

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

***O loco mating-type de Colletotrichum sublineolum:  
caracterização molecular e uso em análises de  
variabilidade genética***

**ORIENTADO: Michele Groenner Penna**  
**ORIENTADOR: Dra. Adlane Vilas Boas Ferreira**

BELO HORIZONTE  
Março - 2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Michele Groenner Penna

O loco *mating-type* de *Colletotrichum sublineolum*:  
caracterização molecular e uso em análises de  
variabilidade genética

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Genética do  
Departamento de Biologia Geral do Instituto de  
Ciências Biológicas da Universidade Federal de  
Minas Gerais, como requisito parcial para  
obtenção do título de mestre em Genética.

Orientadora: Dra. Adlane Vilas Boas Ferreira  
Laboratório de Genética de Microrganismos

Belo Horizonte  
Departamento de Biologia Geral  
Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
2008

Dedico meu trabalho ao Híggor e  
ao meu pai, minha mãe e meu irmão...

## Agradecimentos

À minha orientadora Dra. Adlane Vilas Boas Ferreira pela competência, dedicação, carinho e paciência que tornou sua orientação decisiva em minha vida acadêmica, por ser tão humana, tranqüila, sincera, enfim, pela amizade que tornou esses cinco anos de convivência e minha formação profissional ainda mais prazerosos;

À Dra. Mônica Bucciarelli pelas risadas, pelos momentos inusitados de sua aparição e pelos valorosos conselhos;

À Dra. Andréa Amaral pelos sorrisos matinais e pelos conselhos;

Ao Dr. Edmar Chartone pelas inúmeras conversas, experiências de vida transmitida e pelos conselhos;

Ao Dr. Evanguedes Kalapothakis pela imensa ajuda em meus experimentos e por manter a porta de seu laboratório sempre aberta;

A todos os Laboratórios do Programa de Pós-graduação em Genética pelo apoio;

Aos professores da Genética pelos ensinamentos e por serem sempre tão simpáticos comigo;

Aos queridos amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos, principalmente Cláudia e Gilka, pela convivência, por tornarem os dias no laboratório alegres e pelas inúmeras ajudas;

Aos meus queridos companheiros de bancada, principalmente Mayara e Aline por me ajudarem tanto e serem sempre preocupadas e prestativas;

Aos queridos amigos da Genética pelos momentos partilhados e pelo auxílio;

Às amigas Izabela, Raquel, Marcela, Patrícia, Paula, Ana Cristina, pela torcida e paciência;

À minha querida amiga Jú e ao Dani por sempre poder contar com vocês;

À minha linda amiga Marilene, Ênio e Gabriel pelo apoio e pelos momentos lindos que passamos;

À minha amiga Daniela e meu amigo Gustavo por dividirem comigo alegrias e desesperos nesses anos de laboratório e amizade, pelos momentos de descontração, mesmo à distancia;

À minha amiga-irmã Fabiana por ter paciência comigo, principalmente nos momentos difíceis, por ser minha amiga de uma forma incondicional e por eu saber que posso sempre contar com você;

Às minhas queridas amigas Marcela e Fernanda pela amizade e por todos os anos de convivência e luta;

À minha família por sempre me apoiarem quando precisei e por entender minha ausência;

Às pessoas mais importantes da minha vida meu pai, Carlos, minha mãe, Susan e meu irmão, Zé, por fazerem dos meus sonhos realidade;

Ao Híggor, companheiro inseparável, por ser meu alicerce, minha alegria, por não me deixar desistir nunca, por ter sido minha força nesses anos, pela amizade e amor;

A todos que contribuíram para minha formação e crescimento;

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e à CAPES.

## I. Índice

I. Índice .....	v
II. Resumo .....	vii
III. Abstract.....	viii
IV. Lista de Abreviaturas.....	ix
IV. Lista de Abreviaturas.....	ix
V. Lista de Figuras.....	xi
VI. Lista de Tabelas .....	xv
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1 Sorgo e Antracnose .....	2
1.2 <i>Colletotrichum sublineolum</i> .....	5
1.3 Reprodução Sexual e Genes <i>Mating-type</i> .....	11
1.4 Genes <i>MAT</i> e as estratégias reprodutivas de <i>Colletotrichum</i> .....	17
2 OBJETIVOS .....	21
2.1 Objetivo Geral.....	21
2.2 Objetivos Específicos.....	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	22
3.1 Isolados .....	23
3.2 Crescimento de <i>C. sublineolum</i> .....	23
3.3 Extração do DNA .....	24
3.4 Detecção do gene <i>MAT1-2</i> por amplificação da região HMG.....	25
3.5 Amplificação do gene <i>MAT1-2</i> .....	26
3.6 Amplificação das Regiões Flanqueadoras do <i>MAT1-2</i> .....	28
3.7 Amplificação da Região W1 .....	29
3.8 Amplificação da Região ITS.....	30
3.9 Purificação dos Amplicons de Interesse do Gel de Agarose .....	30
3.10 Clonagem das regiões flanqueadoras e do gene <i>MAT1-2</i> .....	31
3.11 Seqüenciamento.....	31

4	RESULTADOS.....	33
4.1	Amplificação da Região HMG e Detecção do Gene <i>MAT1-2</i> .....	34
4.2	Amplificação do Gene <i>MAT1-2</i> .....	35
4.3	Seqüenciamento do Gene <i>MAT1-2</i> .....	42
4.4	Estudo das Regiões Flanqueadoras de <i>MAT1-2</i> .....	47
4.5	Análise da Variabilidade Genética de <i>C. sublineolum</i> .....	52
4.5.1	Análise de Variabilidade da Região W1 .....	53
4.5.2	Análise de Variabilidade da Região HMG .....	58
4.5.3	Análise da Variabilidade da Região ITS .....	62
4.5.4	Análise da Variabilidade pelo Método MLSA .....	65
5	DISCUSSÃO .....	67
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	74

## II. Resumo

O fungo filamentoso *Colletotrichum sublineolum* é responsável pela antracnose em *Sorghum bicolor* e causa prejuízo de bilhões de dólares ao ano. A alta variabilidade desse fungo relacionada à virulência nos levou a investigar os componentes genéticos relacionados à possível reprodução sexuada de *C. sublineolum* e sua relação com a variabilidade genética. O principal loco envolvido na reprodução sexuada de fungos é o *mating-type*, que geralmente apresenta dois idiomorfos: *MAT1-1* e *MAT1-2*. O gene *MAT1-2* codifica um fator de transcrição que possui uma região muito conservada, denominada HMG. Essa região foi detectada em 28 isolados de *C. sublineolum* de diferentes localidades do Brasil. A clonagem e seqüenciamento do gene *MAT1-2* de *C. sublineolum* indicou uma ORF com grande homologia com as seqüências de *MAT1-2* de *C. graminicola* e *C. cereale*. As regiões flangeadoras do *MAT1-2* também foram estudadas, sendo identificada uma região denominada W1, que contém uma ORF com homologia ao gene da DNA liase de fungos filamentosos. Para a análise de variabilidade intraespecífica, as regiões HMG, W1 e ITS (Internal Transcribed Spacer do DNA ribossômico) foram seqüenciadas e comparadas em 10 isolados. Essas análises possibilitaram a análise intraespecífica dos isolados de *C. sublineolum* de acordo com sua região de origem e permitiram a comparação com as seqüências de *C. cereale* e, em alguns casos, com as de *C. graminicola*. Os dados aqui obtidos serão de grande valia para se entender mais sobre mecanismos de reprodução sexuada nesta e em outras espécies, em estudos de funcionalidade do *MAT1-2* de *C. sublineolum* e de variabilidade em maior escala.

### III. Abstract

The filamentous fungus *Colletotrichum sublineolum* is responsible for anthracnose in *Sorghum bicolor* which causes losses of billions of dollars every year. The high variability on virulence of *C. sublineolum* led us to investigate the genetic components related to a possible sexual reproduction and its relationship with genetic variability. *Mating-type* is the most important locus involved in sexual reproduction in fungi, and usually has two idiomorphs: *MAT1-1* and *MAT1-2*. The *MAT1-2* gene encodes a transcription factor with a high conserved region called HMG. This region was detected in 28 *C. sublineolum* isolates from different Brazilian localities. Cloning and characterization of the *MAT1-2* gene indicated an ORF with high homology to sequences of *MAT1-2* of *C. graminicola* and *C. cereale*. In an attempt to study the *MAT1-2* flanking regions, a region called W1 was identified which contains an ORF with homology to DNA lyases from filamentous fungi. The HMG, ITS (Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer) and W1 regions of 10 isolates were sequenced and compared for intraspecific variability analysis. These analyses allowed intraspecific comparisons of the isolates of *C. sublineolum* according to their origin and also to compare these sequences with those of *C. cereale* and in some cases with those of *C. graminicola*. These data will be valuable to understand more about the mechanisms of sexual reproduction in this and correlated species, in studies of functionality of *MAT1-2* of *C. sublineolum* and variability on a larger scale.

