma, Wagner e Waldir e finalmente à minha ex-mulher Roberta pela força.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por ter me iluminado em todas as fases desse trabalho.

À professora Dr.^a Silvana Petrofeza, pela oportunidade e confiança em mim depositados, pela ótima orientação em todos os sentidos, profissional, acadêmico, pessoal, moral e ético. Obrigado pela consideração e amizade.

Ao professor Dr.^o Carlos Eduardo Anunciação, por me acolher em seu laboratório quando necessário.

Às professoras do laboratório de Citogenética, Dr.^a Rosângela Hatori e Dr.^a Elisângela de Paula Silveira Lacerda, pelo apoio, atenção e possibilitar a utilização da estrutura do laboratório.

Ao professor Dr.^o Alexandre Siqueira Coelho, pela orientação estatística, suporte técnico e físico e todos os integrantes do laboratório de Genética Vegetal, pela estrutura, auxílio, amizade e paciência.

Ao professor Dr.^o Cirano José Ulhoa, e todos os integrantes do laboratório de Enzimologia, pelo apoio e fornecimento de subsídios necessários à confecção deste trabalho.

Aos colegas Fernando, Carlos Alberto, Ana Carolina, Eduardo Veronese, que ajudaram direta e indiretamente na conclusão deste trabalho.

ÍNDICE

| | |
|------------------------|------|
| Lista de Tabelas..... | iv |
| Lista de Figuras..... | v |
| Lista de Gráficos..... | vi |
| Resumo..... | vii |
| Abstract..... | viii |

| | |
|---|----|
| 1. Introdução..... | 1 |
| 1.1. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> | 1 |
| 1.1.1 Infecção..... | 2 |
| 1.1.2 Epidemiologia..... | 4 |
| 1.2 Marcadores Moleculares..... | 5 |
| 1.2.1 Marcadores Baseados em Microssatélites..... | 6 |
| 1.3 Variabilidade Genética em Isolados de <i>S. sclerotiorum</i> utilizando Marcadores Moleculares..... | 8 |
| 2.0 Justificativa..... | 11 |
| 3.0 Objetivos..... | 12 |
| 4.0 Materiais e Métodos..... | 13 |
| 4.1 Coleta dos Isolados..... | 13 |
| 4.2 Extração de DNA..... | 15 |
| 4.3 Amplificações..... | 15 |
| 4.4 Análise de Dados Moleculares..... | 16 |
| 5.0 Resultados..... | 17 |
| 6.0 Discussão..... | 25 |
| 7.0 Conclusões..... | 30 |
| 8.0 Perspectivas..... | 31 |
| 9.0 Referencias Bibliográficas..... | 32 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 01. Isolados de <i>S. sclerotiorum</i> oriundos de cultura de feijoeiro no PAA/Distrito Federal (Safra 2001)..... | 14 |
| Tabela 02. Descrição de oligonucleotídeos utilizados em população de isolados de <i>S. sclerotiorum</i> provenientes de cultura de feijoeiro irrigado por sistema de pivô central na região do entorno de Brasília – DF..... | 19 |
| Tabela 03. Teste de Variância (AMOVA), indicando a variabilidade entre e dentro de populações de <i>S. sclerotiorum</i> | 21 |
| Tabela 04. Identificação dos <i>loci</i> que apresentaram alelos exclusivos entre as populações de <i>S. sclerotiorum</i> analisadas, indicando suas respectivas frequências dentro de cada população..... | 22 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01:** Metodologia de coleta dos isolados de *S. sclerotiorum* a partir de sistemas de irrigação por pivô central.....13
- Figura 02:** Perfil eletroforético de produtos de amplificação de marcadores microssatélites com oligonucleotídeo 106-4 em três populações (S₂, S₃ e A) de *S. sclerotiorum*.....18
- Figura 03:** Perfil eletroforético de produtos de amplificação com os oligonucleotídeos A)7-2 e B)13-2 em gel de poliacrilamida 6%, com indivíduos das populações S₂, S₃, A e Mista de *S. sclerotiorum*.....19
- Figura 04:** Fenograma segundo método UPGMA, indicando a distancia genética utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard entre populações de *S. sclerotiorum*.....24

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 01:** Representação gráfica da diversidade alélica de isolados de *S. sclerotiorum* segundo o índice de Nei.....20
- Gráfico 02:** Representação gráfica indicando alta diversidade genética entre as populações S₂, S₃, A e Mista, de *S. sclerotiorum* na região do entorno de Brasília - DF.....21
- Gráfico 03:** Representação gráfica indicando o número de alelos privados presentes em cada população analisada de *S. sclerotiorum*.....23

RESUMO

Foram coletados 79 isolados de *S. sclerotiorum*, sob sistemas de irrigação por pivô central, provenientes da região do entorno de Brasília – DF, divididos em 4 populações (S₂, S₃, A e M) e analisados, quanto a sua variabilidade intra e interpopulações utilizando marcadores moleculares baseados em microssatélites. Foram utilizados 10 conjuntos de oligonucleotídeos e o produto de amplificação desses marcadores foram separados em géis de poliacrilamida e corados com nitrato de prata. Um total de 102 alelos foram identificados, sendo que a quantidade de alelos variou de 6 a 18 por locus e a diversidade alélica variou de 65% a 91%. A variabilidade entre as populações foi de 28.79% ($F_{st} = 28793$) e a variabilidade dentro das populações foi de 71.21%. O índice de similaridade de Jaccard indicou que as populações S₂ e A são as populações geneticamente mais próximas, a população S₃ apresentou um índice de similaridade de 0.44 em relação as populações S₂ e A e a população M proveniente de vários sítios de coleta foi considerada a população geneticamente mais distante. A alta variabilidade dentro e entre populações pode indicar que esteja havendo reprodução tanto sexuada como assexuada em isolados de *S. sclerotiorum* da região do entorno de Brasília – DF.

ABSTRACT

79 *Sclerotinia sclerotiorum* isolates were collected under central pivot irrigations systems, from Brazilian fields, divided in 4 populations (S₂, S₃, A and M) and analyzed to determine the genetic variability among and between populations using molecular markers based on microsatellites. 10 primers were used and the amplification products were separate in poliacrilamida gels and the bands were silver stained. A total of 102 different haplotypes were identified, and the amount of haplotypes varied from 6 to 18 for locus. The genotypic diversity ranged from 65% to 91%. Analyses based on genetic diversity and fixation indices which indicate the variability between populations was 28.79% ($F_{ST} = 28793$) and the variability among populations was 71.21%. The Jaccard similarity index indicated that the populations S₂ and A is genetically closer. The population S₃ presented a similarity index of 0.44 compared with the populations S₂ and A. The population M, originated from several collection sites, was considered genetically more distant showing a index of 0.46 compared with the others populations . The high variability between and among populations can indicate that, besides the possible introduction of new genotypes in the analyzed fields, could be having clonal and sexual reproduction in isolated of *S. sclerotiorum* from Brazilian cerrado.

1. INTRODUÇÃO:

1.1 – *Sclerotinia sclerotiorum*:

Fungos fitopatogênicos são causadores de sérias doenças em plantas e são caracterizados pela sua maior complexidade e diversidade em relação a outros patógenos microbianos. Essa diversidade é salientada pela extraordinária gama de hospedeiros observada em alguns patógenos e a extrema especialização de outros. Fungos patogênicos são únicos também capazes de romper diretamente a superfície da planta, utilizando um número de mecanismos bioquímicos e morfogênicos para realizar essa tarefa. Por essa razão, seu controle é de grande significância para a economia agrícola (BAKER *et al.*, 1997).

A agricultura irrigada intensiva e fixa como sistema de cultivo altera as condições microclimáticas: alta umidade, temperaturas entre 15-25°C e pH entre 4,5-5,0; portanto, interfere na ocorrência e incidência de doenças, principalmente de patógenos de solo, como *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (COSTA, 1996).

S. sclerotiorum (Lib.) de Bary é um dos mais importantes fitopatógenos de solo. Esse fungo infecta aproximadamente 400 espécies de plantas e causa danos econômicos a uma grande variedade de culturas (STEADMAN, 1979). As doenças causadas por *S. sclerotiorum* são mais comuns nas famílias *Solanaceae*, *Cruciferae*, *Umbelliferae*, *Compositae*, *Chenopodiaceae* e *Fabaceae* (WILLETTS & WONG, 1980).

O mofo branco, causado por *S. sclerotiorum*, é uma doença comum em muitos países dos cinco continentes (PURDY, 1979). O primeiro registro de ocorrência deste patógeno no Brasil foi feito em 1920 atacando batata (*Solanum tuberosum*), no Estado de São Paulo. Para a cultura do feijoeiro, o ataque deste patógeno foi relatado pela primeira vez em 1954, no Rio Grande do Sul (CHAVES, 1964).

S. sclerotiorum foi disseminado pelas regiões sul e sudeste nas décadas de 40 e 50 como um patógeno secundário para feijão comum e vegetais. A primeira epidemia severa deste patógeno no Brasil foi registrada em 1976, envolvendo sementes de lavouras de soja no Estado do Paraná e a partir dali sementes infectadas foram levadas para a região dos cerrados nos anos de 1980. Em quase 10 anos, *S. sclerotiorum* se tornou presente em 50%

das lavouras de feijão comum irrigadas com pivô central, causando severas epidemias de mofo branco e se tornando o principal patógeno em feijão comum destas regiões. Recentes registros mostraram que *S. sclerotiorum* está agora presente em quase todas as áreas irrigadas por pivô central, podendo causar até 100% de perda na produção de suas hospedeiras (LOBO Jr., 2002).

A introdução do inóculo nessas áreas ocorre em geral, pelo uso de sementes contaminadas de feijão ou de outras culturas. Sob condições favoráveis, a cada cultivo do feijoeiro há um incremento do inóculo no solo, resultando em elevada densidade de propágulos. As condições de cultivo de inverno, com temperatura moderada e umidade geralmente excessiva, favorecem a germinação dos escleródios do fungo e o desenvolvimento de epidemias da doença (CARDOSO *et al.* 1996).

1.1.1– INFECCÃO:

A infecção de plantas hospedeiras susceptíveis pode ocorrer a partir do micélio que se origina da germinação eruptiva do escleródio no solo (PURDY, 1979). Caso os nutrientes estejam disponíveis, o escleródio pode germinar diretamente com um novo crescimento micelial (germinação micelogênica). Se os nutrientes estiverem limitados, o escleródio pode germinar com a produção de um corpo de frutificação sexual especializado que, eventualmente libera numerosos esporos (germinação carpogênica) (VENETTE, 1998).

A infecção do feijão por *S. sclerotiorum* ocorre apenas se a umidade for mantida por um relativo longo período na interface do tecido do feijão e do inóculo. Aproximadamente de 48 a 72 horas de umidade contínua são necessários para que ocorra a infecção pelos ascósporos (ABAWI & GROGAN, 1975).

A doença se manifesta na haste, folhas e vagens, começando, geralmente, pelas partes mais próximas do solo, na forma de manchas aquosas que evoluem para podridão mole. Tecidos assim afetados são, então, cobertos pelo crescimento micelial branco cotonoso do patógeno que, gradualmente, forma massas compactas, inicialmente claras e finalmente pretas, de dimensões variáveis, mas visíveis a olho nu, os escleródios.

Dependendo do local e extensão da necrose a planta pode amarelecer e morrer (GALLI, *et al.*, 1980).

O escleródio consiste de uma massa compacta de hifa hialina entrelaçada, envolvida por uma camada de células com pigmentos negros (JONES & WATSON, 1969). O escleródio apresenta estrutura dura e resistente, que consiste de uma porção interior colorida chamada de medula e, externamente um revestimento protetor negro chamado de casca. A casca contém pigmentos de melanina os quais são altamente resistentes à degradação, enquanto a medula consiste de células ricas em glucanas e proteínas. A forma e o tamanho do escleródio dependem do hospedeiro onde eles são produzidos ou das plantas infectadas (NELSON, 1998).

O desenvolvimento do corpo de frutificação a partir do escleródio é condicionado a umidade e a proximidade da superfície do solo (VENETTE, 1998). Apenas os escleródios que se encontram na superfície do solo e até 5 cm de profundidade podem germinar, pois as estipes dos apotécios raramente atingem mais do que 5 cm de altura. O início da doença a partir do micélio, originado da germinação eruptiva do escleródio, é raro, pois demanda o contato das hifas com os tecidos susceptíveis das inflorescências e vagens (CARDOSO *et al.*, 1996). A formação do apotécio geralmente ocorre após um período de dormência do escleródio o qual, dependendo da região, pode estar resfriado ou congelado. Temperaturas baixas parece ser o fator predominante no “condicionamento” do escleródio que quando as condições do solo estão favoráveis (capacidade de umidade do campo acima de 50%, temperatura entre 15°C e 18°C) entre 10 – 14 dias o apotécio pode ser formado (VENETTE, 1998).