#### IV. Lista de Abreviaturas

FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

RNA - Ácido Ribonucléico

rDNA - DNA ribossômico

rRNA - RNA ribossômico

ITS - *Intergenic Transcribed Spacers*

HMG - *High Mobility Group*

EST - *Expressed Sequence Tag*

MAT - *Mating-type*

gpd - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

pb - pares de bases

Cfr - *Cross Fertility*

Kpb - kilo pares de base

ORF - *Open Reading Frame*

W1 - Região W1

OMA - *Oat Meal Agar*

µg - micrograma

mL - mililitro

ng - nanograma

°C - graus Celsius

rpm - rotações por minuto

µΩ - microohm

cm - centímetro

µL - microlitro

nm - nanômetro

mM - milimolar

pH - potencial hidrogeniônico

dNTPs -

U - unidades

Taq - *Termophilus aquaticus*

DMSO - dimetilsulfóxido

BSA - Albumina bovina sérica

W2 - Região W2

W3 - Região W3

W4 - Região W4

W5 - Região W5

W6 - Região W6

W7 - Região W7

W8 - Região W8

W9 - Região W9

W10 - Região W10

Blast - *Basic Local Alignment Search Tool*

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

UV - Ultra Violeta

Cs - *Colletotrichum sublineolum*

Cg - *Colletotrichum graminicola*

Cc - *Colletotrichum cereale*

MG - Minas Gerais

SP - São Paulo

RS - Rio Grande do Sul

NJ - *Neighbor Joining*

MLST - *Multi Locus Sequence Typing*

MLSA - *Multi Locus Sequence Analysis*

## V. Lista de Figuras

- Figura 1: Aspecto de dois isolados distintos de *C. sublineolum* em meio mínimo.....5
- Figura 2: Árvore gerada com as seqüências de rDNA-ITS baseada no método de Máxima Verossimilhança; destaque em vermelho: *C. graminicola* e em azul *C. sublineolum* (Du *et al.*, 2005).....8
- Figura 3: Árvore gerada com as seqüências da região HMG do *MAT1-2* baseada no método de Máxima Verossimilhança; destaque em vermelho: *C. graminicola* e em azul *C. sublineolum* (Du *et al.*, 2005). .....9
- Figura 4: Esquema geral dos idiomorfos de fungos ascomicetos mostrando a direção de transcrição dos genes presentes em *MAT1-1* e *MAT1-2* e os domínios representativos para a identificação de cada idiomorfo (adaptado de Silva *et al.*, 2003) ..... 16
- Figura 5: Esquema do gene *MAT* e suas regiões flanqueadoras montado a partir de informações fornecidas por J.A. Crouch (comunicação pessoal) sobre os iniciadores desenhados para as regiões especificadas. ....29
- Figura 6: Gel mostrando bandas referentes à amplificação da região HMG do *MAT1-2* visualizadas em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo sob luz UV. Acima da foto estão discriminados os isolados testados e ao lado o tamanho do amplicon e das bandas do Marcador de Peso Molecular 1Kb Plus (Invitrogen) mais próximas.....35
- Figura 7: Gel mostrando bandas referentes à PCR com os iniciadores MATCgramF/R visualizadas em gel de agarose 1% corados com brometo de etídeo sob luz UV.....36
- Figura 8: Gel mostrando bandas obtidas pela amplificação do *MAT1-2* na PCR gradiente com os iniciadores MATCgramF/R, variando a temperatura de anelamento de 51°C a 59°C e utilizando os DNAs dos isolados 06 e 223, visualizadas em gel de agarose 1% corados com brometo de etídeo sob luz UV. Seta branca: amplicon do tamanho esperado de 1400 pb.....37
- Figura 9: Gel mostrando bandas obtidas pela amplificação do *MAT1-2* em teste de uma PCR com diferentes tampões, tampão 1 ao 12 de acordo com o kit Opti-Prime™ PCR Optimization (Stratagene) e utilizando o DNA do isolado 06, visualizadas em gel de agarose 1% corados com brometo de etídeo sob luz UV. ...38
- Figura 10: Gel mostrando bandas obtidas pela amplificação do *MAT1-2* em PCR que testou a quantidade de DNA do isolado 06 a 100ng (canaleta 1), 50ng (canaleta 2), 30ng (canaleta 3), 20ng (canaleta 4), 10ng (canaleta 5), e 5ng/reação (canaleta 6), visualizadas em gel de agarose 1% corados com brometo de etídeo sob luz UV. ...39
- Figura 11: Gel mostrando bandas obtidas pela amplificação do *MAT1-2* em PCR com diferentes tampões e utilizando o DNA do isolado 06 de *C. sublineolum*, visualizadas em gel de agarose 1% corados com brometo de etídeo sob luz UV. Canaletas 1-4: PCR com tampão 10 do kit Opti-Prime™ PCR Optimization

(Stratagene) e com temperatura de anelamento de 50°C, 52°C, 54°C e 56°C, respectivamente. Canaletas 5-8: PCR com o Pré-mix Phoeutria e com temperatura de anelamento de 50°C, 52°C, 54°C e 56°C, respectivamente. Seta branca: amplicon do tamanho esperado, 1600 pb, referente à amplificação do *MAT1-2*.....40

Figura 12: Bandas obtidas na PCR para amplificação do *MAT1-2* visualizadas em gel de agarose 1% corados com brometo de etídeo sob luz UV. Canaletas 1-8: PCR com o par de iniciadores MATCgram2; canaletas 1-4: amostras de *C. graminicola* 1, 2, 3 e 4; Canaletas 5-8: isolados 223, 176, 06 e 51 de *C. sublineolum*. Canaletas 9-16: PCR com o par de iniciadores MATCgram; canaletas 9-12: amostras de *C. graminicola* 1, 2, 3 e 4; Canaletas 13-16: isolados 223, 176, 06 e 51 *C. sublineolum*. .....41

Figura 13: Predição da seqüência de aminoácidos referente ao gene *MAT1-2* de *C. sublineolum*. Sublinhado: Provável códon de início da tradução e de parada da tradução. Sublinhado duplo: prováveis sinais de *splicing* dos íntrons. Aminoácidos sublinhados indicam a região HMG.....43

Figura 14: Alinhamento das seqüências do *MAT1-2* de *C. sublineolum* (Cs), *C. graminicola* (Cg) e *C. cereale* (Cc). Realizado no programa MultiAlin (Corpet, 1988). Em vermelho as bases comuns para as três espécies, em azul as bases comuns para duas espécies, em preto bases singulares para as três espécies e (-) representa *gap* na seqüência. Abaixo de cada alinhamento é mostrada a seqüência consenso para as três espécies. ....46

Figura 15: Alinhamento das seqüências protéicas de 238 aminoácidos referentes à *MAT1-2* de *C. sublineolum* e *C. graminicola*, realizado no programa ClustalX2.0.3, utilizando a matriz pam120 com os parâmetros *gap opening* e *gap extension* de 11 e 4 respectivamente. (\*): Aminoácido conservado, (:) substituição por aminoácidos com características químicas similares e (.) indica substituição neutra de aminoácidos, as cores representam grupos de aminoácidos estabelecidos da seguinte forma: Laranja: GPST, Vermelho: HKR, Azul: FWY, Verde: ILMV.....47

Figura 16: Gel mostrando bandas referentes à amplificação das regiões flangeadoras W1 e W2 do *MAT1-2* visualizadas em gel de agarose 1% corados com brometo de etídeo sob luz UV. 1. Marcador de Peso Molecular 1Kb Plus (Invitrogen); 2. branco W1; 3. W1 do Isolado 24; 4. W1 do Isolado 06; 5. branco W2; 6. W2 do Isolado 24; 7. W2 do Isolado 06. Seta branca: Amplicon de tamanho correspondente ao esperado.....48

Figura 17: Bandas referentes à amplificação das regiões flangeadoras W3, W4 e W5 do *MAT1-2* visualizadas em gel de agarose 1% corados com brometo de etídeo sob luz UV. 1. Marcador de Peso Molecular 1Kb Plus (Invitrogen); 2. branco W3; 3. W3 do Isolado 24; 4. W3 do Isolado 06; 5. branco W4; 6. W4 do Isolado 24; 7. W4 do Isolado 06; 8. branco W5; 9. W5 do Isolado 24; 10. W5 do Isolado 06. Seta branca: Amplicon de tamanho correspondente ao esperado. ....49

Figura 18: Bandas referentes à amplificação das regiões flangeadoras W6, W7 e W8 do *MAT1-2* visualizadas em gel de agarose 1% corados com brometo de etídeo sob luz UV. 1. branco W6; 2. W6 do Isolado 24; 3. W6 do Isolado 06; 4. branco W7; 5. W7 do Isolado 24; 6. W7 do Isolado 06; 7. branco W8; 8. W8 do Isolado 24; 9. W8

do Isolado 06; 10. Marcador de Peso Molecular 1Kb Plus (Invitrogen);. Seta branca: Amplicon de tamanho correspondente ao esperado.....50

Figura 19: Bandas referentes à amplificação das regiões flangeadoras W9 e W10 do *MAT1-2* visualizadas em gel de agarose 1% corados com brometo de etídeo sob luz UV. 1. branco W9; 2. W9 do Isolado 24; 3. W9 do Isolado 06; 4. branco W10; 5. W10 do Isolado 24; 6. W10 do Isolado 06; 7. Marcador de Peso Molecular 1Kb Plus (Invitrogen);. Seta branca: Amplicon de tamanho correspondente ao esperado.....51

Figura 20: Gel mostrando bandas referentes à amplificação da região W1 de aproximadamente 948 pb visualizadas em gel de agarose 1% corados com brometo de etídeo sob luz UV. ....53

Figura 21: Alinhamento das seqüências da região flangeadora W1 do gene *MAT1-2* realizado no programa MultiAlin (Corpet, 1988). Em vermelho as bases comuns para as três espécies, em azul as bases comuns para duas espécies, em preto bases singulares para as três espécies e (-) representa *gap* na seqüência. Abaixo de cada alinhamento é mostrada a seqüência consenso para as duas espécies.....56

Figura 22: Árvore gerada com as seqüência da região W1 pelo algoritmo NJ com 1000 repetições de bootstrap. ....57

Figura 23: Alinhamento da ORF traduzida encontrada na região W1 de *C. sublineolum* com seqüências de DNA liase das espécies *Giberella zeae* (número de acesso: XP\_389065), *N. crassa* (número de acesso: XP\_964325.2) e *Mycosphaerella graminicola* (número de acesso: AAL30835.1), realizado com o programa ClustalX2.0.3, utilizando a matriz pam120 com os parâmetros *gap opening* e *gap extension* de 11 e 4 respectivamente. (\*): Aminoácido conservado, (:) substituição por aminoácidos com características químicas similares e (.) indica substituição neutra de aminoácidos, as cores representam grupos de aminoácidos estabelecidos da seguinte forma: Laranja: GPST, Vermelho: HKR, Azul: FWY, Verde: ILMV. ....58

Figura 24: Alinhamento das seqüências da região HMG do gene *MAT1-2* realizado no programa MultiAlin (Corpet, 1988). Em vermelho as bases comuns para as três espécies, em azul as bases comuns para duas espécies, em preto bases singulares para as três espécies e (-) representa *gap* na seqüência. Abaixo de cada alinhamento é mostrada a seqüência consenso para as três espécies. ....59

Figura 25: Árvore gerada com as seqüência da região HMG do *MAT1-2* pelo algoritmo NJ com 1000 repetições de bootstrap. ....60

Figura 26: Alinhamento da região codificadora do HMG do *MAT1-2* de *C. sublineolum* com seqüências de *G. graminicola* e *C. cereale*, realizado com o programa ClustalX2.0.3, utilizando a matriz pam120 com os parâmetros *gap opening* e *gap extension* de 11 e 4 respectivamente. (\*): Aminoácido conservado, (:) substituição por aminoácidos com características químicas similares e (.) indica substituição neutra de aminoácidos, as cores representam grupos de aminoácidos estabelecidos da seguinte forma: Laranja: GPST, Vermelho: HKR, Azul: FWY, Verde: ILMV. ....61

Figura 27: Bandas referentes à amplificação da região ITS de aproximadamente 600 pb visualizadas em gel de agarose 1% corados com brometo de etídeo sob luz UV. ....62

Figura 28: Alinhamento das seqüências da região ITS realizado no programa MultiAlin (Corpet,1988). Em vermelho as bases comuns para as três espécies, em azul as bases comuns para duas espécies, em preto bases singulares para as três espécies e (-) representa *gap* na seqüência. Abaixo de cada alinhamento é mostrada a seqüência consenso para as três espécies.....63

Figura 29: Árvore gerada com as seqüência da região ITS pelo algoritmo NJ com 1000 repetições de bootstrap. ....64

Figura 30: Árvore gerada com as seqüência da região W1, ITS e HMG pelo algoritmo NJ com 1000 repetições de bootstrap. ....66

Figura 31: Evolução e arquitetura do *cluster* do gene *mating-type* em fungos filamentosos ascomicetos (Adaptado de Crouch, comunicação pessoal).....72

## VI. Lista de Tabelas

Tabela 1: Amostra representativa de espécies do gênero <i>Colletotrichum</i> , com suas respectivas formas teleomorfas (sexuada) e com uma indicação da gama de hospedeiro atingido .....	3
Tabela 2: Isolados de <i>C. sublineolum</i> originados de diferentes campos de cultivo de sorgo no Brasil. ....	23
Tabela 3: Tampões descritos pelo Manual do Opti-Prime™ PCR Optimization Kit da Stratagene.....	27
Tabela 4: Iniciadores das regiões flanqueadoras e do gene <i>MAT1-2</i> de <i>C. cereale</i> . 28	

# 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 Sorgo e Antracnose

O sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] é um cereal, membro da família das gramíneas, muito próximo do milho (*Zea mays* L.) e da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). *S. bicolor* representa o táxon domesticado, resultado do intercasalamento de sorgos domesticados e de seus parentes selvagens próximos (Valério, 2004). Esse cereal é originário da África Central e passou a ser cultivado em toda África e Ásia, atingindo também as Américas e a Austrália (Frederiksen, 1999).

O sorgo é o quinto cereal mais produzido no mundo, contribuindo com 14% da produção total de cereais (Chateraud e Nicou, 1994). O cultivo de sorgo é altamente adaptado às condições de alta temperatura e de baixa precipitação, resultando em altas produções de grãos e sendo também utilizado como forragem nesses locais (Leslie e Frederiksen, 1995). Cerca de 80% da área total que produz sorgo concentra-se em países em desenvolvimento dos trópicos semi-áridos, o que ressalta a relevância dessa cultura no Brasil (Ngugi *et al.*, 2002). A produção mundial por ano pode atingir 60 milhões de toneladas e a área de cultivo ocupou aproximadamente 44 milhões de hectares em todo o mundo em 2004. O Brasil contribui com aproximadamente 1,5% da produção mundial deste cereal, valor equivalente a cerca de 1,4 milhões de toneladas em 2005 (FAO, 2006; IBGE, 2006).

No Brasil, a cultura de sorgo está sujeita a um grande número de enfermidades causadas por fungos, como: a antracnose (*Colletotrichum sublineolum*); a ferrugem (*Puccinia purpurea*); o mildio (*Peronosclerospora sorghi*); a queima das folhas (*Exserohilum turcicum*); a podridão de macrofomina (*Macrophomina phaseolina*); a mancha zonada (*Gloeocercospora sorghi*); a

cercosporiose (*Cercospora fusimaculans*) e a doença açúcarada ou “ërgot” (*Claviceps africana*) (Casela *et al.*, 1992, Ferreira & Casela, 1995).

A antracnose é uma das mais importantes doenças do sorgo. Ela limita a produção, podendo causar uma redução de 50% a 80%, principalmente pelo incompleto preenchimento dos grãos, redução no peso e na densidade de sementes por panícula (Casela e Ferreira, 1995). As três principais fases da doença são: a antracnose foliar, a podridão do colmo e a antracnose da panícula e do grão.

O agente causal da antracnose em cereais e gramíneas são espécies de fungos filamentosos do gênero *Colletotrichum*. As espécies são denominadas de duas formas: uma representa a forma anamorfa, que é a forma assexuada, e a outra representa a forma teleomorfa que corresponde à forma sexuada. Na tabela abaixo, as espécies de *Colletotrichum* são descritas também de acordo com o hospedeiro no qual são encontradas (Tabela 1). O patógeno isolado de sorgo é conhecido atualmente como *C. sublineolum* uma vez que se distinguiu do isolado de milho, o *C. graminicola* (revisado em Gale, 2002).

Tabela 1: Amostra representativa de espécies do gênero *Colletotrichum*, com suas respectivas formas teleomorfas (sexuada) e com uma indicação da gama de hospedeiro atingido (adaptado de: <http://www.sorghumanthrachnose.org/pathogen.html>)

<b><i>Colletotrichum</i> (anamorfa)</b>	<b><i>Glomerella</i> (teleomorfa)</b>	<b>Gama de Hospedeiro</b>
<b>Espécies com Esporos retos</b>		
<i>acutatum</i>	-	Plurivorous
<i>coccodes</i>	-	Solanaceae
<i>kahawae</i>	-	Coffea (café)
<i>destructivum</i>	<i>glycines</i>	Fabaceae
<i>fragariae</i>	-	Fragaria (morango)

<i>gloeosporioides</i>	<i>cingulata</i>	Plurivorous
<i>lindemuthianum</i>	<i>lindemuthiana</i>	Phaseolus (feijão)
<i>musae</i>	<i>musarum</i>	Musa (banana)
<i>malvarum</i>	-	Malvaceae
<i>orbiculare</i>	<i>lagenaria</i>	Cucurbitaceae, Asteraceae
<b>Espécies com Esporos falciformes</b>		
<i>caudatum</i>	-	Poaceae
<i>capsici</i>	-	Solanaceae
<i>circinans</i>	-	Allium (cebola)
<i>dematium</i>	-	Plurivorous
<i>falcatum</i>	<i>tucumanensis</i>	Saccharum (cana-de-açúcar)
<i>graminicola</i>	<i>graminicola</i>	Poaceae ( <i>Zea</i> )
<i>sublineolum</i>	-	Poaceae ( <i>Sorghum</i> )
<i>truncatum</i>	-	Fabaceae

O controle químico da antracnose não é uma prática com bom retorno: a eficiência de fungicidas ainda não foi comprovada, principalmente após uso contínuo, e os custos geralmente são muito altos para os agricultores (Pinto, 2003). A utilização de outras práticas, como a rotação de culturas e eliminação de restos dos cultivares e de hospedeiros alternativos, pode reduzir inóculos iniciais, mas não elimina o patógeno e a chance de uma contaminação na próxima cultura (Frederiksen, 1999). Por outro lado, a utilização de cultivares resistentes tem sido uma forma relativamente eficiente no controle da antracnose, embora nessa prática exista algumas dificuldades: é sabido que o patógeno pode apresentar grande variabilidade na virulência, o que confere a esse organismo uma rápida

adaptabilidade a novos cultivares de sorgo resistentes, podendo gerar o aparecimento de novas raças (Pastor-Corrales & Frederiksen, 1979; Ferreira & Casela, 1986; Ali & Warren, 1987; Casela & Frederiksen, 1993; Casela *et al.* 1998; Valério *et al.*, 2005).

## 1.2 *Colletotrichum sublineolum*

O fungo filamentoso *C. sublineolum* (Figura 1) era considerado há décadas atrás um deuteromiceto, por não apresentar forma sexuada (teleomorfa). Com a emergência das técnicas moleculares os fungos desse extinto grupo foram reclassificados. Mas antes disso, estudando a forma dos conídios, tamanho e morfologia dos apressórios, Sutton, em 1980, diferenciou essas estruturas nos fungos da espécie *Colletotrichum* que eram patógenos do milho, do sorgo e da cana-de-açúcar e sugeriu que a espécie *C. graminicola* deveria abranger apenas isolados de milho e que a espécie isolada de sorgo fosse denominada *C. sublineolum* P. Henn, Kabat & Bulbak (revisado em Gale, 2002).

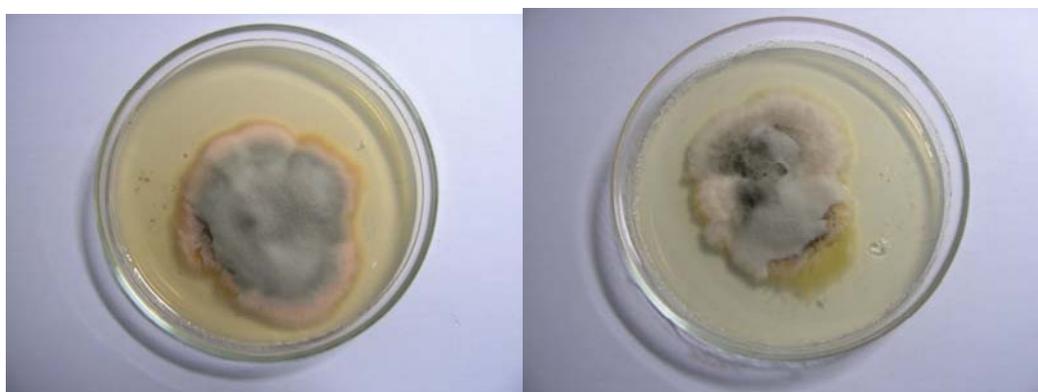


Figura 1: Aspecto de dois isolados distintos de *C. sublineolum* em meio mínimo.