Os escleródios são produzidos no tecido hospedeiro e permanecem dormentes no solo (JONES & WATSON, 1969). Ademais, na ausência de hospedeiro suscetível, a persistência dos escleródios no solo pode atingir até oito anos (ADAMS & AYERS, 1979).

Relativamente pouco é conhecido sobre os eventos bioquímicos durante a germinação carpogênica. Por analogia com outras estruturas germinativas, pode-se esperar que materiais de reserva sejam metabolizados para fornecer compostos os quais são utilizados para síntese dos componentes do estipe e do apotécio (TOURNEAU, 1979).

A patogênese por *Sclerotinia spp.* é um fenômeno complexo. O sistema enzimático não parece ser muito diferente de outros fitopatógenos de solo similares, ou mesmo de

microrganismos saprófagos. *Sclerotinia spp.* como patógeno parece, entretanto, ser dependente de uma complexa combinação de fatores que podem dominar a planta hospedeira agindo rapidamente antes que o hospedeiro possa responder. Esses fatores incluem: acessórios para capacitar a penetração mecânica da cutícula do hospedeiro; formação de hifas de infecção organizadas e especializadas que são capazes de um rápido desenvolvimento intercelular abaixo da cutícula do hospedeiro e no córtex; elaboração de enzimas pectolíticas apropriadas e ácido oxálico para degradar a lamela média das células hospedeiras; cátions quelantes inibidores de atividades enzimáticas; mudança do pH do tecido hospedeiro para um ambiente mais favorável para a ação enzimática e tóxica para as células hospedeiras, fazendo que estas células desenvolvam uma menor resposta à invasão e produção de enzimas degradativas capazes de hidrolisar a parede celular e os constituintes protoplasmáticos fornecendo um suprimento constante e abundante de nutrientes para o crescimento rápido e desenvolvimento da hifa de infecção (LUMSDEN, 1979).

Os primeiros sintomas que geralmente desenvolvem nas folhas ou hastes jovens são as lesões encharcadas, que podem aumentar e se tornar uma podridão aquosa e macia na maioria dos hospedeiros (PURDY, 1979). Posteriormente, nos tecidos infectados, aparece uma eflorescência formada por um micélio cottonoso, constituindo os sinais característicos da doença, que sugerem o nome comum de mofo branco. Em seguida, este sinal adquire, paulatinamente, coloração chocolate a amarronzada (CARDOSO *et al.*, 1996).

1.1.2 – EPIDEMIOLOGIA:

O fungo *S. sclerotiorum* pode ser disseminado, à curta distância da fonte de inóculo, em torno de 100m pelos ascósporos transportados por correntes de ar, à média distância, pelos implementos agrícolas, animais (pássaros, insetos) e pelo homem, pois estes ascósporos podem sobreviver até 12 dias no campo (ABAWI & GROGAN, 1975) e a longa distância, pela semente ou outro material propagativo infectado. Cada apotécio pode produzir de 2 a 30 milhões de esporos em um período de alguns dias (VENETE, 1998).

1.2. – MARCADORES MOLECULARES:

O surgimento da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) na década de 80, desenvolvida por Mullis & Fallona, (1987), permitindo a síntese enzimática de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, provocou uma verdadeira revolução nas técnicas de biologia molecular, facilitando muito o trabalho de laboratório. AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*), são exemplos de várias técnicas baseadas em PCR que abriram novas e inúmeras possibilidades de utilização do polimorfismo encontrado na molécula de DNA. Dentre estas técnicas, destaca-se o surgimento da técnica de microssatélites (WEBER & MAY, 1989 apud ZUCCHI 2002).

Um bom exemplo da importância do emprego do método de RAPD no entendimento da relação patógeno-hospedeiro é o trabalho de FUNGARO e colaboradores (1996), onde foi analisada a variabilidade genética de *Metarhizium anisopliae* isolados de solo e de cigarrinhas (*Deois Flavopicta*) já mortas. Os resultados mostraram que a diversidade entre isolados obtidos de *D. flavopicta* é muito menor que aquela encontrada entre isolados do solo.

A técnica de RAPD também tem sido utilizada para analisar polimorfismo intraespecífico em fungos (ASSIGBETSE *et al.*, 1994). Essa técnica pode gerar fragmentos de DNA específicos que pode ser utilizado para identificação de isolados e em ecologia molecular (HADRYIS *et al.*, 1992).

Para fungos do gênero *Fusarium*, a análise de RAPD forneceu marcadores para diferentes raças (ASSIGBETSE *et al.*, 1994), (NAMIKI *et al.*, 1998), (JIMÉNES-GASCO *et al.*, 2001).

O ensaio de AFLP combina a especificidade, resolução e poder de amostragem da digestão com enzimas de restrição com a velocidade e praticidade de detecção do polimorfismo via PCR (FERREIRA & GRATTAPAGLIA 1998). Esta técnica foi utilizada para mapeamento genético de *Mycosphaerella graminicola* (KEMA *et al.*, 2002), caracterização de isolados individuais com gênero complexo como *Colletotricum* (O'NEILL *et al.*, 1997), *Septoria tritici* (SCHNIEDER *et al.*, 1998) e *Leptosphaeria maculans* (PONGAM *et al.*, 1999).

BELABID e colaboradores, 2004 utilizaram as técnicas RAPD e AFLP para avaliar a variabilidade genética em isolados de *Fusarium oxysporum*, onde todas as amplificações revelaram polimorfismo entre os isolados, sendo que foram computados 8 fragmentos polimórficos para os oligonucleotídeos de RAPD e 93 para os oligonucleotídeos de AFLP.

1.2.1 MARCADORES BASEADOS EM MICROSSATÉLITES:

DNA satélite foi primeiramente identificado na década de 60. Pesquisadores descobriram que quando eles centrifugavam DNA sob certas condições, esse material se arranjava em duas ou mais camadas: uma banda principal que continha genes e uma banda secundária que veio a ser conhecida como banda satélite. As bandas satélite são constituídas de seqüências repetitivas de DNA muito longas. Em 1985 Alec J. Jeffreys encontrou outras regiões repetitivas menores de DNA, o qual ele denominou de minissatélites, que consiste de repetições de 15 ou mais bases. Jeffreys e colaboradores também determinaram que o número de repetições em um dado minissatélite difere entre indivíduos, uma descoberta que lhes conduziu a invenção da técnica de *DNA-fingerprinting*. Na década de 80 James L. Weber e colaboradores isolaram satélites constituídos de DNA repetitivo ainda menores e denominados então de microsatélites; os quais, também provariam ser úteis para a técnica de *DNA fingerprinting* (MOXON, 1999).

Microsatélites são, portanto, seqüências de até 6 nucleotídeos, repetidas lado a lado e representam regiões instáveis do genoma, que estão sob alterações mutacionais a taxas muito maiores do que as observadas nas seqüências de cópia única. A instabilidade dos microsatélites resulta em marcadores altamente polimórficos, multialélicos, que são extremamente úteis em estudos de Genética. Os alelos diferem porque mostram números distintos de repetições em tandem, oriundos de *crossing-over* desigual durante a meiose ou ao erro da DNA polimerase (*strand-slippage*) durante a duplicação da molécula. Os microsatélites são classificados em três famílias, i. é, de repetições puras, compostas e interrompidas. Nas repetições puras, os locos de microsatélites são formados por um único motivo repetido, nas repetições compostas, mais de um motivo compõem o microsatélite; e nas repetições interrompidas os motivos são intercalados por nucleotídeos que não fazem parte da unidade de repetição (PINTO *et al.* 2001).

Estudos em vários organismos fornecem evidências que o número de seqüências de microssatélites em um genoma, seu tamanho, composição, taxa de mutação e distribuição cromossomal pode variar drasticamente entre os taxa (TEMNYKH *et al.*, 2000).

Em fungos, alguns trabalhos desenvolveram bibliotecas enriquecidas para seqüências microssatélite como, por exemplo, em *Aspergillus fumigatus*, o qual é um fungo oportunista patogênico humano responsável por desordens alérgicas. Neste trabalho quatro clones de DNA contendo longas repetições de CA foram identificados [(CA), (GA)₂₅; (CA)₂C(CA)₂₃; (CA)₈; (CA)₂₁] (LATGÉ, *et al.*, 1998). KRETZER e colaboradores (2000), descreveram o desenvolvimento de marcadores SSR para um basidiomiceto, *Rhizopogon vinicolor*, analisando a diversidade genética em 19 populações, as quais originaram de várias localidades do Estado Americano de Oregon, e de uma população que foi coletada no Estado de Idaho. Neste fungo, a utilização de marcadores microssatélites mostrou ser uma ferramenta eficiente no estudo da estrutura de população em escalas espaciais diferentes, sendo que, nessas populações, foram encontrados seis *loci* microssatélites que apresentaram polimorfismo. O número de alelos observados variou de dois a seis com uma heterozigosidade esperada e observada que variou de 0.05 a 0.76.

Em fungos fitopatogênicos a utilização de marcadores SSR também se mostrou eficiente, como no caso do fungo *Magnaporthe grisea*, (anamorfo *Pyricularia grisea*), o qual é o agente causal da doença brusone do arroz. BRONDANI e colaboradores (2000), selecionaram 24 clones de DNA contendo unidades repetitivas microssatélites com a finalidade de desenvolver novos marcadores moleculares baseados em reação de PCR, para serem utilizados na análise genética deste fungo.

Níveis de variabilidade genética parecem ser bastante diversos entre os fungos. Newton (1987) correlacionou o grau de polimorfismo de uma espécie com a especialização fisiológica do fungo. Parasitos obrigatórios e patógenos altamente especializados, que possuem ambiente e substrato relativamente uniformes, exibem, em geral, baixos níveis de variabilidade genética. Patógenos facultativos e saprófitas, que possuem ampla gama de hospedeiro (polífagos) e são expostos a ambientes e substratos mais diversos, expressam maior variação genética. Todavia, outros estudos não sustentam completamente esse conceito, como é o caso do patógeno *Fusarium oxysporum*, o qual, apresenta uma ampla

gama de hospedeiros, exibiu apenas 24% de polimorfismo (BOSLAND & WILLIAMS, 1987).

Alguns pesquisadores têm relatado que o nível de polimorfismo corresponde ao grau de reprodução sexuada numa espécie ou população. BURDON & MARSHALL (1983) não encontraram variabilidade genética entre coleções de *Puccinia graminis* f. sp. *Triticum* provenientes da Austrália, onde o fungo se reproduz assexuadamente. Coleções do patógeno originárias do Estados Unidos e que sofreram reprodução sexuada até a década de 20, apresentaram 38% de polimorfismo (BURDON & ROELFS, 1985a). Em contrapartida, populações sexuadas de *Uromyces appendiculatus* apresentaram menor diversidade genética que populações assexuadas (GROTH *et al.*, 1995; LU & GROTH, 1987). Esses autores concluíram que mutação e seleção conduziriam a grandes divergências genéticas e em níveis mais altos de polimorfismo em populações assexuadas, desde que não houvesse recombinação. A falta de variabilidade genética pode indicar que um patógeno tenha sido introduzido recentemente numa área e que não tenha havido tempo suficiente para sofrer variação (OLD *et al.*, 1984). Níveis baixos de variabilidade também podem indicar que um patógeno tenha-se desenvolvido a partir de um número limitado de introduções. Indubitavelmente, a diversidade genética pode resultar de vários fatores (LEUNG & WILLIAMS, 1986).

1.3 - VARIABILIDADE GENÉTICA EM ISOLADOS DE *S. sclerotiorum* UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES:

Análises genéticas tem mostrado que isolados de *S. sclerotiorum* na América do Norte são homogêneos com variabilidade limitada nas regiões 18S e 28S do rDNA. O trabalho de KOHN e colaboradores (1991), o qual utilizou um número de diferentes marcadores genéticos; RFLPs, sondas nucleares e mitocondriais, demonstrou que cada amostra de grupo de compatibilidade micelial foi geneticamente uniforme.

Esses dados, juntamente com os de CUBETA e colaboradores (1997) e KOHN (1995) mostraram que populações de *S. sclerotiorum* em culturas de repolho na região leste

do Estado da Carolina do Norte nos Estados Unidos e em canola no Canadá são principalmente clonais.

A variabilidade genética em isolados de *S. sclerotiorum* foi também analisada em 75 isolados de 4 populações coletadas na ilha sul da Nova Zelândia, utilizando a técnica de DNA *fingerprinting*, revelando um alto nível de variação dentro e entre essas populações (CARPENTER, *et al.*, 1999).

Recentemente SUN e colaboradores (2005) analisaram a diversidade e estrutura genética de uma população de isolados de *S. sclerotiorum* provenientes de diferentes regiões e plantas hospedeiras utilizando a técnica de RAPD. A similaridade genética de todos os isolados selecionados foi bastante alta, sendo que a diversidade genética estimada pelo índice de Nei (h) foi de 0.197, o índice de diversidade de Shannon's (I) foi 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 ($P < 0.001$). Os resultados indicam ainda que a variação genética entre populações foi de 22.94% e o fluxo gênico foi de 1.68, o qual indica que a permutação gênica e interação entre populações foram relativamente altas.

SIRJUSINGH & KOHN (2001) utilizaram a técnica de microssatélites para obter marcadores moleculares em isolados de *S. sclerotiorum* provenientes do Canadá, apresentando sucesso na obtenção de *locus* polimórficos dessas regiões. 25 oligonucleotídeos amplificaram produtos não específicos de 23 *loci* contendo microssatélites e 2 *loci* polimórficos de microssatélites, com dois a dez alelos em cada *locus* deste fungo, sendo que dez destes oligonucleotídeos foram utilizados neste presente trabalho.

Na Austrália foi detectada variabilidade genética entre isolados de *S. sclerotiorum*, provenientes de campos de canola utilizando marcadores de microssatélites, neste trabalho foram utilizados também oito conjuntos de marcadores obtidos do trabalho de SIRJUSINGH & KOHN (2001) onde a variabilidade genotípica variou de 36% a 80% e a diversidade alélica de 0.23 a 0.79. A análise de desequilíbrio de ligação em cada uma das quatro populações analisadas sugeriu que está ocorrendo reprodução sexuada e assexuada (SEXTON & HOWLETT, 2004).

Uma alta taxa de variabilidade genética foi também detectada utilizando marcadores microssatélites em isolados de *S. sclerotiorum* provenientes de campos de batata no Estado de Washington, EUA, sendo que a maior parte da variabilidade genética entre os isolados foi dentro de subpopulações e os dados também sugerem a ocorrência de reprodução sexuada e assexuada, teoria reforçada pela descoberta de ascósporos recombinantes em apotécios examinados (ATALLAH *et al.*, 2004).

No Brasil, um reconhecimento inicial de isolados de *S. sclerotiorum* de uma região do estado de São Paulo utilizando marcadores de microssatélite foi conduzido para avaliar sua variação genética e fazer comparações com alguns isolados da região de Minas Gerais. Os 23 isolados de *S. sclerotiorum* analisados neste estudo apresentaram uma variabilidade genética limitada, sendo que, dos três oligonucleotídeos de microssatélites testados, apenas um produziu um padrão de bandas polimórfico em cinco isolados (MEINHARDT *et al.*, 2002).

Também foi realizado no Brasil uma análise da variabilidade genética em isolados de *S. sclerotiorum* provenientes de diferentes áreas geográficas do Distrito Federal por meio da técnica RFLP-PCR e seqüenciamento direto da região correspondente ao ITS1, 5,8S e ITS2 do rDNA nuclear. A análise filogenética dentro e entre populações de *S. sclerotiorum* revelou a existência de variabilidade genética nas populações desta região, não sendo desta forma populações clonais e, de acordo com a análise de seqüências dentro de cada população nos respectivos pivôs, os patógenos se distribuíram randomicamente não apresentando correlação entre similaridade genética e sua localização geográfica (SILVA, 2002).

Portanto, seqüências de DNA repetitivas estão distribuídas através do genoma de patógenos, as diferenças e similaridades entre isolados de fungos podem ser acessadas em regiões satélites e os dados podem ser usados para monitorar doenças epidêmicas, dinâmicas de populações e a composição racial de populações de patógenos (WEISING *et al.*, 1995).

2.0 JUSTIFICATIVA:

Populações de patógenos devem se adaptar constantemente a mudanças em seu ambiente para sobreviver. Em ecossistemas agrícolas ocorrem mudanças ambientais tais como, variedades resistentes, aplicações de fungicidas e fertilizantes, irrigação e rotação de culturas. Portanto, está claro que sistemas agrícolas impõem um forte direcionamento de seleção em populações de patógenos, sendo assim, as estratégias de controle devem focar a uma população e não a um indivíduo, para serem efetivas (McDONALD, 1997).

O mofo branco, causado por *S. sclerotiorum*, é uma significativa causa de perdas na produção de culturas agrícolas nas regiões norte-central dos Estados Unidos (YANG *et al.*, 1999; WRATHER *et al.*, 2001b), central e leste do Canadá, Argentina, Brasil, China, Índia, Itália, Paraguai (WRATHER *et al.*, 2001a), dentre outros países (HAMBLETON *et al.*, 2002).

Populações de *S. sclerotiorum* podem apresentar um padrão genético clonal, bem como uma alta variabilidade genética, como descrita na literatura acima citada, portanto é de suma importância para a economia agrícola brasileira, principalmente para a produção nacional de feijão, no sentido de se traçar estratégias de combate efetivas e seguras, que se estabeleça um perfil genético das populações desse fitopatógeno em nosso país. Portanto, a utilização de marcadores moleculares se torna uma ferramenta imprescindível na obtenção de dados genéticos e moleculares deste fungo.

3.0 OBJETIVOS:

Com base no exposto acima, onde foi demonstrada a importância da determinação da variabilidade genética de fitopatógenos com o uso de marcadores moleculares e, considerando populações de *S. sclerotiorum* em cultura de feijoeiro irrigado no Distrito Federal, o presente trabalho tem como objetivo:

- Determinar a variabilidade genética inter e intrapopulações de *S. sclerotiorum*, utilizando marcadores moleculares baseados em microssatélites.
- Determinar o perfil genético dessas populações.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS:

4.1. Coleta dos Isolados

Foram coletados um total de 79 isolados de *S. sclerotiorum* provenientes de lavouras de feijoeiro cultivadas sob sistema de irrigação via pivô central na região do PAA (Plano de Assentamento Agrícola) no entorno de Brasília – DF, região centro-oeste do Brasil (Tabela 1). Os escleródios de *S. sclerotiorum* foram coletados de acordo com a seguinte metodologia: o pivô foi dividido em quatro quadrantes e a partir do centro do pivô, caminhando em zigue-zague em direção as bordas foram coletados os escleródios presentes em diferentes sítios de infecção de forma aleatória (Figura 01).

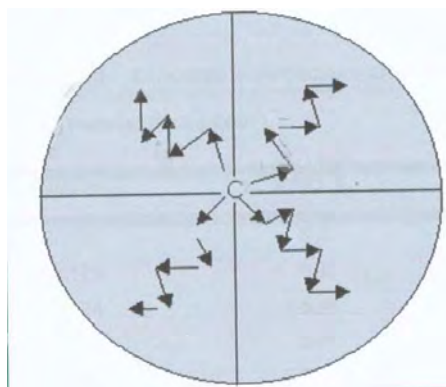


Figura 01 – Metodologia de coleta dos isolados de *S. sclerotiorum* a partir de sistemas de irrigação por pivô central.

Após a classificação taxonômica, os escleródios foram acondicionados em tubos, com a devida identificação, e guardados em geladeira (4°C) até o momento do uso.

A desinfecção dos escleródios foi realizada em câmara de fluxo em tubos de ensaio com: álcool 70% por 1 minuto; hipoclorito 1:1 por 20 segundos e lavados com água Milli-Q estéril, sendo em seguida inoculado em placa de Petri contendo meio BDA (Batata Dextrose Agar). O crescimento do micélio e formação de novos escleródios foi realizado em estufa BOD a 18°C por 10 dias. Quatro discos de micélio foram retirados de cada isolado crescido e guardados em óleo mineral e/ou em água estéril. Os escleródios formados foram guardados em tubos estéreis em geladeira.

Para a extração do DNA genômico, dois discos de micélio foram inoculados em 50 mL de meio líquido MYG contendo ampicilina 50µg/ml e a cultura crescida a 26°C com agitação a 140 rpm por 7 dias. Após o crescimento, o micélio foi filtrado a vácuo, lavado em solução salina 0,9% envolvido em papel alumínio e guardado em nitrogênio líquido para posterior extração do DNA (a descrição dos meios de cultura e soluções utilizadas se encontram disponíveis nos anexos do presente trabalho).

| POP. S₂ | POP. S₃ | POP. A | POP. MISTA |
|---------------------------|---------------------------|---------------|-------------------|
| S₂2 | S₃2 | A1 | M1 |
| S₂3 | S₃3 | A2 | M2 |
| S₂4 | S₃4 | A3 | M3 |
| S₂6 | S₃5 | A4 | M4 |
| S₂8 | S₃6 | A5 | M5 |
| S₂9 | S₃7 | A6 | M6 |
| S₂10 | S₃8 | A7 | M7 |
| S₂11 | S₃9 | A8 | M8 |
| S₂13 | S₃11 | A9 | M9 |
| S₂14 | S₃12 | A10 | M11 |
| S₂15 | S₃13 | A11 | M12 |
| S₂16 | S₃14 | A12 | M13 |
| S₂17 | S₃15 | A13 | M14 |
| S₂18 | S₃16 | A14 | M15 |
| S₂19 | S₃17 | A15 | M16 |
| S₂20 | S₃19 | A16 | M17 |
| S₂21 | S₃20 | A17 | M18 |
| S₂22 | S₃21 | A18 | M19 |
| S₂23 | S₃22 | A19 | SS14 |
| | S₃23 | A20 | SS20 |

Tabela 1. Relação de isolados de *S. sclerotiorum* oriundos de cultura de feijoeiro no PAA/Distrito Federal, Safra 2001, divididos em quatro populações, S₂, S₃, A e M.

4.2. Extração de DNA

Para a extração de DNA genômico foi utilizado o método de CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio). O micélio foi triturado em grau com a ajuda de pistilo, adicionando-se nitrogênio líquido, até a formação de um pó fino, que foi transferido para um tubo de polipropileno contendo tampão CTAB pré-aquecido à 65°C. Os tubos foram incubados por 1 hora com agitação manual a cada 10 minutos. Após este período foi adicionado 1 volume de clorofil, agitados por 10 minutos e centrifugado à 10000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e o DNA precipitado por 3 horas a – 20°C com 0,6 volumes de isopropanol gelado, sendo em seguida centrifugado a 9000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante descartado e o precipitado lavado com álcool 70% gelado, o precipitado foi então seco e ressuspensão com 700µL de TE pH 8,0.

Os DNAs obtidos foram tratados com 1 volume de clorofane, centrifugados a 9000rpm por 10 minutos; a fase aquosa transferida para outro tubo de microcentrífuga sendo adicionado 1 volume de clorofil, homogeneizado por 10 minutos e centrifugado por 10 minutos a 9000 rpm; a fase aquosa foi transferida para outro tubo de microcentrífuga, adicionado acetato de sódio 0,3M e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado e guardados a – 20°C durante a noite; estes foram centrifugados a 11000 rpm por 15 minutos; o sobrenadante foi desprezado e o DNA lavado com álcool 70% gelado; o precipitado seco, ressuspensão em 160µL de TE pH 8,0 e estocado a –20°C.

A quantificação do DNA foi feita por medida em espectrofotômetro, com leituras 260 e 280nm e visualizado em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo 0,5µg/mL (SAMBROOK *et al.*, 1989). A partir do DNA estoque foi diluído uma alíquota para 10ng/µL.

4.3. Amplificações:

Foram utilizados 10 pares de oligonucleotídeos para regiões microsatélites descritos por SIRJUSINGH & KOHN (2001). As reações de amplificação foram feitas utilizando-se um termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.), e apresentaram um volume final de 25µL contendo: 0,3 µM de cada oligonucleotídeo, 1 unidade de Taq DNA polimerase, 200µM de cada dNTP, 1X de tampão da enzima (10mM tris-HCl, pH 8,3; 50 mM MgCl₂) e 10ng de DNA genômico.

As ampliações consistiram de 40 ciclos nas seguintes temperaturas e tempos: desnaturação inicial a 96°C por 2 min., seguida por 40 ciclos de 94°C por 1 min., 50°C por 1 min e 72°C por 1 min., e uma extensão final de 72°C por 7 min.

4.4 Análise de Dados Moleculares:

Os produtos amplificados foram separados em géis de agarose de alta resolução a 1,8%, corado com brometo de etídio 0,5µg/µL e posteriormente analisadas em gel de poliacrilamida de 0,3 mm a 6%. As placas foram preparadas utilizando 2mL de ligante (Etanol 95%, 0.5% Ácido Acético glacial, Bind silane e Água miliQ) para a placa de revelação e 2mL de Repel silane para a placa presa ao suporte de acrílico. Foram feitas pré-corridas de 10', com tampão TBE 1% (Tris borato 90 mM, EDTA 0,5 M pH8) previamente aquecido. As pré-corridas foram realizadas a 100W e temperatura entre 50 e 55°C. As alíquotas foram desnaturadas em termociclador durante 5' a 95°C e logo após, submetidas ao gelo durante 2'.