Então, métodos moleculares foram utilizados para confirmar as observações de Sutton. Técnicas como análise de padrões de isoenzimas, filtro de aminopeptidase, padrão de proteínas solúveis em gel de eletroforese e uma técnica de aminopeptidase laser-*enhanced* conseguiram separar os isolados por tipo de hospedeiro (revisado em Gale, 2002). Estudos de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) do DNA mitocondrial e padrões de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) de *Colletotrichum* demonstraram que *C. falcatum* isolado de cana-de-açúcar está filogeneticamente separado de *Colletotrichum* de milho e sorgo por uma grande distância evolutiva (revisado em Gale, 2002). Posteriormente, foi proposto que as espécies de *Colletotrichum* isoladas de milho e sorgo representavam espécies distintas (Vaillancourt & Hanau, 1992). Em 1996, Sreenivasaprasad *et al.* em um estudo de filogenia e sistemática de 18 espécies de *Colletotrichum* utilizando a região espaçadora intergênica do rDNA respaldou o que muitos estudos taxonômicos já indicavam: o fungo ascomiceto causador da antracnose de sorgo deveria ser distinguido daquele causador de antracnose de milho e então ser sempre considerado como *C. sublineolum*. Então, mesmo sem apresentar sua forma sexuada (anamorfa) *C. sublineolum* é considerado um representante do Filo Ascomycota, da Subdivisão Pezizomycotina, da Classe Sordariomycetes, da Ordem Phyllachorales, da Família Phyllachoraceae. Em um estudo mais recente (Du *et al.*, 2005), seqüências da região do rDNA que compreende a região ITS1 e ITS2 (Intergenic Transcribed Spacers) e o 5,8S e seqüências da região HMG do gene *mating-type*, *MAT1-2* (que será tratado com mais detalhes posteriormente, no item 1.3) foram utilizadas para demonstrar a relação filogenética entre diversas espécies do gênero *Colletotrichum*, mostrando que essa se separa muito bem as espécies pelas seqüências da região ITS e melhor

ainda pelas seqüências da região HMG (Ver Figura 2 e Figura 3). Através da análise das relações obtidas com as seqüências de cada região para as espécies *C. graminicola* e *C. sublineolum* pode-se perceber que a árvore gerada com as seqüências do rDNA mantém os isolados de *C. graminicola* em três *clusters* distintos, enquanto que na árvore gerada com as seqüências da região HMG do *MAT1-2* os isolados dessa espécie estão agrupados em dois *clusters* e esses *clusters* estão mais próximos do *cluster* de *C. sublineolum* que na árvore das seqüências do rDNA. Isso sugere maior fidelidade e resolução na análise da região HMG que na análise do rDNA em um estudo filogenético.

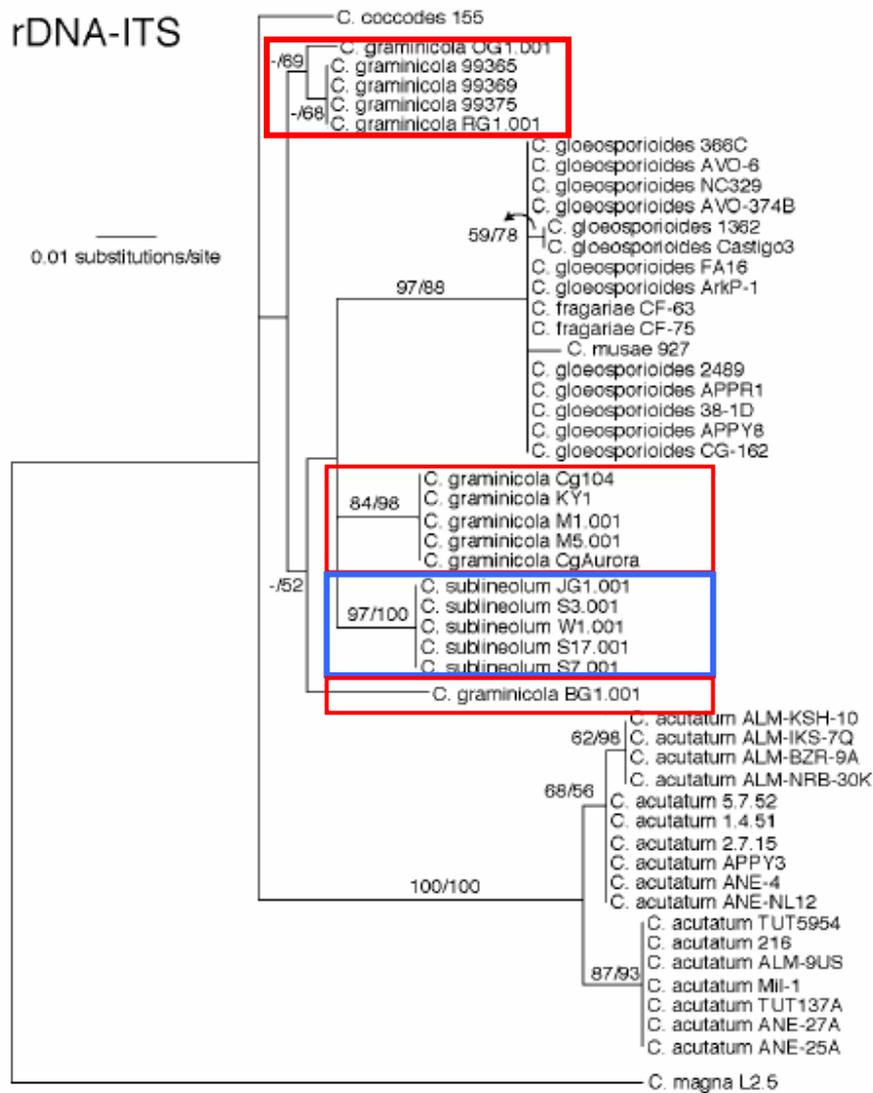


Figura 2: Árvore gerada com as seqüências de rDNA-ITS baseada no método de Máxima Verossimilhança; destaque em vermelho: *C. graminicola* e em azul *C. sublineolum* (Du *et al.*, 2005).

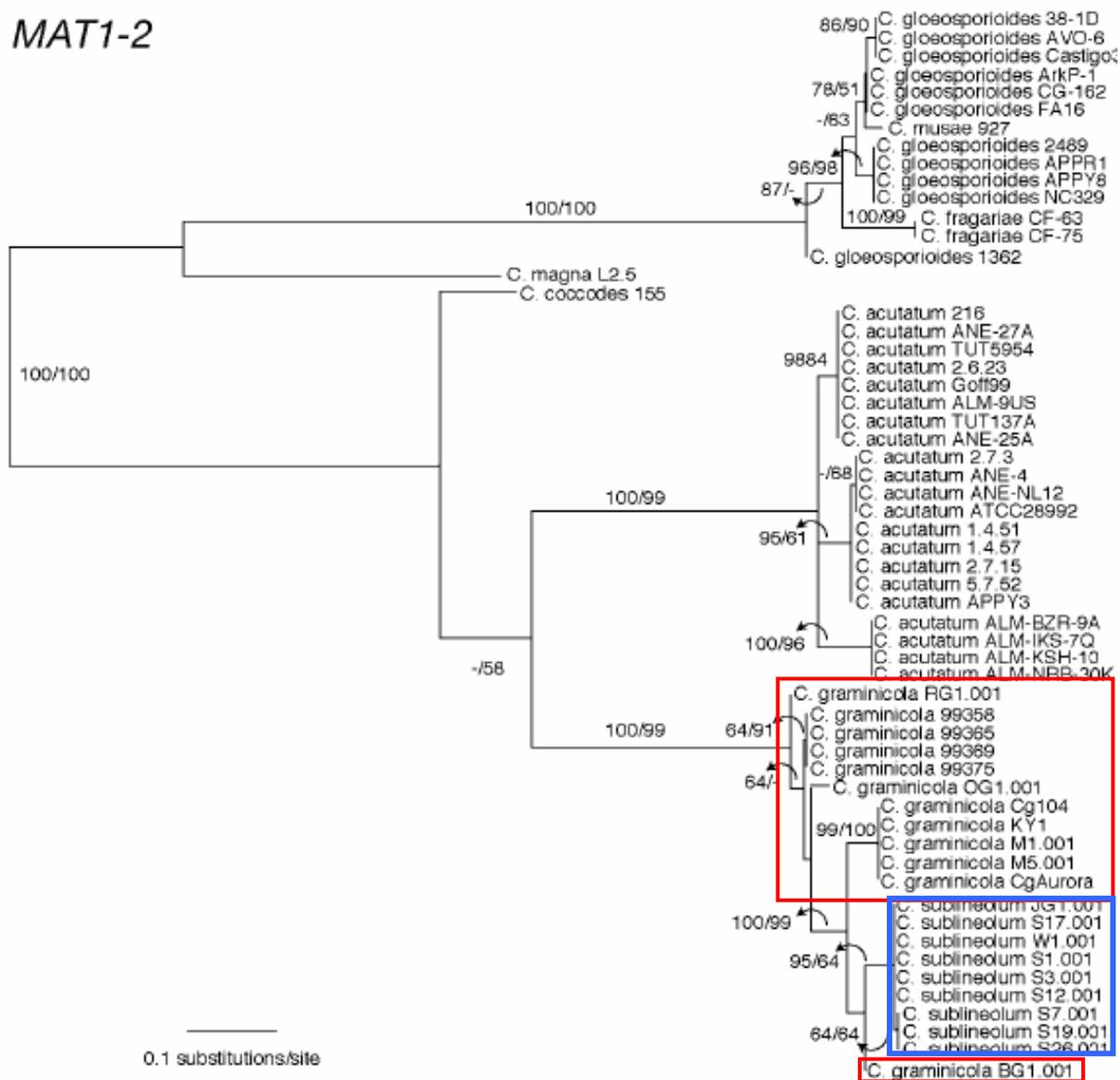


Figura 3: Árvore gerada com as seqüências da região HMG do *MAT1-2* baseada no método de Máxima Verossimilhança; destaque em vermelho: *C. graminicola* e em azul *C. sublineolum* (Du *et al.*, 2005).

*C. sublineolum* apresenta grande variabilidade, principalmente relacionada à virulência e isso é um importante problema a ser enfrentado quando se introduz cultivares de sorgo resistentes. Essa resistência do sorgo pode ser rapidamente superada pela adaptação dinâmica do patógeno que, em menos de dois meses, pode se instalar com sucesso em um novo cultivar de sorgo (revisado em Costa *et al.*, 2003). Muitos estudos realizados com *C. sublineolum* abordam a virulência, sua capacidade de causar infecção e a severidade da mesma em diferentes cultivares de sorgo (Gale, 2002), como o estudo realizado em isolados brasileiros por Valério *et al.* (2003). Esse fungo pode ser classificado em raças através dos fenótipos de virulência (Valério *et al.*, 2005; Frederiksen *et al.*, 1999; Gale, 2002; Costa *et al.*, 2003.). Análises de RAPD determinaram que populações não eram geograficamente definidas, existindo um mesmo haplótipo em diferentes localidades como Brasil e Estados Unidos (Casela, 1992). Essa informação mostra que há, ou houve, fluxo gênico impedindo a divergência desse patógeno, o que leva a crer que populações de áreas distantes podem ter se originado de uma mesma linhagem (Gale, 2002). No entanto, não se sabe se a grande diversidade na virulência desse patógeno de sorgo é consequência da reprodução sexual (já que esta não foi ainda observada na natureza) ou de outros fatores como a recombinação mitótica e a presença de elementos geneticamente móveis.