As corridas foram realizadas a 90W durante 240'. Para a coloração dos géis, utilizou-se o protocolo de coloração com nitrato de prata (CRESTE *et al.*, 2001).

A partir da leitura dos dados foram calculadas as frequências alélicas e genotípicas de cada *locus*. A diversidade genética das populações e as estatísticas, descritiva e de F foram calculadas com base nos programas GDA (LEWIS & ZAYKIN, 2001); ARLEQUIN (SCHNEIDER *et al.*, 2000) e NTSYS (ROHLF, 2002).

5.0 RESULTADOS:

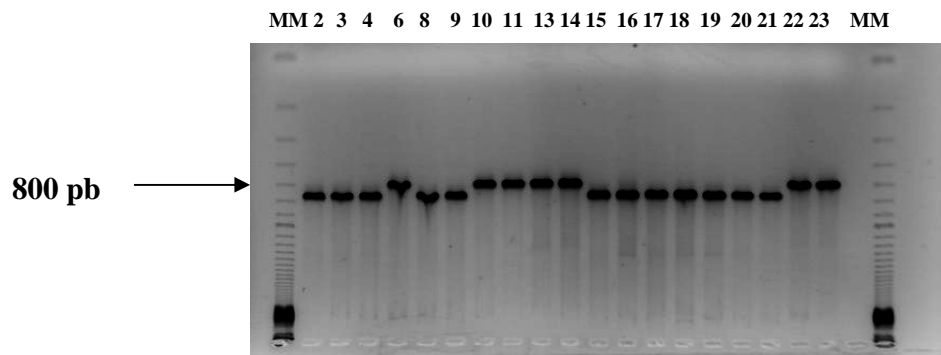
A diversidade genética intra e interpopulações de um total de 79 isolados de *S. sclerotiorum*, provenientes de lavouras de feijoeiro sob sistema de irrigação por pivô central da região do entorno de Brasília – DF, região centro-oeste brasileira, foi analisada utilizando 10 conjuntos de oligonucleotídeos descritos por SIRJUSINGH & KOHN (2001).

Os produtos provenientes das amplificações foram inicialmente separados em gel de agarose de alta resolução a 1,8%, utilizando como referência um marcador de peso molecular de 100 pares de base (pb). Foram observados em média de 3 a 4 alélos por *locus*, como por exemplo no *locus* 106-4, onde foram encontrados 5 alelos, com fragmentos entre as referências de 500 e 600 pares de base, como mostra a figura 02. O tamanho do fragmento está de acordo com o trabalho original destes marcadores (SIRJUSINGH & KOHN, 2001), porém o número de alelos observados foi inferior ao número de alelos esperados que seriam em torno de 10 alelos, sugerindo conseqüentemente, a utilização de gel de poliacrilamida, o qual apresenta uma resolução maior que o gel de agarose.

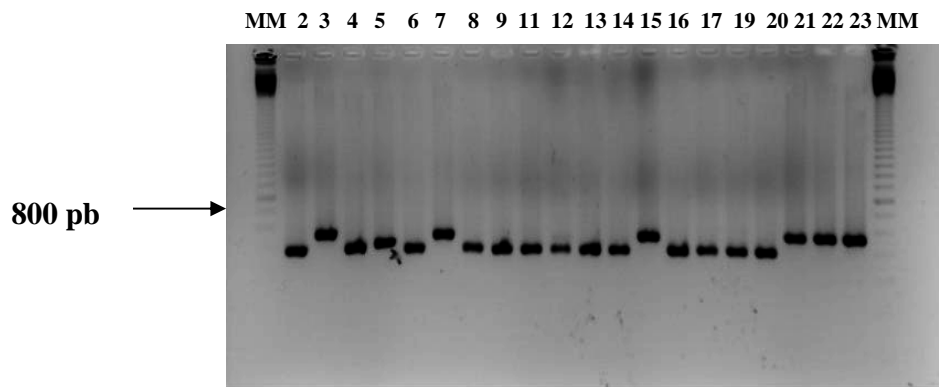
Os produtos de amplificação foram então separados em gel desnaturante de poliacrilamida 6% e os fragmentos corados com nitrato de prata. Os géis foram então genotipados utilizando, como referência, um marcador de peso molecular 50 pares de base. Os resultados indicaram uma média de 10.2 alelos por *locus*, sendo que o número de alelo por *locus* variou de 6 a 18 alelos, como mostrado na tabela 02.

Dentre os géis obtidos, destacam-se os géis dos marcadores 13-2 e 7-2 (figura 03), os quais apresentaram o maior número de alelos, 18 e 14 alélos respectivamente (demais géis ver anexos).

POPULAÇÃO S₂



POPULAÇÃO S₃



POPULAÇÃO A

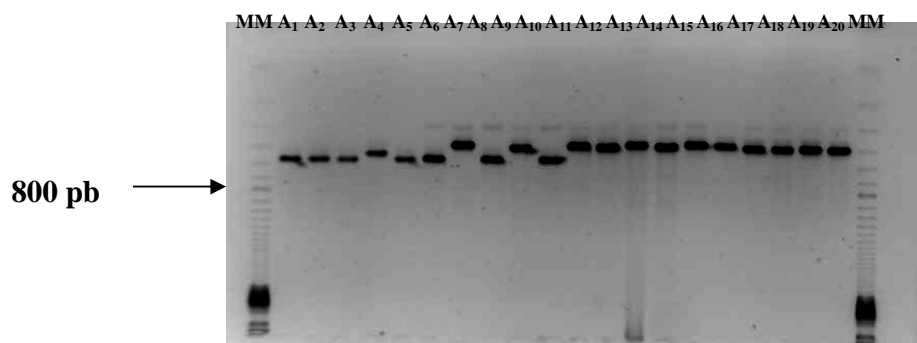


FIGURA 02: Perfil eletroforético de produtos de amplificação de marcadores microsatélites com oligonucleotídeo 106-4 em três populações (S₂, S₃ e A) de *S. sclerotiorum*. Produtos separados em gel de agarose 1,8%, corado com brometo de etídeo e utilizando um marcador de peso molecular de 100pb (MM) como referência.

| OLIGONUCLEOTÍDEO | TEMPERATURA DE ANELAMENTO T_a (°C) | MOTIVO DE REPETIÇÃO | Nº DE ALELOS POR LOCUS |
|------------------|--|--|------------------------------|
| 7-2 | 50 | (GA) ₁₄ | 14 |
| 9-2 | 50 | (CA) ₉ (CT) ₉ | 8 |
| 12-2 | 50 | (CA) ₉ | 9 |
| 13-2 | 50 | (GTGGT) ₆ | 18 |
| 8-3 | 50 | CA ₁₂ | 9 |
| 36-4 | 50 | CA ₆ (CGCA) ₂ CAT ₂ | 9 |
| 92-4 | 50 | (CT) ₁₂ | 8 |
| 114-4 | 50 | (AGAT) ₁₄ (AAGC) ₄ | 12 |
| 42-4 | 50 | GA ₉ | 6 |
| 106-4 | 50 | (CATA) ₂₅ | 9 |

**Loci* microssatélites descritos por (Sirjusingh e Kohn, 2001).

Tabela 02: Descrição de oligonucleotídeos utilizados em população de isolados de *S. sclerotiorum*, suas respectivas temperaturas de anelamento, motivo de repetição e número de alelos observados.

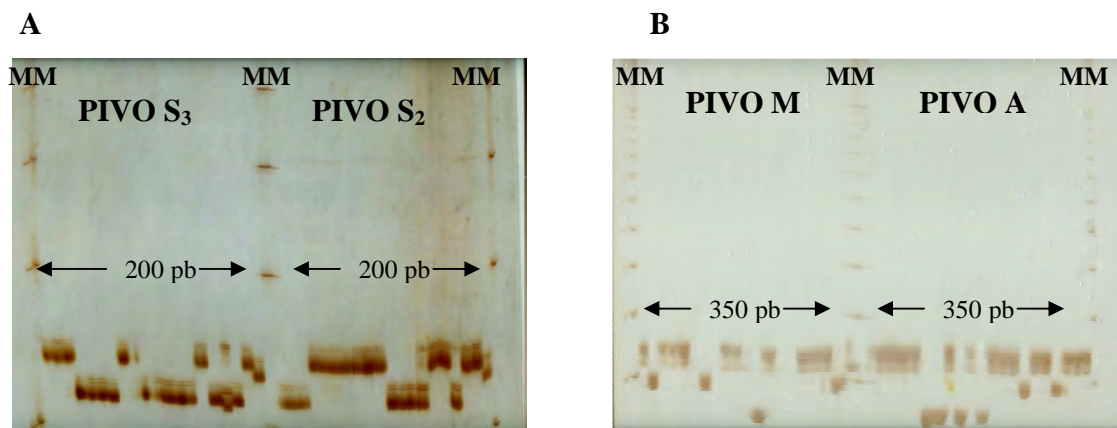


Figura 03: Perfil eletroforético de produtos de amplificação com os oligonucleotídeos A)7-2 e B)13-2 em gel de poliacrilamida 6%, com indivíduos das populações S₂, S₃, A e Mista de *S. sclerotiorum*, provenientes de campos de cultura de feijão irrigados da região do entorno de Brasília – DF, utilizando como referência marcador de peso molecular 50 pb (MM).

Após a genotipagem os resultados foram analisados em programas estatísticos para a estatística descritiva, estatística de F e análise de variância (AMOVA).

O programa GDA (LEWIS & ZAYKIN, 2000), forneceu dados de diversidade alélica por *locus* segundo o índice de Nei (1973). Os dados obtidos indicaram uma alta variabilidade entre os *loci*, 0.83 de média, variando de 0.65 no *locus* 42-4, a 0.91 no *locus* 7-2 (Gráfico 01).

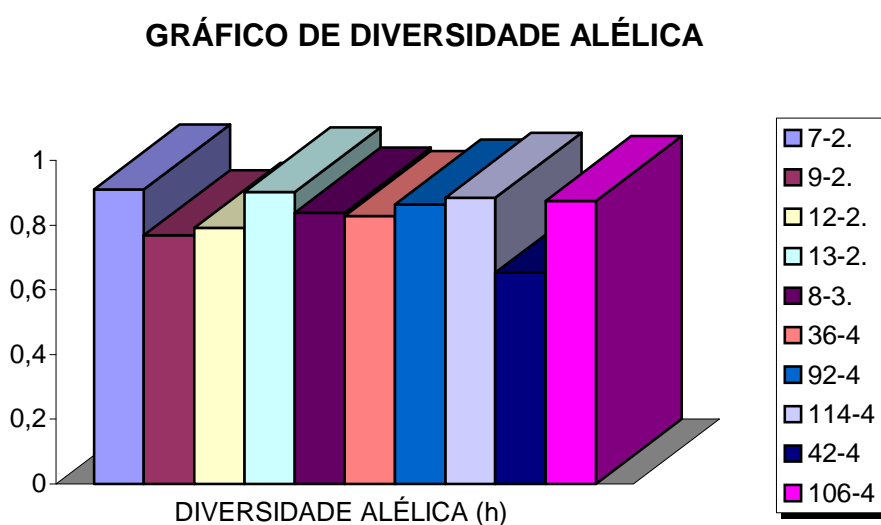


Gráfico 01: Representação gráfica da diversidade alélica segundo o índice de Nei (1973), em 79 isolados de *S. sclerotiorum* provenientes de campos de feijão sob sistema de irrigação, utilizando 10 conjuntos de oligonucleotídeos descritos por SIRJUSINGH & KOHN, (2001).

Foram calculadas as estatísticas de F e a análise de variância (AMOVA) através do programa Arlequin (SCHNEIDER, 2000). O índice de fixação (F_{ST}) (WEIR & COCKERHAM, 1984), que indica a distribuição da variabilidade genética entre as populações, baseado na probabilidade de identidade de alelos indicou uma alta taxa de diversidade entre as populações analisadas ($F_{ST} = 0,28793$).

A análise de variância (AMOVA), que é análoga à estatística de F, indicou a variabilidade dentro e entre as populações (Tabela 03). Os resultados obtidos indicam uma maior variabilidade dentro das populações (71.21%), que entre populações (28.79%).

| FONTE DE VARIAÇÃO | SOMA DOS QUADRADOS | PERCENTAGEM DE VARIAÇÃO |
|--------------------------------|--------------------|-------------------------|
| ENTRE POPULAÇÕES | 6.613 | 28.79 |
| DENTRO DE POPULAÇÕES | 18.400 | 71.21 |
| INDICE DE FIXAÇÃO (F_{ST}) | | 0.28793 |

Tabela 03: Teste de Variância (AMOVA), indicando a soma dos quadrados, variabilidade entre e dentro das populações de *S. sclerotiorum* (S_2 , S_3 , A e M) e o índice de fixação (F_{st}), que representa a distribuição da variabilidade genética entre as populações .

Através do programa GDA (LEWIS & ZAYKIN, 2001), foi calculada a diversidade genética entre as populações. Esta análise indicou uma variabilidade genética entre as populações que variou de 0.64 na população 4 (Pop. Mista) a 0.71 na população 1 (Pop. S_2), como mostra o gráfico 02.

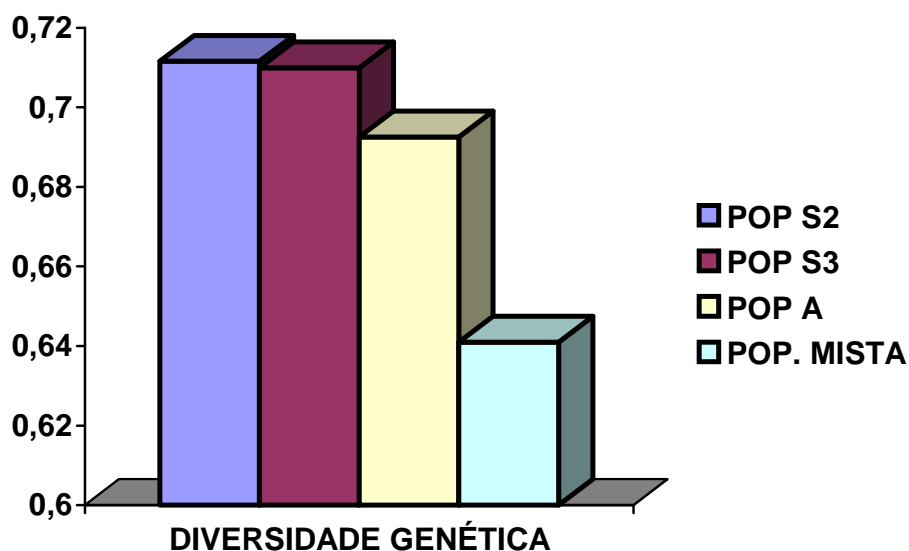


Gráfico 02: Representação gráfica indicando alta diversidade genética entre as populações S_2 , S_3 , A e Mista, de *S. sclerotiorum* na região do entorno de Brasília - DF.

Foi calculada também, a frequência de alelos privados, ou seja, aqueles alelos que são exclusivos de uma determinada população. A frequência desses alelos pode ser determinante na caracterização de uma população. A tabela 04 indica o alelo privado, a população onde foi encontrado, bem como sua frequência e seu respectivo *locus*. A partir desta tabela foi construído um gráfico indicando o número de alelos privados por população, sendo que as populações 1, 2 e 4 apresentaram 8 alelos privados cada e a população 3 apresentou 5 alelos privados (Gráfico 3).

| LÓCUS | ALELO | FREQUÊNCIA | POPULAÇÃO |
|--------------|--------------|-------------------|------------------|
| 7-2 | 13 | 0.090909 | 4 |
| 7-2 | 11 | 0.363636 | 4 |
| 7-2 | 14 | 0.400000 | 3 |
| 7-2 | 12 | 0.250000 | 3 |
| 7-2 | 04 | 0.263158 | 2 |
| 7-2 | 03 | 0.210526 | 2 |
| 7-2 | 01 | 0.052632 | 2 |
| 7-2 | 07 | 0.052632 | 1 |
| 9-2 | 07 | 0.200000 | 4 |
| 9-2 | 08 | 0.066667 | 4 |
| 9-2 | 06 | 0.050000 | 3 |
| 9-2 | 05 | 0.150000 | 3 |
| 12-2 | 09 | 0.210526 | 2 |
| 12-2 | 08 | 0.052632 | 2 |
| 12-2 | 07 | 0.052632 | 2 |
| 13-2 | 18 | 0.285714 | 4 |
| 13-2 | 05 | 0.071429 | 4 |
| 13-2 | 03 | 0.050000 | 3 |
| 13-2 | 14 | 0.055556 | 2 |
| 13-2 | 09 | 0.111111 | 1 |
| 13-2 | 07 | 0.055556 | 1 |
| 13-2 | 06 | 0.055556 | 1 |

| | | | |
|------|----|----------|---|
| 13-2 | 08 | 0.111111 | 1 |
| 13-2 | 10 | 0.055556 | 1 |
| 13-2 | 11 | 0.222222 | 1 |
| 8-3 | 08 | 0.111111 | 2 |
| 8-3 | 09 | 0.100000 | 1 |
| 36-4 | 09 | 0.187500 | 4 |
| 36-4 | 08 | 0.187500 | 4 |

Tabela 04: Identificação dos *loci* que apresentaram alelos exclusivos entre as populações de *S. sclerotiorum* analisadas, indicando suas respectivas frequências dentro de cada população.

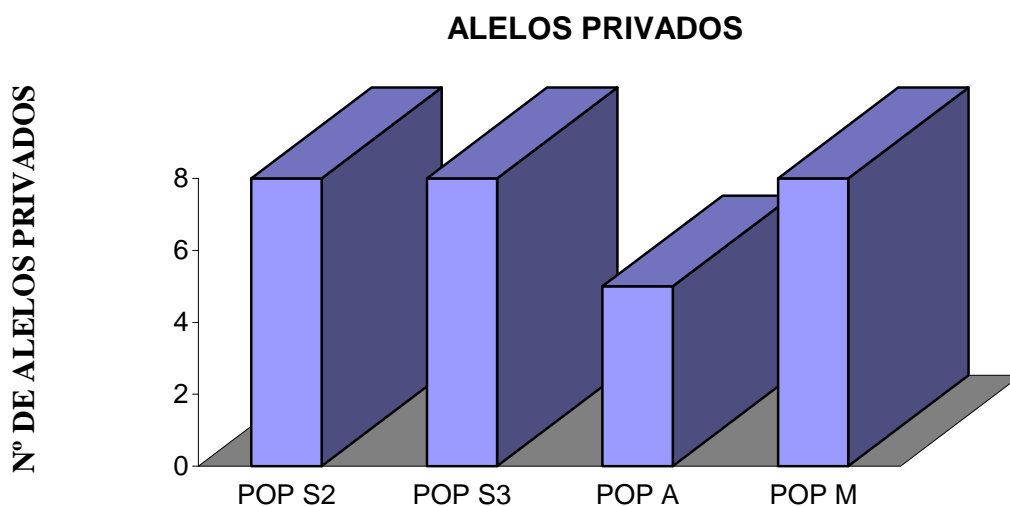


Gráfico 03: Representação gráfica indicando o número de alelos privados presentes em cada população analisada de *S. sclerotiorum*.

A partir da matriz de distancia entre as populações foi produzido um fenograma segundo o método UPGMA através do programa NTSYS (ROHLF, 2002), indicando a distancia genética entre as populações segundo o coeficiente de similaridade de Jaccard, separando as populações em três grupos principais.

As populações S₂ e A foram plotadas em um mesmo grupo apresentando uma distancia genética de 0.38, a população S₃ está relacionada com as populações S₂ e A, porém em um grupo distinto, apresentando uma distancia genética de aproximadamente

0.44 em relação as populações S_2 e A e finalmente a população MISTA que apresentou um coeficiente de similaridade de aproximadamente 0.46 em relação aos outros grupos, indicando, portanto ser a população geneticamente mais distante (Figura: 04).

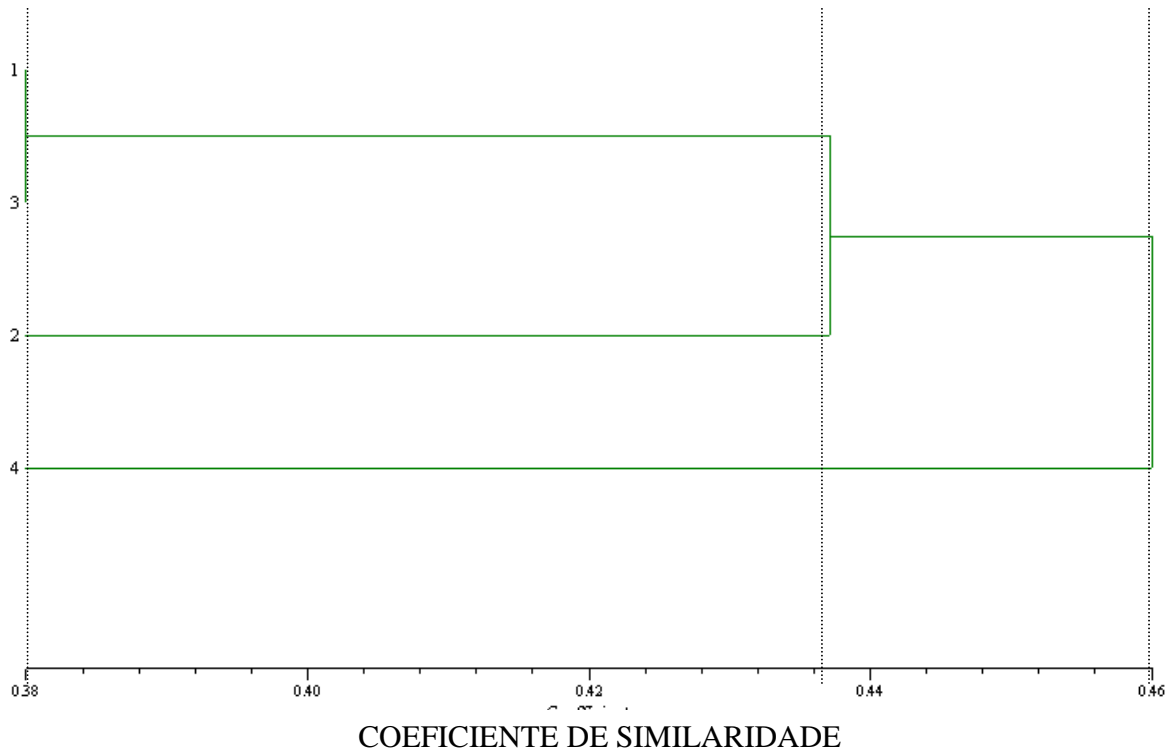


Figura 04: Fenograma segundo método UPGMA, indicando a distancia genética utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard (SNEATH & SOKAL – 1973) entre populações de *S. sclerotiorum*. A escala representa o coeficiente de similaridade e os números 1, 2, 3 e 4, representam as populações S_2 , S_3 , A e Mista, respectivamente.

5.0 DISCUSSÃO

Infecção de plantas hospedeiras suscetíveis a *S. sclerotiorum* pode ocorrer a partir do micélio que origina-se da germinação eruptiva do escleródio no solo, reprodução assexuada, ou pelo desenvolvimento do apotécio a partir do escleródio liberando ascósporos os quais são disseminados, reprodução sexuada (PURDY, 1979).

Nesse presente trabalho, foram coletados 79 isolados de *S. sclerotiorum* sob sistemas de irrigação por pivô central, provenientes da região do entorno de Brasília – DF. Esses isolados foram divididos em 4 populações (S₂, S₃, A e M) e analisados utilizando marcadores moleculares baseados em microssatélites.

Os indivíduos das populações S₂, S₃ e A, foram coletados a partir de uma única área de irrigação para cada população, e os isolados da população “M” foram reunidos a partir de isolados coletados de várias áreas de diferentes localidades, sendo que as áreas de irrigação apresentavam em média de 50 a 100 Km de distância entre elas. O material genético foi extraído e a variabilidade genética dentro e entre essas populações analisadas utilizando-se dez conjuntos de oligonucleotídeos descritos por SIRJUSINGH e KOHN (2001).

Em 2001, SIRJUSINGH e KOHN desenvolveram 25 conjuntos de oligonucleotídeos específicos para gênero *Sclerotinia*, utilizando isolados de três espécies, *S. sclerotiorum*, *S. trifoliorum* e *S. minor*. A partir desses oligonucleotídeos, foram obtidos 23 *loci* de microssatélites além de 2 *loci* polimórficos para *S. sclerotiorum* a partir de isolados clonais. O produto de amplificação gerado a partir desses marcadores apresentaram fragmentos de 160 pb a 571 pb observando-se de 2 a 10 alélos por *locus*.