No caso de *C. graminicola*, a espécie de fungo mais próxima filogeneticamente de *C. sublineolum*, o mecanismo de troca gênica que garante a esse patógeno uma alta variabilidade também não é muito bem conhecido. A fase sexuada (teleomorfa), *Glomerella graminicola*, nunca foi observada na natureza, apesar de que peritécios férteis e ascósporos viáveis foram obtidos em acasalamentos de isolados de milho em condições de laboratório (Vaillancourt &

Hanau, 1991). Da mesma forma, a estrutura sexuada de *C. sublineolum* nunca foi encontrada na natureza, mas em laboratório a forma sexuada foi induzida com sucesso, em isolados americanos. Essa forma apresentou-se similar a *G. graminicola*, indicando que esse fungo possui a capacidade de se reproduzir sexuadamente (Vaillancourt & Hanau, 1992). Pela dificuldade de se encontrar a fase sexuada desse fungo, uma investigação molecular das bases genéticas que tornaria possível a reprodução sexuada poderia fornecer evidências para acreditar que esse tipo de reprodução ocorre, como, por exemplo, a investigação dos genes envolvidos no processo.

A busca do conhecimento referente ao fungo *Colletotrichum graminicola* tem levantado o interesse de diversos grupos de pesquisa. O projeto genoma desse fungo foi iniciado em 2007 e envolve diversos institutos de pesquisa: University of Kentucky, Broad Institute of MIT and Harvard University, Institute for Plant Genomics and Biotechnology e Texas A&M University. Esse projeto tem como objetivo produzir e disponibilizar seqüências que cobrirão oito vezes o tamanho do genoma de um isolado americano de *C. graminicola*. Pesquisadores interessados em *C. sublineolum* certamente se beneficiarão desse projeto devido à grande semelhança dessas duas espécies.

### **1.3 Reprodução Sexual e Genes *Mating-type***

O termo *mating-type* é utilizado em fungos para designar tipos de acasalamento, por exemplo, cada linhagem de um par de acasalamento constitui um tipo de acasalamento, um *mating-type*. Da mesma forma esse termo é utilizado para

denominar genotipicamente essas linhagens, uma vez que os fungos não apresentam dimorfismo sexual e as diferenças de um par interfértil são definidas genotipicamente. Por exemplo, em *Neurospora crassa* os tipos de acasalamento podem ser denominados *mating-type A* e *mating-type a*.

Tratando-se do mecanismo de reprodução sexual, os fungos apresentam três estratégias principais: o heterotalismo, o homotalismo e o pseudohomotalismo. No primeiro caso, os indivíduos são auto-estéreis e necessitam de um parceiro compatível para que ocorra o acasalamento. No homotalismo, o indivíduo é autofértil podendo ocorrer tanto na presença como ausência de parceiros sexuais. O pseudohomotalismo se caracteriza pela presença de dois núcleos não fundidos de tipos diferentes que dão origem a micélios binucleados autoférteis, ou ainda pelo fenômeno denominado *mating-type switching* (troca de tipo de acasalamento) inicialmente descrito na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Independentemente da estratégia de acasalamento, em todos os casos são os genes *mating-type* que controlam a entrada no ciclo sexuado e garantem o desenvolvimento sexual (revisado em Pöggeler, 1999; Souza *et al.*, 2003).

Os fungos homotáticos, como, por exemplo, *Sordaria macrospora*, desenvolvem micélios autoférteis a partir de um ascósporo mononucleado, micélios esses que permitem a fusão de núcleos idênticos (revisado em Pöggeler, 1999). Há muitos anos o heterotalismo foi observado em fungos onde o acasalamento de linhagens monospóricas de um fungo zigomicota demonstrou pares interférteis, que eram auto-estéreis. Cada fungo de um par interfértil representava um tipo de acasalamento, ou *mating-type*. Essa classificação, então, define indivíduos da mesma espécie que não podem ser distinguidos morfológicamente, por não

apresentarem dimorfismo sexual, e que são sexualmente compatíveis (Coppin *et al.*, 1997).

Os tipos de acasalamentos descritos até aqui foram descritos para ascomicetos, já os fungos basidiomicetos apresentam dois sistemas principais de acasalamento: bipolar ou tetrapolar. O acasalamento bipolar acontece através do reconhecimento de um único loco com duas especificidades; este é o sistema menos comum nos basidiomicetos, porém é o mais encontrado nos fungos ascomicetos. Já o acasalamento tetrapolar apresenta-se extremamente complexo, com dois locos que podem gerar, por exemplo, em *Schizophyllum commune*, um basidiomiceto, cerca de 20.000 tipos diferentes de acasalamento. No caso do acasalamento tetrapolar esses dois locos codificam uma proteína homeodomínio e feromônios, daí gerando inúmeras especificidades (Kronstad e Staben, 1997).

Nos fungos basidiomicetos, os genes *mating-type* estão envolvidos com todo o ciclo celular, com a manutenção da fase haplóide (brotamento), dicariótica (crescimento filamentoso) e diplóide (teliosporos) (Kronstad e Staben, 1997). Além disso, os genes *MAT* estão envolvidos com a produção de feromônios e de receptores para feromônios. Muitos desses eventos controlados pelos genes *mating-type* estão envolvidos na patogenicidade desses fungos (Kronstad e Staben, 1997).

Os genes *mating-type* de ascomicetos estão envolvidos em mecanismos de controle da diferenciação sexual, desenvolvimento sexual e eventos pós-fertilização (Coppin, 1997), assim como funções vegetativas, como a incompatibilidade vegetativa (Perkins & Turner, 1988; revisado em Glass & Kuldau, 1992; Souza *et al.*, 2003), o sistema de reconhecimento do próprio/não-próprio (revisado em Glass & Kuldau, 1992), a morte celular, como a apoptose (Coppin, 1993) e a patogenicidade e virulência (Kronstad & Staben, 1997).

O loco *mating-type* (*MAT*) dos diferentes fungos ascomicetos apresenta seqüências dissimilares, com genes transcritos divergentemente (Figura 4). Essas seqüências são denominadas idiomorfos, pois, apesar de se localizarem no mesmo loco, são suficientemente diferentes para não serem denominadas alelos (Metzenberg & Glass, 1990). Essa dissimilaridade tem como conseqüência uma ínfima taxa de recombinação no loco *MAT* ocasionando a herança uniparental dos genes *mating-type* (Turgeon, 1998).

Os primeiros locos *mating-type* que tiveram suas seqüências determinadas foram *MAT a* e *MAT  $\alpha$*  do fungo leveduriforme *S. cerevisiae* (Astell *et al.*, 1981). O idiomorfo *mat a* apresenta dois genes, *MAT a1* e *MAT a2* e o idiomorfo *mat  $\alpha$*  também apresenta dois genes *MAT  $\alpha$ 1* e *MAT  $\alpha$ 2*. Esses genes codificam fatores de transcrição envolvidos na determinação da identidade celular, com exceção do gene *a2* que não tem sua função conhecida (Herskowitz *et al.*, 1992). O sistema de *mating-type* em *S. cerevisiae* é o sistema de acasalamento em fungos mais bem caracterizado e serve ainda de modelo operacional para outros fungos (revisado em Haber, 1998). Cada idiomorfo de *S. cerevisiae* apresenta dois genes transcritos divergentes. Em 1988, foi caracterizado molecularmente o loco *mating-type* do primeiro fungo filamentoso, os *mat A* e *mat a* de *N. crassa* (Glass *et al.*, 1988). O idiomorfo *mat a* apresenta uma seqüência específica de 3235 pb (pares de base) e apresenta um gene, o *mat a-1*, que apresenta o motivo HMG (High Mobility Group). A proteína codificada por esse gene é um fator transcricional envolvido com a regulação direta ou indiretamente de genes que conferem identidade sexual, funções de pós-fertilização e de incompatibilidade vegetativa (revisado em Glass & Kuldau, 1992; Ferreira *et al.*, 1998; Souza *et al.*, 2003). A seqüência do locos *matA* apresenta uma seqüência específica de 5301 pb e contém três genes, o *mat A-1*, o

*mat A-2* e o *mat A-3* (Glass *et al.*, 1990; Ferreira *et al.*, 1996). O gene *mat A-1* apresenta funções similares ao gene *mat a-1*, sendo um fator transcricional que também apresenta um motivo HMG de ligação ao DNA, porém esse motivo é menos conservado entre fungos que o motivo HMG de *mat a-1* (Staben e Yanofsky, 1990). Já os genes *mat A-2* e *mat A-3* não demonstraram envolvimento na incompatibilidade vegetativa, mas ambos são importantes para a produção de ascósporos resultantes do acasalamento (Ferreira *et al.*, 1998).

Um grande número de fungos ascomicetos teve, desde então, os genes *mating-type* caracterizados molecularmente (revisado em Coppin *et al.*, 1997). Utilizando-se da região contendo os motivos HMG do gene *mat a* de *N. crassa* e *MAT1-2* de *C. heterostrophus* foram desenhados iniciadores degenerados que permitiram acessar seqüências referentes ao motivo HMG de inúmeros loculoascomicetos e pirenomicetos (Arie *et al.*, 1997). Uma nomenclatura universal para os locos e genes *mating-type* foi proposta (Turgeon & Yoder, 2001) em que o loco *mating-type* seria denominado *MAT1*, e o idiomorfo correspondente ao *mat A* de *N. crassa* seria *MAT1-1*, e *MAT1-2*, o idiomorfo alternativo (que contém um único gene com o motivo HMG). Os genes seriam denominados de acordo com sua localização em cada idiomorfo, como *MAT1-1-2*, representando assim o segundo gene do idiomorfo *MAT1-1* no loco *MAT1*. No caso dos genes *mating-type* de *C. sublineolum*, a nomenclatura utilizada pelos pesquisadores que os descreveram foi *MAT1-2*, sendo esse o idiomorfo parcialmente caracterizado (Vaillancourt *et al.*, 2000).