A escolha dos oligonucleotídeos seguiu o critério de tamanho do fragmento gerado, número de alélos observados e motivo de repetição. Além disso, esses oligonucleotídeos foram utilizados como parâmetro para comparações com outros trabalhos, os quais utilizaram alguns desses marcadores com isolados provenientes de diferentes localidades do mundo, culturas e climas (SEXTON & HOWLETT, 2004; ATALLAH *et al.*, 2004).

Estudos prévios com isolados de *S. sclerotiorum* de campos de canola e repolho provenientes do Canadá e Carolina do Norte, nos Estados Unidos (CUBETA *et al.*, 1997), indicaram forte padrão clonal, mesmo em populações distantes até 2000 Km, tendo em

vista que, em trabalhos como KOHN (1995), clone foi definido como um genótipo mantido a partir de uma única linhagem mitótica.

Porém, deve-se salientar alguns aspectos bastante relevantes em relação ao cultivo e manejo desses campos analisados, como o fato da baixa rotação de cultura, onde canola tem sido cultivada por extensas áreas naquela região por mais de vinte anos, facilitando assim a propagação desses isolados; a ausência de produção comercial de sementes desses produtos, diminuindo assim a possibilidade de entrada de novos genótipos nesses campos e o clima, com estações bem definidas e temperaturas relativamente frias.

No presente trabalho, foi utilizado inicialmente gel de agarose a 1,8% para a separação dos produtos de PCR, obtendo um número reduzido de alelos, de 3 a 4, em relação ao observado em trabalhos que utilizaram estes marcadores (SIRJUSINGH & KOHN, 2001; SEXTON & HOWLETT, 2004; ATALLAH, *et al.*, 2004).

Foi então utilizada eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 6%, corado com solução de nitrato de prata. Foram observadas pequenas diferenças nos padrões de bandas, o que indicam que os fragmentos se diferenciam, em alguns casos, em apenas poucos pares de base.

A média observada aumentou para aproximadamente 10.2 alelos por *locus*, em relação ao gel de agarose, sendo possível a obtenção de um total de 102 alelos diferentes em todos os 79 indivíduos da população geral.

Dos 10 conjuntos de oligonucleotídeos utilizados, oito foram previamente analisados em isolados de *S. sclerotiorum* provenientes de quatro regiões da Austrália, apresentando um total de 82 alelos diferentes nesta população (SEXTON & HOWLETT, 2004).

Comparando o número de alelos observados neste trabalho com de isolados dos Estados Unidos e Canadá, constatou-se um número maior em todos os *loci* utilizados, menos em relação ao *locus* 106-4 onde SIRJUSINGH & KOHN descreveram 10 alelos enquanto foram obtidos 9 no presente trabalho.

Alguns *loci* se destacaram pelo grande número de alelos observados e alto grau de diversidade alélica, que é o caso do *locus* 7-2 com 14 alelos e diversidade de 0.91 e o alelo 13-2 com 18 alelos e diversidade de 0.90.

A diversidade alélica dentro de cada *locus* variou entre 0.65 – 0.91, esses resultados indicam maior diversidade que os isolados da Austrália e do Estado de Washington nos Estados Unidos (SEXTON & HOWLETT, 2004; ATALLAH *et al.*, 2004), além de que o *locus* 36-4, o qual foi monomórfico em ambos trabalhos, apresentou nove diferentes alelos e uma variabilidade gênica de 0.82.

Diversidade alélica em *locus* de microssatélites também é observada em outros fungos fitopatogênicos, como por exemplo, em *Alternaria brassicicola*, que apresenta ciclo de vida semelhante ao de *S. sclerotiorum*. AVENOT e colaboradores (2005), desenvolveram 12 marcadores de microssatélites que foram utilizados em 46 isolados provenientes de 7 diferentes países. O produto de amplificação desses isolados apresentaram de 2 a 10 alelos diferentes e polimorfismo entre 0.043 e 0.84.

A diversidade genética dentro das populações da região do entorno de Brasília – DF, indicou alta variabilidade, sendo que o maior índice observado foi de 0,71 para a população S2, e o menor índice foi de 0.64 para a população “M”.

A análise de variância (AMOVA), indicou uma variabilidade genética de 71,2% dentro das populações, resultado menor que o encontrado em isolados da Austrália, que foi de 79,4% (SEXTON & HOWLETT, 2004).

O alto grau de polimorfismo desse conjunto de microssatélites podem ajudar na taxonomia de cepas com diferentes níveis de virulência, resistência a determinados fungicidas e outras características de interesse agrônômico. Em isolados de *Aspergillus niger*, ESTEBAN e colaboradores (2005) desenvolveram 6 conjuntos de marcadores de microssatélites que também apresentaram um alto grau de polimorfismo que podem ajudar a determinar relações entre isolados toxigênicos e não toxigênicos.

SUN e colaboradores (2005), analisaram a variabilidade genética de isolados de *S. sclerotiorum* de diferentes regiões e culturas da China, utilizando marcadores dominantes do tipo RAPD detectando em torno de 50% de variabilidade tanto entre como dentro de populações. As populações de uma mesma região foram reunidas em um mesmo grupo ou em grupos geneticamente próximos e os resultados não apontaram relação entre isolados de mesma cultura.

O índice de fixação (F_{ST}) (WEIR & COCKERHAM, 1984), indica a distribuição da variabilidade genética entre as populações, baseado na probabilidade de identidade de

alelos. Segundo YEH (2000), uma estimativa de F_{ST} menor que 0,050 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}) = 0,28793, ou seja, o índice calculado está acima do padrão estabelecido como um alto nível de diversidade genética, indicando que há uma alta variabilidade genética entre as populações analisadas.

CARPENTER e colaboradores (1999), também detectaram variabilidade genética relativamente alta, tanto dentro como entre populações, utilizando sondas de “*DNA fingerprinting*” em 75 isolados da Nova Zelândia. A dispersão de isolados clonais nesta população se limitou a áreas de uma mesma fazenda e não entre fazendas, o que pode ser explicado pela dispersão através de implementos agrícolas.

Apesar da alta variabilidade genética encontrada nos isolados do Distrito Federal, foi detectado um alto índice de alelos privados, sendo 8 nas populações S₂, S₃ e M, e 5 na população A. Portanto, foram obtidos 29 alelos privados em um total de 102, o que equivale a 28,43% dos alelos obtidos. Estes alelos podem estar contribuindo com a caracterização dessas populações, sendo que a presença desse alto índice de alelos exclusivos pode indicar que os isolados presentes nessas populações sejam provenientes de inserção de diferentes genótipos em diferentes momentos nas áreas de cultivo através de sementes contaminadas, implementos agrícolas, animais ou até mesmo pelo homem.

Essa hipótese pode ser embasada pelo trabalho de SILVA (2002), o qual detectou variabilidade na análise da região ITS1, ITS2 e gene 5,8S do rDNA nesses mesmos isolados, indicando que as alterações encontradas podem ser em decorrência da inserção diferentes genótipos e não somente de um alto índice de reprodução sexuada.

Os dados de distância genética indicam que, as quatro populações analisadas estão distribuídas em três diferentes grupos, segundo o coeficiente de similaridade de Jaccard, onde, as populações S₂ e A são as populações geneticamente mais próximas, sendo plotadas em um mesmo grupo, já a população S₃ apresenta uma distancia genética de 0.44 em relação as populações S₂ e A, sendo plotada em um grupo distinto e, finalmente a população MISTA a qual é uma população com isolados proveniente de vários pivôs da região do entorno de Brasília – DF se mostrou a mais distante e com a menor diversidade gênica.

A alta variabilidade genética encontrada em isolados de *S. sclerotiorum* tanto em isolados da Austrália como em isolados dos Estados Unidos e China, sugerem que possa estar havendo ambos tipos de reprodução, assexuada e sexuada, teoria também embasada pelo fato de ter sido encontrado ascósporos recombinantes em isolados dos Estados Unidos (ATALLAH *et al.*, 2004).

Esse tipo de ocorrência também é relatado em outros fungos com ciclo de vida semelhantes, como é o caso de *Alternaria brassicicola*, que apresentou moderado, porém, considerável grau de polimorfismo levando BOCK e colaboradores (2005), a hipotetizar um estágio sexual ainda não caracterizado, fato que pode também estar ocorrendo em populações de *S. sclerotiorum* brasileiras, porém não como fator único de diversidade, e sim como um aditivo neste processo.

6.0 CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitiram concluir que:

1. Os isolados de *S. sclerotiorum* provenientes da região do entorno de Brasília – DF apresentaram alto índice de variabilidade intra e interpopulações com base em análises de dados moleculares de dez *loci* de microssatélites.
2. As populações brasileiras de *S. sclerotiorum* não apresentam perfil genético clonal, indicando uma elevada taxa de reprodução sexuada.
3. Os oligonucleotídeos utilizados geraram um alto índice de variabilidade, indicando que esses marcadores são eficazes na análise de variabilidade genética em isolados de *S. sclerotiorum*.

7.0 PESPECTIVAS

O estudo de populações de *S. sclerotiorum* neste trabalho poderia ser complementado através de:

1. Teste de grupos de compatibilidade micelial para estabelecer outros parâmetros de relação entre as populações.
2. Ampliação do número de isolados com amostras de demais localidades do país para traçar um perfil dos isolados brasileiros, conseqüentemente estabelecendo a estrutura de população.
3. Comparar esses resultados com isolados provenientes de outras culturas para determinar se o grau de variabilidade é o mesmo em outros hospedeiros.
4. Teste de virulência para determinar se essa alta variabilidade apresenta correlação com o grau de agressividade desses isolados.

8.0 Referências Bibliográficas

- ABAWI, G. S. & GROGAN R. G. Source of primary inoculum and effects of temperature and moisture on infection of beans by *Whetzelinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, v. 65, p. 300 – 309. 1975.
- ADAMS, P. B. & AYERS, W. A. Ecology of *Sclerotinia* Species. **Phytopathology**, v. 69, n° 08, p. 896 – 899. 1979.
- ASSIGBETSE K. B., FERNANDEZ D, DUBOOIS M. P., GEIGER J. P. Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. Sp. *vasinfectum* Races on Cotton by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis. **Phytopathology**, v. 84, p. 622 – 626, 1994.
- 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 – 742. 2004.
- AVENOT, H.; DONGO, A.; SIMONEAU, N. B.; VASILESCU, B. I. HAMON, B.; PELTIERS, D.; SIMONEAU, P. Isolation of 12 polymorphic microsatellite loci in the phytopathogenic fungus *Alternaria brassicicola*. **Molecular Ecology Notes**. 2005.
- BAKER, B., ZAMBRYSKI, P., STASKAWITZ, B. & DINESH-KUMAR, S.P. Signalling in plant-microbe interactions. **Science**, v. 276, p. 726-733. 1997.
- BELABID L., BAUM M., FORTAS Z., BOUZNAD Z., EUJAYL I. Pathogenic and Genetic Characterization of Algerian Isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* by RAPD and AFLP Analysis. **African Journal of Biotechnology**, v. 3(1), p. 25 – 31. 2004.

- BOCK, C. H.; THRALL, P. H. BURDON, J. J. Genetic structure of populations of *Alternaria brassicicola* suggests the occurrence of sexual recombination. **Mycological Research**, v. 109, p. 227 – 236. 2005.
- BOSLAND, P.W. & WILLIAMS, P. H. An evaluation of *Fusarium oxysporum* from crucifers based on pathogenicity, isozyme polymorphism, vegetative compatibility, and geographic origin. **Canadian Journal Botanical**, v. 65, p. 2067 – 2073, 1987.
- BRONDANI, C.; BRONDANI, R. P. V.; GARRIDO, L. R.; FERREIRA, M. E. Development of microsatellite markers for the genetic analysis of *Magnaporthe grisea*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, 4, p. 753 – 762. 2000.
- BURDON, J. J. & MARSHALL, D. R. The use of isozymes in plant disease research. In: TANKSLEY, S. D. & ORTON, T. J. Isozymes in plant genetics and breeding. Parte A. Amsterdam, **Elsevier Science**, p. 404 – 412. 1983.
- BURDON, J. J. & ROELFS, A. P. The effect of sexual and asexual reproduction on the isozyme structure of populations of *Puccinia graminis*. **Phytopathology**, v. 75, p. 1068 – 1073, 1985a.
- CARDOSO, J. E.; RAVA, C. A. & SARTORATO, A. Doenças causadas por fungos de solo. In ARAÚJO, R. S.; RAVA, C. A.; STONE, L. F. & VIMMERMAMM, M. J. O. **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. 1996.
- 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 – 21. 1999
- CHAVES, G. M. Estudos sobre *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Experimentae**. Viçosa, v. 4, p. 69-133, 1964.

- COSTA, J. L. da S. Situação do mofo branco no feijão de inverno. In: **REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO**, 5., 1996, Goiânia, GO. **Anais**. Goiânia: EMBRAPA-CNPAP, v. 2, p. 251-253. (EMBRAPA-CNPAP. Documentos, 70) 1997.
- CRESTE S.; NETO A. T.; FIGUEIRA A. Detection of Single Sequence Repeat Polymorphisms in Denaturing Polyacrylamide Sequencing Gels by Silver Staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p. 299 – 306. 2001.
- 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 – 1004. 1997.
- ESTEBAN, A.; LEONG, S. L.; DINH, N. T. Isolation and characterization of six polymorphic microsatellite loci in *Aspergillus niger*. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, p. 375 – 377. 2005.
- FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3º ed. Embrapa – Cenagem. 220p. 1998.
- FUNGARO, M. H. P.; PIZZIRAZNI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Diversity Among Soil and Insect Isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* Detected by RAPD. **Letters in Applied Microbiology**, v. 22, p. 389 – 392. 1996.
- GALLI. F.; CARVALHO, P. C. T.; TOKESHI, H.; BALMER, E.; KIMATI, H.; CARDOSO, C. O. N.; SALGADO, C. L.; KRÜGNER, T. L.; CARDOSO, E. J. B. B.; FILHO, A. B. **Manual de fitopatologia**, v. II – Doenças das plantas cultivadas. Ed. Agronômica Ceres LTDA. São Paulo. 1980.
- GROTH, J. V.; CAIN, J. W.; ROELFS, A. P. Virulence and isozyme diversity of sexual versus asexual collections of *Uromyces appendiculatus* (bean rust fungus). **Heredity**, v. 75, p. 234 – 242, 1995.

- HADRY S H., BALICK M., SCHIERWATER B. Application of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in Molecular Ecology. **Molecular Ecology**, v. 1, p. 55-63. 1992.
- 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. **Canadian Journal Plant Pathology**, v. 24, p. 309 – 315. 2002.
- JIMÉNEZ-GASCO M., PÉREZ-ARTÉS W., JIMÉNEZ-DIASZ R. M. Identification of Pathogenic Races 0, 1B/C, 5, and 6 of *Fusarium oxysporum* f. Sp. ciceris with Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), **Eur J. Plant Pathol.** 107 (2), p.: 237 – 248. 2001.
- JONES, D. & WATSON D. Parasitism and lysis by soil fungi of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, a phytopathogenic fungus. **Nature**, v. 224, p. 287 – 288. 1969.
- KEMA G. H. J., GOODWIN S. B., HAMZA S., VERSTAPPEN E. C. P., CAVALETTO J. R., VAN DER LEE T. A. J., DE WEERDT M., BONANTS P. J. M., WAALWIJK C. A Combined Amplified Fragment Length Polymorphism and Randomly Amplified Polymorphism DNA Genetic Linkage Map of *Mycosphaerella graminicola*, in *Septoria tritici* Leaf Blotch Pathogen of Wheat. **Genetics**, v. 161: 1497 – 1505. 2002.
- 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.
- KOHN, L. M. The clonal dynamic in wild and agricultural plant-pathogen populations. **Canadian Journal Botanical**, v. 73 (Suppl. 1), p. S1231 – S1240. 1995.

- KRETZER, A. M.; MOLINA R.; SPATAFORA, J. W. Microsatellite markers for the ectomycorrhizal basidiomycete *Rhizopogon vinicolor*. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1171 – 1193. 2000.
- LATGÉ, J. P.; DEBEAUPUIS, J. P.; SARFATI, J. & PARIS, S. Variability in the human opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. In: BRIDGE, P. D.; COUTEAUDIER, Y.; CLARKSON, J. M. **Molecular Variability of Fungal Pathogens**. Cab International. p. 121 – 131. 1998.
- LEUNG, H. & WILLIAMS, P. H. Enzyme polymorphism and genetic differentiation among geographic isolates of the rice blast fungus. **Phytopathology**, v. 76, p. 778 – 783, 1986.
- LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. 2001. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). Free program distributed by the authors over the internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>
- LOBO Jr., M. Alien plant pathogens in Brazil. In PIMENTEL, D. **BIOLOGICAL INVASIONS** Economic and Environmental Costs of Alien Plant, Animal, and Microbe Species. CRC PRESS. Cap. v. 5, p. 69 – 88. 2002.
- LU, T. H. & GROTH, J. V. Izozyme detection and variation in *Uromyces appendiculatus*. **Canadian Journal Botanical**, v. 66, p. 885 – 890. 1987.
- LUMSDEN, R. D. Histology and physiology of patogenesis in plant diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, v. 69, n° 08, p. 890 – 895. 1979.
- McDONALD, B. A. The Population Genetics of Fungi: Tools and Techniques. Population Genetics of Soilborne Fungal Plant Pathogens - Symposium. **Phytopathology**, v. 87, N°. 4, p. 448 – 452. 1997.

- MEINHARDT, L. W.; WULFF, N. A.; BELLATO, C. M. & TSAI, S. M. Telomere and microsatellite primers reveal diversity among *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 2. 2002.
- MOXON, E. R. & WILLS, C. DNA microsatellites: Agents of Evolution? **Scientific American**, p. 72 – 77. 1999.
- MULLIS, K.; FALLONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymology**, v. 55, p. 335 – 350. 1987.
- NAMIKI F., SHIOMI T., NISHI K., KAYAMURA T., TSUGE T. Pathogenic and Genetic Variation in the Japanese Strains of *Fusarium oxysporum* f. Sp. *melonis*. **Phytopathology**, v. 88, p. 804 – 810. 1998.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 70, p. 3321–3323. 1973.
- NELSON, B. Biology of *Sclerotinia*. **Plant Pathology - Sclerotinia**. <http://www.ndsu.nodak.edu/plantpath/sclero.htm>. p. 1 - 3. 1998.
- NEWTON, A. C. Markers in pathogen populations. In: DAY, P. R. & JELLIS, G. J. **Genetics and plant pathogenesis**. Oxford, Blackwell Scientific. p. 187 – 194. 1987.
- O'NEILL N. R., BERKUM van P., LIN J. J., UDE G. N., KENWORTHY W., SAUNDER J. A. Application of Restriction Fragment Length Polymorphism for Genetic Characterization of *Colletotrichum* Patogens of Alfafa. **Phytopathology**, v. 87. p. 745 – 750. 1997.
- OLD, K. M.; MORGAN, G. F.; BELL, J. C. Isozyme variability among isolates of *Phytophthora cinnamomi* from Australia and Papua New Guinea. **Canadian Journal Botanical**, v. 62, p. 2016 – 2022. 1984.

- PINTO, L. R.; VIEIRA M. L. C.; SOUZA, A. P.; JUNIOR, C. L. S. Isoenzimas e microssatélites em plantas. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**. nº 20 – maio/junho, p. 16 – 19. 2001.
- PONGAM P., OSBORN T. C., Williams P. H. Assessment of Genetic Variation Among *Leptosphaeria maculans* Isolates Using Pathogenicity Data and AFLP Analysis. **Plant Disease**, v. 83, p. 149 – 154. 1999.
- PURDY, L. H. *Sclerotinia sclerotiorum*: History, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution and impact. **Phytopathology**, v. 69, nº 08, p. 875 – 880. 1979.
- ROHLF, F. J. 2002. NTSYSpc: Numerical Taxonomy System, ver. 2.1. Exeter Publishing, Ltd.: Setauket, NY.
- SAMBROOK, K.; FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Segunda Ed. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, NY. 1989.
- SCHNEIDER S.; ROESSLI D.; EXCOFFIER L. Arlequin ver. 2000: A software for population genetic data analysis. **Genetics and Biometry Laboratory**, University of Geneva, Switzerland.
- SCHNIEDER F., KOCH G., JUNG C., VERREET J. A. The Application of Molecular Markers for Genetic Characterization of *Septoria tritici* Population. **Journal of Plant Disease And Protocols**, v. 105 (5), p. 452 – 461. 1998.
- 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.

- SILVA, S. S. Caracterização molecular de *Sclerotinia sclerotiorum* (Libert) de Bary isolados de cultura de feijoeiro irrigado. **Tese de mestrado** – Universidade Federal de Goiás – UFG, Instituto de Ciências Biológicas – ICB, Goiânia – 2002.
- SIRJUSINGH, C. & KOHN, L. M. Characterization of microsatellites in the fungal plant pathogen, *Sclerotinia sclerotiorum*. **Molecular Ecology Notes**, v. 1(4), p. 267 – 269. 2001.
- SNEATH P. H. A., SOKAL R. R. Numerical Taxonomy. **Freeman**. San Francisco, p. 573. 1973.
- STEADMAN, J. R. Control of plant diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, v. 69, nº 08, p. 904 – 907. 1979.
- SUN, JUN-MING; IRZYKOWSKI W.L JEDRYCZKA M., HAN F. Analysis of the Genetic Structure of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary Populations from Different Regions and Plants by Random Amplified Polymorphic DNA Markers. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 47 (4), p. 385 – 395. 2005.
- TEMNYKH, S.; PARK, W. D.; AYRES, N.; CARTINHO, S.; HAUCK, N.; LIPOVICH, L.; CHO, Y. G.; ISHII, T. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). **Theor. Appl. Genet.** v. 100, p. 697 – 712. 2000.
- TOURNEAU, D.; Morphology, cytology, and physiology of *Sclerotinia* Species in culture. **Phytopathology**, v. 69, nº 08, p. 887 – 890. 1979.
- VENETTE J. *Sclerotinia* spore formation, transport, and infection. **Plant Pathology - Sclerotinia**. <http://www.ndsu.nodak.edu/plantpath/sclero.htm>. p. 3 - 5. 1998.

- WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population-structure. **Evolution**, v. 38 (6), p. 1358-1370. 1984.
- WEISING, K.; NYBOM, H; WOLFF, K; MEYER, W. **DNA fingerprint in plants and fungi**. CRC Press, Boca Raton. 1995.
- WILLETTS, H. J. & WONG, J. A. -L. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. **Bot. Rev.** v. 46, p. 101-165. 1980.
- WRATHER, J. A., ANDERSON, T. R., ARSYAD, D. M., TAN, Y., PLOPER, L. D., PORTA-PUGLIA, A., RAM, H. H., YORINORI, J. T. Soybean disease loss estimates for the top ten soybean-producing countries in 1998. **Canadian Journal Plant Pathology**, v. 23, p. 115 – 121. 2001a.
- WRATHER, J. A., STIENSTRA, W. C., KOENNING, S. R. Soybean disease loss estimates for the United States from 1996 to 1998. **Canadian Journal Plant Pathology**, v. 23, p. 122 – 131. 2001b.
- YANG, X. B., LUNDEEN, P., UPHOFF, M. D. Soybean varietal response and yield loss caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 83, p. 456 – 461. 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.
- ZUCCHI, M. I. Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR. **Tese de Doutorado** – Universidade de São Paulo – USP, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, São Paulo – SP. 2002.

9.0 ANEXOS:

9.1. Meios de cultura

9.1.1. BDA (Batata Dextrose Agar)

Batata.....400g

Glicose.....10g

Ágar.....15g

Água destilada(q.s.p.).....1,0L

9.1.2. MYG (Malt Yeast Glucose)

Extrato de malte.....0,5g

Extrato de levedura.....0,25g

Glicose.....1g

Água destilada(q.s.p.).....100mL

9.2. Soluções

9.2.1. Ampicilina 10mg/mL

9.2.2. Tampão TE

TrisHCl.....10mM

EDTA, pH 8,0.....1mM

9.2.3. Solução Salina 0,9%

NaCl.....0,9g

Água destilada(q.s.p.).....1,0L

Autoclavada antes do uso

9.2.4. Tampão CTAB

CTAB.....2%

NaCl.....1,4M
EDTA.....20mM
Tris-HCl, pH 8,0.....100Mm
 β -Mercaptoetanol.....0,2% (acrescentado no momento do uso)

9.2.5. Clorofil

Clorofórmio e Álcool Isoamílico (24:1)

9.2.6. Clorofane

Clorofórmio e Fenol (1:1)

9.2.7. Isopropanol 100%

9.2.8. Etanol 70% em água

9.2.9. Etanol absoluto

9.2.10. Tampão de corrida TEB (10X)

Trizma base.....108g
Ácido bórico.....55g
EDTA.....20mL de solução 0,5M
Água destilada(q.s.p.).....1,0L
Autoclavado antes do uso

9.2.11. Tampão de amostra (5x)

Glicerol.....50% (v/v)
Azul de bromofenol.....0,25% (p/v)
TEB.....5X
Estocar a 4°C

9.2.12. Brometo de etídio 05mg/ml

9.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Marcadores de Microsatélites.