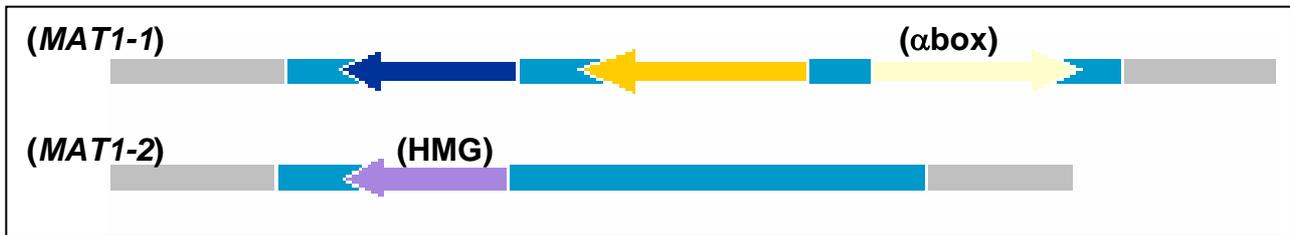


Figura 4: Esquema geral dos idiomorfos de fungos ascomicetos mostrando a direção de transcrição dos genes presentes em *MAT1-1* e *MAT1-2* e os domínios representativos para a identificação de cada idiomorfo (adaptado de Silva *et al.*, 2003)

A taxa de evolução dos genes *mating-type* tem se apresentado maior que para outros genes de fungos ascomicetos. Pöggler (1999) analisou árvores geradas com as seqüências dos genes *mating-type* (*matA-1* e *mata-1*) de fungos dos gêneros *Neurospora* e *Sordaria* em comparação com a análise da árvore gerada com seqüências do gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gpd*) e demonstrou que os genes *mating-type* evoluem mais rapidamente que o *gpd*, concluindo que os genes *mating-type* são bons candidatos para se inferir a história evolutiva dos fungos, incluindo a diferenciação de homotáticos e heterotáticos, principalmente daqueles que divergiram recentemente. Essa taxa de evolução observada para os genes *mating-type* condiz com o que acontece com as regiões sexuais de muitos eucariotos, pois estão submetidos ao mesmo tipo de pressão seletiva (Pöggeler, 1999). Embora a taxa de evolução dos genes *MAT* seja alta, a região do domínio HMG demonstrou ser bem conservada mesmo entre espécies distintas de fungos, sendo, por isso, uma região utilizada para identificação de genes *mating-type* e também análises de filogenia (Coppin, 1997). Através de análises dessa região, muitos estudos identificaram genes *mating-type* de outros fungos, como o gene *MAT* do fungo pseudo-homotático *Podospora anserina* (Debuchy &

Coppin, 1992), do fungo *Cocchiobolus heterostrophus* (Turgeon *et al.*, 1993) e *Phycomyces blakesleeanus* (Idnurm *et al.*, 2008).

#### **1.4 Genes *MAT* e as estratégias reprodutivas de *Colletotrichum***

Com o emprego de iniciadores degenerados foi possível também acessar a região HMG de um gene *mating-type* de *C. graminicola* isolado de milho (Vaillancourt *et al.*, 2000). Com essas novas seqüências, iniciadores específicos para a região HMG de *C. graminicola* de milho foram desenhados e puderam ser utilizados em estudos de *C. graminicola* isolados da gramínea *Agrostis palustris* (Chen *et al.*, 2002).

Diferentes estratégias reprodutivas podem ser usadas pelos fungos de acordo com as condições ambientais e biológicas que influenciam uma determinada população. No campo, os fungos reproduzem-se continuamente de forma vegetativa - ou assexuada - ocorrendo eventos isolados de reprodução sexuada (Leslie & Klein, 1996). Em estudos populacionais, os genes *mating-type* podem ser analisados para inferir sobre a estratégia reprodutiva adotada em uma determinada população, como foi feito no estudo de *C. graminicola* de *A. palustris*. Nesse estudo, constatou-se que não existia o gene *MAT1-1* na população. Somente o *MAT1-2*, indicado que nessa população a principal forma de reprodução possa ser a assexuada, uma vez que seria necessária a presença dos dois tipos sexuais para o acasalamento, considerando o sistema geral de reprodução dos fungos ascomicetos. No trabalho citado, foram realizadas PCR (*Polymerase Chain Reaction*) com iniciadores específicos para a região HMG do *MAT1-2* de trinta e cinco isolados. Todas as

reações resultaram numa banda de cerca de 220 pb que seria correspondente à região HMG. Dessas trinta e cinco amplificações, seis produtos de PCR foram seqüenciados e as seqüências mostraram-se similares à região HMG do *MAT1-2* de *C. graminicola* isolado de milho (Chen *et al.*, 2002). Estudos semelhantes nunca foram feitos no Brasil. Assim, a possibilidade de acessar a existência de diferentes *MAT* em *Colletotrichum* no campo se mostrou promissora para se entender as formas de reprodução deste fungo e se possível relacioná-las à variabilidade genética.

O único relato na literatura de genes *MAT1-2* de *C. sublineolum* foi o trabalho de Du *et al.* (2005) onde o idiomorfo foi identificado em nove isolados norte americanos, quatro africanos e um brasileiro. Também o estudo onde foram analisadas diversas raças de *C. graminicola* isolados da gramínea *A. palustris* apenas o idiomorfo *MAT1-2* foi detectado (Chen *et al.*, 2002). Isolados interférteis de *C. graminicola* e de *C. lindemuthianum* (teleomorfa: *G. lindemuthiana*) apresentaram somente o idiomorfo *MAT1-2* (Vaillancourt *et al.*, 2000; Rodriguez-Guerra *et al.*, 2005). Diferente do que foi sugerido antes, esses resultados parecem sugerir que o sistema de genes *mating-type* de *Colletotrichum* possa se diferenciar do principal sistema que é descrito para outros ascomicetos, ou seja, poderá ser um sistema envolvendo alelos múltiplos em um loco ou apresentar mais de um loco envolvido na reprodução, como ocorre em basidiomicetos (Vaillancourt *et al.*, 2000).

Uma idéia levantada por Chen *et al.* (2002) trata do heterotalismo desbalanceado, proposto por Wheeler em 1954 e recapitulado no trabalho de Vaillancourt *et al.* (2000). No heterotalismo desbalanceado, um acasalamento entre dois isolados auto-estéreis pode dar origem a uma progênie autofértil. Foi proposto que isso seria conseqüência da acumulação de mutações em diferentes genes que

controlam a via que leva ao homotalismo. Estudos recentes encontraram dois locos não ligados, um independente do loco *MAT*, que afetam a compatibilidade para acasalamento e que ainda estão sendo descritos por Du e colaboradores (comunicação pessoal). Esses pesquisadores descreveram dois locos envolvidos na reprodução sexuada denominados *Cfr1* e *Cfr2* que afetam funções de fertilidade e compatibilidade, respectivamente (Du, 2002; Vaillancourt *et al.*, 2000). Vaillancourt *et al.* (2000) realizou uma análise de RFLP utilizando as linhagens parentais de um acasalamento de *C. graminicola* que produziu ascósporos viáveis e 23 progênies aleatórias desse acasalamento. O DNA genômico foi digerido com *Bgl* II e hibridizado com sonda da região HMG. No padrão de bandas obtidas no perfil do RFLP verificou-se a presença de uma banda de tamanho diferente para cada linhagem parental. Na progênie analisada, nenhum isolado apresentou as duas bandas ou nenhuma banda. Os resultados sugeriram que as duas seqüências HMG eram alélicas ou ligadas.

Além da região conservada HMG, aproximadamente 1,3 Kpb correspondentes à ORF de *MAT1-2* de *C. graminicola* foram determinados por Vaillancourt e colaboradores (comunicação pessoal). Os dados *in silico* estão de acordo com uma suposta funcionalidade do gene *MAT1-2* nessa espécie (Du, 2002). Como *C. sublineolum* é uma espécie muito próxima de *C. graminicola*, um mesmo sistema de acasalamento com genes *MAT* bastante conservados é esperado para ambas as espécies.

Em 2004, um projeto que abrangia a pesquisa em biologia molecular de fungos patogênicos para plantas foi iniciado tendo como colaboradores a Profa. Adlane Vilas Boas Ferreira, do Departamento de Biologia Geral, a Profa. Maria Aparecida de Resende e o então doutorando Henrique Valério Maia, do

Departamento de Microbiologia, e o Dr. Carlos Roberto Casela, da Embrapa Milho e Sorgo de Sete Lagoas. Esse trabalho, relatado em Groenner-Penna (2005), possibilitou o acesso a um grande número de isolados de *C. sublineolum*, aproximadamente duzentos, que puderam ser analisados. Com isso, constatou-se a presença do gene *MAT1-2* em todos os isolados desse patógeno derivado do campo de experimentação de sorgo brasileiro da Embrapa Milho e Sorgo de Sete Lagoas. Semelhante ao que foi encontrado em outra localidade e espécies, não foi possível detectar o gene *MAT1-1* nessa amostragem.

Como o gene *MAT1-2* de *C. sublineolum* foi apenas parcialmente seqüenciado, a clonagem e seqüenciamento da ORF inteira seriam necessários e de grande interesse para estudos funcionais envolvendo esse loco. A ordem e variabilidade dos genes que flanqueiam o loco *MAT* também podem trazer informações importantes a respeito da evolução do gênero. Assim, foi proposto um projeto com o intuito de se aprofundar na pesquisa sobre o sistema reprodutivo de *C. sublineolum* onde o loco *MAT1-2* e possivelmente sua região flanqueadora fossem caracterizados molecularmente e esses dados pudessem ser relacionados com a variabilidade genética de isolados de diferentes regiões brasileiras através da identificação de polimorfismos relacionados a essa região. Um melhor entendimento sobre o ciclo reprodutivo do patógeno *C. sublineolum* e a utilização da reprodução sexuada como ferramenta em estudos genéticos pode fornecer grandes informações para estudos de virulência, incluindo estudos de formas de combate viáveis e formas de prevenção. Tudo isso pode ainda beneficiar estudos envolvendo melhoramento de cultivares de sorgo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Investigar componentes genéticos relacionados direta ou indiretamente ao sistema de reprodução sexuada do fungo *C. sublineolum* e sua relação com a variabilidade genética.

### 2.2 Objetivos Específicos

1. Pesquisar a presença do gene *MAT1-2* em isolados brasileiros de *C. sublineolum* ;
2. Clonar e seqüenciar o gene *MAT1-2* de *C. sublineolum*;
3. Caracterizar a região flanqueadora do gene *MAT1-2* quanto à presença de ORFs e similaridade a outras espécies de *Colletotrichum*;
4. Verificar a ocorrência de variação genética na região W1 (região flanqueadora 1) nos isolados brasileiros comparando com a variação genética encontrada para as regiões HMG do gene *MAT1-2* e ITS.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Isolados

Vinte e oito isolados, derivados de cinco campos de sorgo de diferentes localidades do Brasil, foram cedidos pelo Dr. Carlos Roberto Casela da Embrapa Milho e Sorgo. A origem desses isolados está descrita na tabela abaixo (Tabela 2):

Tabela 2: Isolados de *C. sublineolum* originados de diferentes campos de cultivo de sorgo no Brasil.

Isolado	Origem	Isolado	Origem
01	Jardinópolis-SP	146	Guaira-SP
10	Jardinópolis-SP	156	Guaira-SP
21	Jardinópolis-SP	221	Sete Lagoas-MG
32	Jardinópolis-SP	217	Sete Lagoas-MG
41	Jardinópolis-SP	192	Sete Lagoas-MG
51	Ipiaçu-MG	186	Guaira-SP
64	Ipiaçu-MG	182	Guaira-SP
72	Ipiaçu-MG	172	Guaira-SP
87	Ipiaçu-MG	06	Pelotas-RS
122	Guaira-SP	15	Pelotas-RS
127	Guaira-SP	19	Pelotas-RS
131	Guaira-SP	24	Pelotas-RS
223	Sete Lagoas-MG	169	Guaira-SP
232	Sete Lagoas-MG	176	Guaira-SP

### 3.2 Crescimento de *C. sublineolum*

Os isolados de *C. sublineolum* foram cultivados em meio de farinha de aveia-ágar (OMA) (Valério *et al.*, 2005) e mantidos sob óleo mineral (Nujol) para conservação. O micélio submetido à extração de DNA foi obtido a partir de um pequeno inóculo retirado do meio sólido e transferido para tubos de 50mL com 15mL de meio Sabouraud Líquido acrescido de tetraciclina (20µg/mL). Os isolados foram

crescidas por sete dias em estufa a 25°C. Para a obtenção de uma maior quantidade de micélio os fungos foram crescidas sob agitação (a aproximadamente 150 rpm). Após o crescimento em meio líquido, o micélio de *C. sublineolum* foi isolado por filtração do meio em papel filtro e congelado a -20°C até o momento da extração.

### 3.3 Extração do DNA

O protocolo de extração de DNA com nitrogênio líquido e fenol-clorofórmio descrito por Moller *et al.* (1992) foi utilizado. Ao final do processo o DNA foi ressuscitado em 50 µL de água Milli-Q (18,2 µΩ/cm a 25°C) e tratado com RNase (200 µg /µL) a 37°C por duas horas. Para verificar a ausência de degradação de DNA, presença de RNA, e estimar a quantidade de DNA de cada extração, 1 µL de cada amostra foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. A intensidade do DNA genômico foi comparada com o padrão de peso molecular Lambda-*Hind* III permitindo uma estimativa da concentração do DNA a ser usado na PCR. A determinação da concentração do DNA foi realizada também pela leitura da absorbância de 1 µL a 260 nm no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

### 3.4 Detecção do gene *MAT1-2* por amplificação da região HMG

Foi realizado um primeiro ensaio de PCR para verificar a presença do gene *MAT1-2* em todos os isolados disponíveis utilizando-se iniciadores específicos para a região HMG desse gene (Du *et al.*, 2005), correspondente a aproximadamente 220pb. As primeiras PCRs utilizaram as condições descritas por Arie *et al.* (1997) para reações com iniciadores inespecíficos. No entanto, como os iniciadores utilizados eram específicos para a região HMG do *MAT1-2* de *C. graminicola* (Du *et al.*, 2005) as condições de PCR precisaram ser otimizadas e foram determinados os parâmetros que se seguem: os iniciadores HMGgramF 5' CGTATATTCTCTACCGCAAGG 3' e HMGgramR 5' GGGGGTGCAGTTTGTATG 3' foram utilizados em uma PCR com 10 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.2, 0,4 µM de cada iniciador, 0,4 mM de dNTPs, 1U de *Taq* DNA polimerase e 10-20 ng de DNA genômico em uma reação de 20 µL. O programa utilizado no termociclador MJ Research PT-100 foi 95°C por 2 minutos, 94°C por 1 minuto, 50°C por 40 segundos, 72°C por 1 minuto, 72°C por 10 minutos, totalizando 35 ciclos.

Para visualizar o resultado das PCRs, 3µL de cada reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. O tamanho das bandas obtidas foi comparado com o padrão de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen), em todas as reações.

### 3.5 Amplificação do gene *MAT1-2*

A PCR foi utilizada para isolar toda a região codificante do gene *MAT1-2* de *C. sublineolum*. O uso de iniciadores específicos para *Colletotrichum* foi possível devido ao acesso a uma dissertação (Du, 2002) orientada pela Dra. L. Vaillancourt, do Department of Plant Pathology da University of Kentucky, onde a seqüência do gene *MAT1-2* de *C. graminicola* havia sido determinada a partir do seqüenciamento de um cosmídeo de 2,6kb proveniente de uma biblioteca genômica. A região que foi identificada como a ORF de *MAT1-2* possui aproximadamente 1,3 kb. Foram usados os iniciadores MATCgramF 3'CCTCTGGCATTCTCGAGGGC5' e MATCgramR 3'CATCTGGAGCAGTGA5'. A otimização da PCR foi feita para possibilitar análises subseqüentes, partindo-se das condições acima descritas.

Para otimizar a reação de PCR para a região do *MAT1-2* foi realizada uma PCR com gradiente de temperatura. Nessa reação a temperatura de anelamento variou 1°C de 50 a 62°C. Foi feita uma reação para estabelecer a concentração de DNA mais adequada. Diluições de DNA genômico foram realizadas para atingir as concentrações de 0,5 a 100 ng/reação (reação de 20 µL) nas escalas: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 50,0; 100 ng/reação. Também foi testada a concentração dos iniciadores variando de 0,2 µM a 0,8 µM. Diferentes tipos de DNA polimerases foram testadas, sendo essas: *Taq* (Phonetrria), a *Taq Platinum* (Promega) e a *Taq Hot Start* (Promega). Adjuvantes também foram testados nas reações: foi usado DMSO a 5%, BSA a 100 µg/ml e gelatina a 0,2%.

Outro teste foi realizado variando os diferentes tampões de PCR como descrito na Tabela 2 (Opti-Prime™ PCR Optimization Kit, Stratagene). Além desses, foram testados o tampão IVB e o Pré-Mix (Phoneutria, Belo Horizonte, Brazil).

Tabela 3: Tampões descritos pelo Manual do Opti-Prime™ PCR Optimization Kit da Stratagene

10 mM Tris-HCl	MgCl <sub>2</sub>	25 mM KCl	75 mM KCl
pH 8.3	1.5 mM	Tampão 1	Tampão 2
pH 8.3	3.5 mM	Tampão 3	Tampão 4
pH 8.8	1.5 mM	Tampão 5	Tampão 6
pH 8.8	3.5 mM	Tampão 7	Tampão 8
pH 9.2	1.5 mM	Tampão 9	Tampão 10
pH 9.2	3.5 mM	Tampão 11	Tampão 12

A PCR das amostras de *C. sublineolum* foi conduzida no mínimo duas vezes para cada amostra no termociclador MJ Research PT-100. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Também foi desenhado um segundo par de iniciadores para a região do *MAT1-2*, MATCgram2F 5'AATCTCTCCCCAGCGTGCT3' e MATCgram2R 5'TGGAGCTGTCATGTTTCTTTG3' cuja reação da PCR passou pelo processo de otimização.

### 3.6 Amplificação das Regiões Flanqueadoras do *MAT1-2*

Através de uma colaboração com o grupo de pesquisa do Dr. Bradley Hillman e sua orientanda Jo Anne Crouch do Department of Plant Biology and Pathology da Rutgers, The State University of New Jersey, em New Brunswick, New Jersey, foi disponibilizado um conjunto de iniciadores desenhados para regiões flanqueadoras e do próprio loco *MAT1-2* de *C. cereale*, um patógeno de gramíneas da sub-família Pooideae, designados W1, W2, seguindo até W10 e MAT72/73, como descritos (Tabela 4) e esquematizados (Figura 5) abaixo:

Tabela 4: Iniciadores das regiões flanqueadoras e do gene *MAT1-2* de *C. cereale*.

Região	Iniciadores	Tamanho esperado do fragmento (pb)
W1	W1-F 5' ATGGAGCACAAAAACGAACA 3'	948
	W1-R 5' GCGGAGCAGAGGATGTAGTC 3'	
W2	W2-F 5' GTAAGGAGGGCATGTCGGTA 3'	853
	W2-R 5' GTTGCTTGGGCTTGAAGAAG 3'	
W3	W3-F 5' TCTTTGATCCCATCGAGGTC 3'	972
	W3-R 5' GTTTACAAGCATGGCGTCCT 3'	
W4	W4-F 5' TTGTATGCTTTTGGCAGTGC 3'	752
	W4-R 5' TACACCGCCATTTGATCTGA 3'	
W5	W5-F 5' ATGCTTACCCCATCTGCATC 3'	896
	W5-R 5' GGCTGAGGCTTGAGTACCTG 3'	
W6	W6-F 5' ATAAGGCGTCTGATGGATGG 3'	998
	W6-R 5' GCCTGGATCGAAAACCTGTA 3'	
W7	W7-F 5' TACTAACTGCCGCAAGACC 3'	831
	W7-R 5' TGGAAACCGTGATACGTCAA 3'	
W8	W8-F 5' CCATCACTCAGGCGATATGA 3'	827
	W8-R 5' CGTTGCTGAAGAGGTGAACA 3'	
W9	W9-F 5' GCTTTTACTTGTGCGCCCGTA 3'	830
	W9-R 5' ATGGAGTCTTGCAGGGAGAA 3'	
W10	W10-F 5' ATCATGGGCTATCGATCCT 3'	801
	W10-R 5' GTATGGTTTGGCTCCTCGT 3'	
MAT72/73	MAT-72 5' ACGGCAAACGGCTCAGGGAGT 3'	1583
	MAT-73 5' AATGCCGAGTCCCACGAGGTTCG 3'	



Figura 5: Esquema do gene *MAT* e suas regiões flanqueadoras montado a partir de informações fornecidas por J.A. Crouch (comunicação pessoal) sobre os iniciadores desenhados para as regiões especificadas.

As condições iniciais utilizadas como ponto de partida para todas as PCR foram as mesmas utilizadas para as PCR descritas anteriormente, sendo que diversos passos para a otimização foram realizados na tentativa de se obter o amplicon específico.