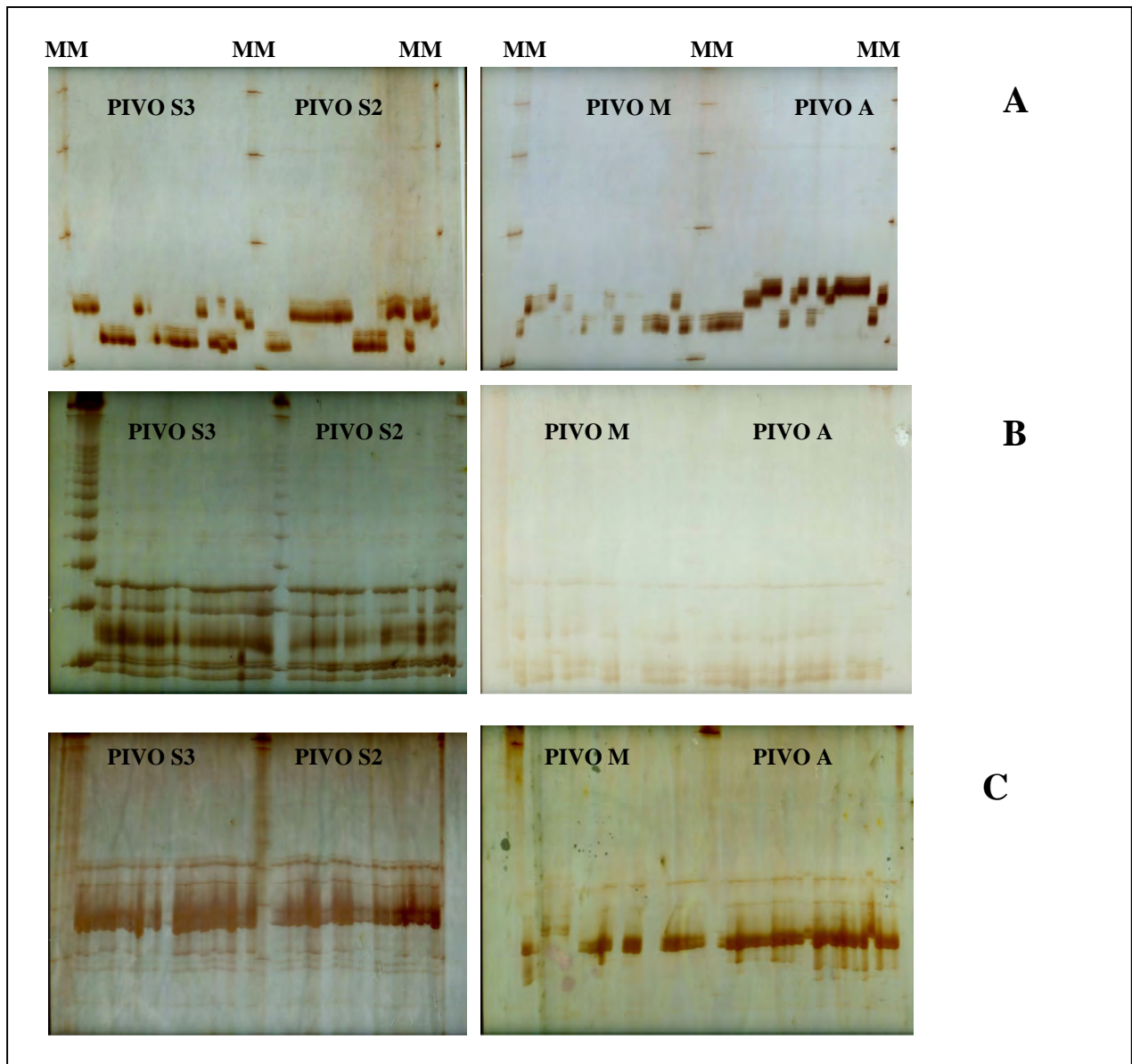


Figura 05: Perfil de produto de amplificação em gel de poliacrilamida 6%, corado com solução de Nitrato de Prata. Marcador de Peso Molecular 50 pb. Marcador 7-2, com fragmentos entre 150 pb e 200 pb (A). Marcador 8-3, com fragmentos entre 250 pb e 300 pb (B). Marcador 9-2, com fragmentos entre 350 pb e 400 pb (C).

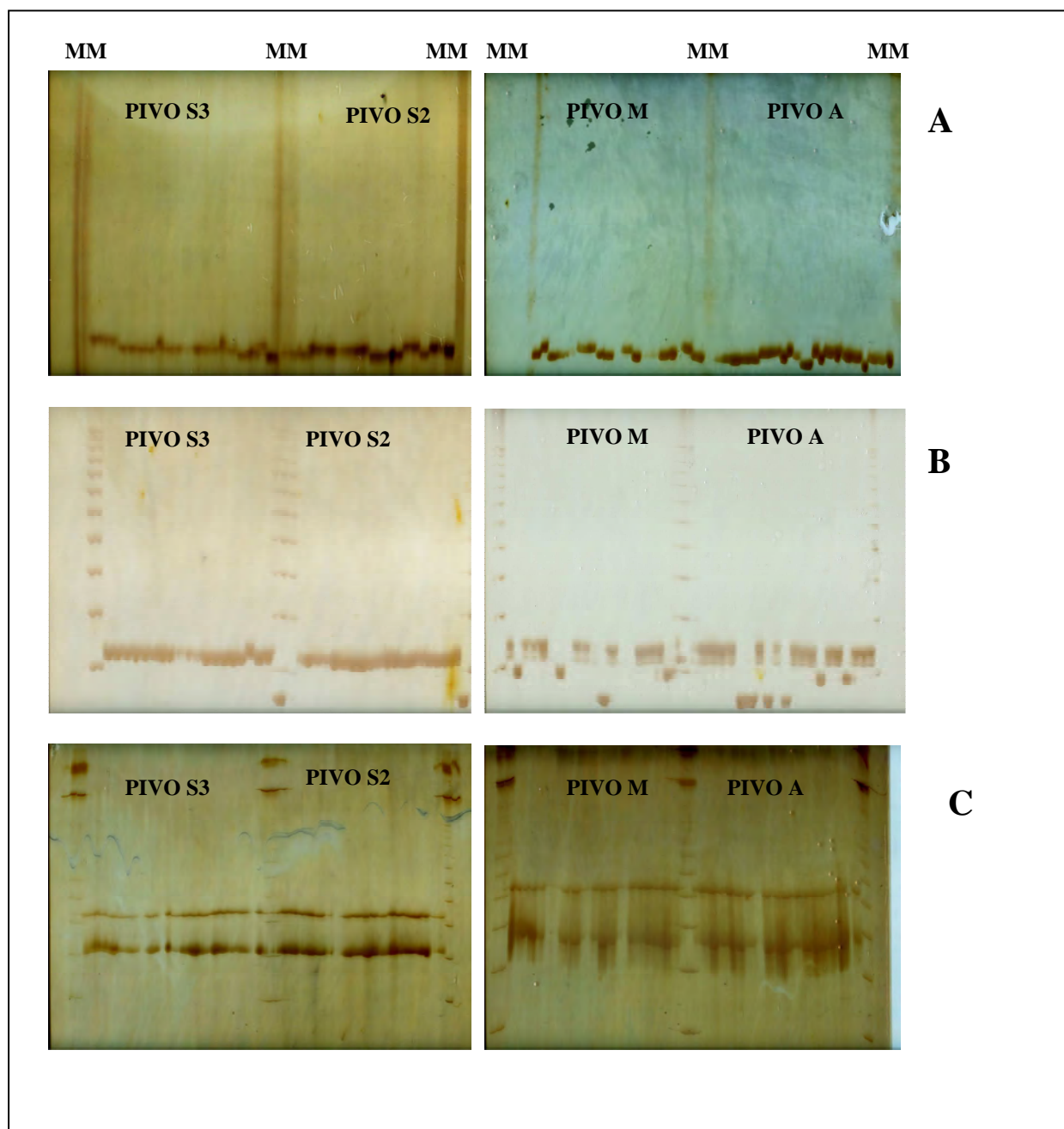


Figura 06: Perfil de produto de amplificação em gel de poliacrilamida 6%, corado com solução de Nitrato de Prata. Marcador de Peso Molecular 50 pb. Marcador 12-2, com fragmentos entre 200 pb e 250 pb (A). Marcador 13-2, com fragmentos entre 250 pb e 350 pb (B). Marcador 36-4, com fragmentos entre 400 pb e 450 pb (C).

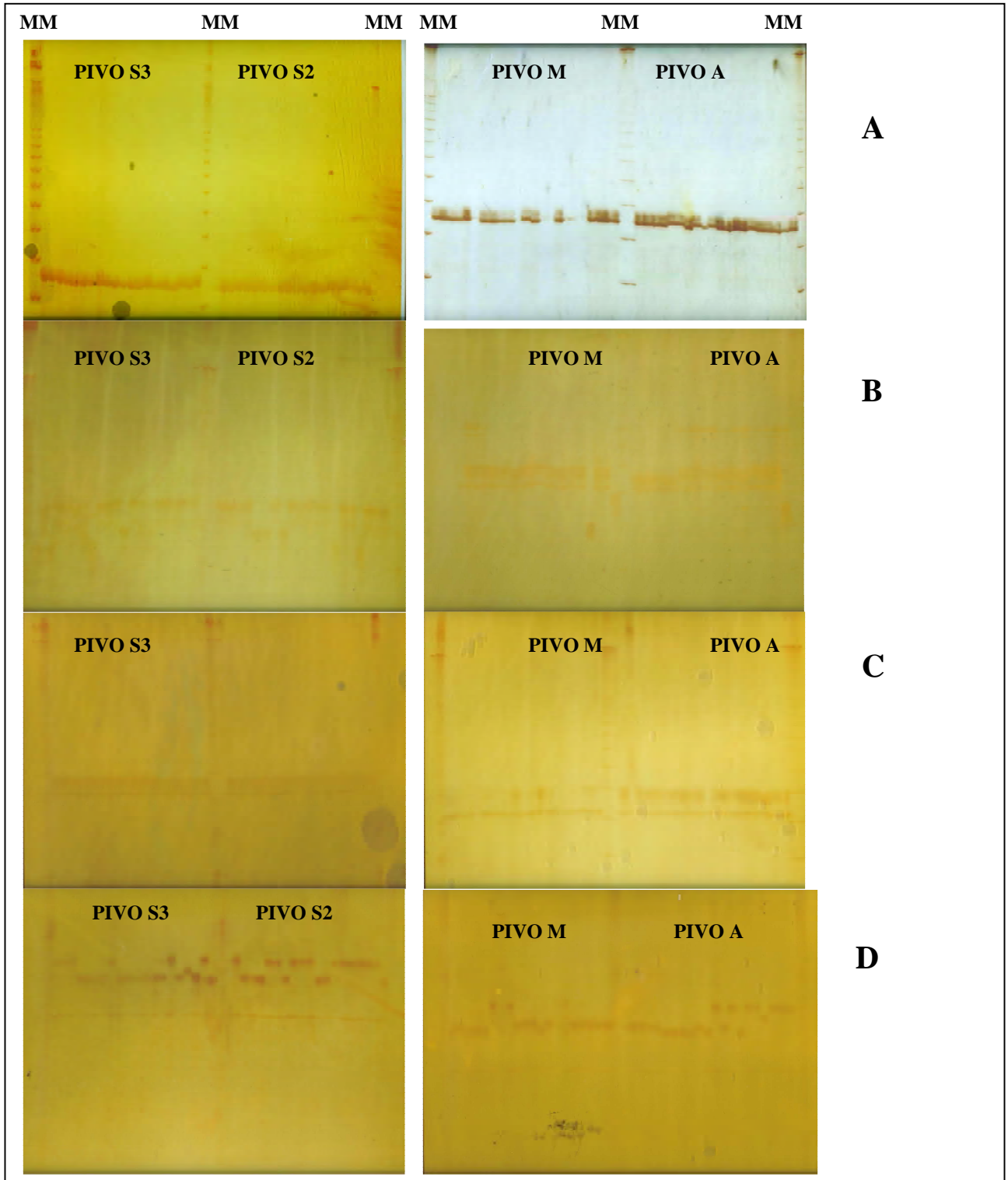


Figura 07: Perfil de produto de amplificação em gel de poliacrilamida 6%, corado com solução de Nitrato de Prata. Marcador de Peso Molecular 50 pb. Marcador 92-4, com fragmentos entre 350pb e 400pb (A). Marcador 114-4, com fragmentos entre 350pb e 400pb (B). Marcador 42-4, com fragmentos entre 400pb e 450pb (C). Marcador 106-4, com fragmentos entre 450pb e 600pb (D).