### 3.7 Amplificação da Região W1

Dados preliminares (J. A. Crouch e B. Hillman, comunicação pessoal) indicaram que a seqüência flanqueadora W1 poderia ser uma boa região para se obter uma diferenciação intraespecífica dos isolados de *C. sublineolum*. Para tanto, essa região foi amplificada em todos os isolados nas seguintes condições: 10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 75 mM KCl, pH 9,2, 0,2% de gelatina, 0,4mM de cada iniciador, 50ng de DNA genômico e 1U de *Taq* DNA polimerase. A temperatura de anelamento utilizada foi de 55°C.

### 3.8 Amplificação da Região ITS

A região do operon de rDNA, que inclui a região espaçadora intergênica 1 (ITS1), a região 5,8S e a região espaçadora intergênica 2 (ITS2), é muito utilizada em estudos de identificação e diferenciação inter e intraespecífica (Buchan *et al.*, 2003) e é denominada ITS. Por isso, a análise da região ITS foi adotada neste trabalho como parâmetro para comparar a resolução das análises obtidas com as regiões HMG e W1. Os iniciadores específicos para ascomicetos ITS1F (5' CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA 3') e ITS4A (5' CGCCGTTACTGGGGCAATCCCTG 3') (Larena *et al.*, 1999) foram utilizados para a PCR com as seguintes condições: 10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 75 mM KCl, pH 9,2, 0,2% de gelatina, 0,4mM de cada iniciador, 30ng de DNA genômico e 1U de *Taq* DNA polimerase. Utilizou-se a temperatura de anelamento de 55°C.

### 3.9 Purificação dos Amplicons de Interesse do Gel de Agarose

Devido à presença de bandas inespecíficas em algumas PCRs, o método de purificação *freeze/thaw* com agarose *low-melting* (Kuriena & Scofieldb, 2002) foi utilizado para a obtenção do produto específico da PCR. As bandas de tamanho esperado foram extraídas do gel de agarose após a eletroforese e então utilizadas para a clonagem ou seqüenciamento.

### 3.10 Clonagem das regiões flanqueadoras e do gene *MAT1-2*

Devido à presença de amplicons inespecíficos nas PCRs das regiões flanqueadoras mesmo após vários passos de otimização, os produtos de PCR que apresentavam um tamanho que coincidia com aquele esperado foram clonados no vetor pCR2.1-TA da Invitrogen.

Com o intuito de se isolar todo o gene *MAT1-2* em uma região de aproximadamente 1,4 kb foram utilizados os iniciadores MATCgramR e MATCgramF. Após a PCR, o produto de tamanho esperado foi purificado e ligado ao vetor pCR2.1-TA da Invitrogen. Para se certificar da ligação do *MAT1-2* ao vetor pCR2.1-TOPO, uma PCR de colônia (Marcus, 2005) utilizando os iniciadores M13F (-20) e M13R foi conduzida. O vetor com o inserto foi clonado através de eletroporação da *Escherichia coli* TOP10 ou DH5 $\alpha$  eletrocompetente. As demais instruções foram seguidas de acordo com as especificações do fabricante.

### 3.11 Seqüenciamento

O seqüenciamento da região HMG amplificada, das regiões flanqueadoras, da região ITS e do gene *MAT1-2* para as análises e comparação de seqüências foi realizado. Isso permitiu, então, que um estudo comparativo fosse feito com as demais seqüências dessas regiões já depositadas em bancos públicos ou disponibilizadas para o nosso grupo de pesquisa por meio de comunicação pessoal, principalmente entre fungos do gênero *Colletotrichum*, como *C. graminicola* e *C. cereale*. Os produtos da PCR foram escolhidos para o seqüenciamento e então

purificados pelo método de polietilenoglicol e etanol (Paithankar and Prasad, 1991). As reações de seqüenciamento foram conduzidas utilizando os iniciadores M13 direto e reverso e o DYEnamic ET Terminator Kit (Amersham Pharmacia Biotech), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante com as temperaturas de anelamento adequadas a cada iniciador. Para cobrir toda a seqüência a ser determinada foram utilizados os iniciadores diretos e reversos da região HMG do *MAT1-2* (Du *et al.*, 2005) assim como os iniciadores MATCgramF/R. Após a reação de seqüenciamento, o produto foi purificado através do protocolo de precipitação padrão com etanol/acetato de amônio. O seqüenciamento foi realizado em Megabace 1000 automatic DNA sequencer (Amersham Pharmacia Biotech). Os programas PHRED e PHRAP foram utilizados através dos sítios da internet onde se encontram o programa Electropherogram Quality Analysis da Universidade Católica de Brasília (UCB) e da Universidade de Brasília (UnB) nos endereços <http://www.bioinformatica.ucb.br/electro.html> e <https://www.biomol.unb.br/phph/> respectivamente. Nesse último sítio, as seqüências de qualidade são geradas pelo programa Lucy (Sequence Quality Trimming and Vector Removal). Buscas com o programa Blast (Altschul *et al.*, 1990) foram realizadas contra o banco de dados do NCBI/GenBank. Outras ferramentas de bioinformática foram utilizadas para análises de similaridade entre as seqüências obtidas, como o MultiAlin (Corpet, 1988) e o programa de alinhamento do MEGA versão 4 (Tamura *et al.*, 2007) e BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999). Árvores foram geradas para melhor interpretação dos dados no programa MEGA versão 4 (Tamura *et al.*, 2007) utilizando o algoritmo Neighbor-Joining (NJ) com 1000 repetições de Bootstrap. Só foram mostrados valores de bootstrap superiores a 50%.

## 4 RESULTADOS

#### 4.1 Amplificação da Região HMG e Detecção do Gene *MAT1-2*

O loco *mating-type* é imprescindível para a reprodução sexuada dos fungos. A reprodução sexuada depende diretamente da regulação exercida pelos genes codificados por esse loco, pois eles estão envolvidos na ativação da transcrição de inúmeros genes como, por exemplo, os de feromônios e receptores de feromônios envolvidos no reconhecimento de pares de acasalamento (Kronstad & Staben, 1997). Por isso, tornou-se importante o conhecimento dessa região para se analisar a seqüência gênica e protéica de *MAT1-2*, gerando assim perspectivas de se esclarecer pontos sobre a capacidade de *C. sublineolum* exercer a reprodução sexuada com sucesso.

No trabalho anteriormente realizado por Groenner-Penna (2005), foi detectada a região HMG de *MAT1-2* de 200 isolados pela PCR dessa região e concluído que todos os isolados apresentavam o tipo sexual *MAT1-2*. Neste trabalho, o gene de 28 novos isolados de diferentes regiões do Brasil foram usados para a detecção da região HMG.

A PCR para a região HMG do *MAT1-2* foi, no trabalho anterior, conduzida de acordo com as condições descritas por Arie e colaboradores (1997) que usou iniciadores degenerados. No entanto, utilizamos os iniciadores descritos por Du e colaboradores (2005), e por isso foi necessária a otimização das condições das PCRs. A reação padronizada utilizou Tampão de PCR 1x (10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 75 mM KCl, pH 9.2), 0,2% de gelatina, 0,4mM de cada iniciador, 50ng de DNA genômico e 1U de *Taq* DNA polimerase, com a temperatura de anelamento de 55°C. Todos os 28 novos isolados apresentaram a amplificação dessa região. O resultado da PCR, com a amplificação esperada, é mostrado abaixo na Figura 6,

sendo o tamanho do produto da PCR de aproximadamente 220 pb. Esse experimento sugeriu, novamente, a possibilidade que todas as populações de *C. sublineolum* possuam o idiomorfo *MAT1-2*. A partir desses dados, o próximo passo foi conhecer todo o gene *Mat1-2*, através da clonagem e seqüenciamento, assim como do uso da região HMG como ferramenta para se estudar as relações filogenéticas entre os isolados de *C. sublineolum*, outras espécies de *Colletotrichum* e diferentes ascomicetos.

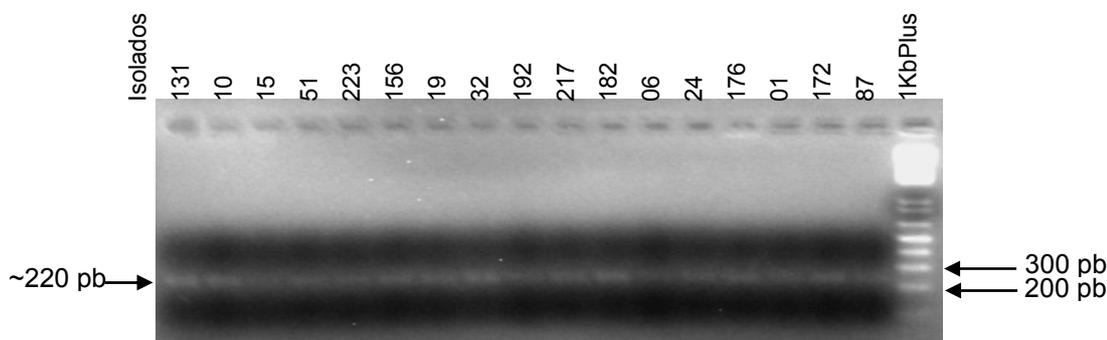


Figura 6: Gel mostrando bandas referentes à amplificação da região HMG do *MAT1-2* visualizadas em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo sob luz UV. Acima da foto estão discriminados os isolados testados e ao lado o tamanho do amplicon e das bandas do Marcador de Peso Molecular 1Kb Plus (Invitrogen) mais próximas.

## 4.2 Amplificação do Gene *MAT1-2*

No intuito de se isolar todo o gene *MAT1-2* de *C. sublineolum* foram desenhados iniciadores baseados na seqüência de um cosmídeo no qual foi seqüenciado todo o gene *MAT1-2* de *C. graminicola*, descrito na dissertação de M. Du apresentada na University of Kentucky (Du, 2002).

Como descrito em Materiais e Métodos (Item 3.5), foram realizados alguns passos para a padronização da PCR da região do *MAT1-2*. A foto da Figura 7

mostra o resultado da primeira PCR para a região utilizando os iniciadores MATCgramF/R. Nessa primeira reação não foi possível a visualização da banda esperada para o amplicon de 1400 pb referente à toda região de *MAT1-2*. Em vez disso, uma série de bandas inespecíficas foram obtidas, demonstrando que otimizações deveriam ser feitas para se isolar a banda esperada, caso os iniciadores baseados em seqüência de *C. graminicola* não fossem espécie-específicos.

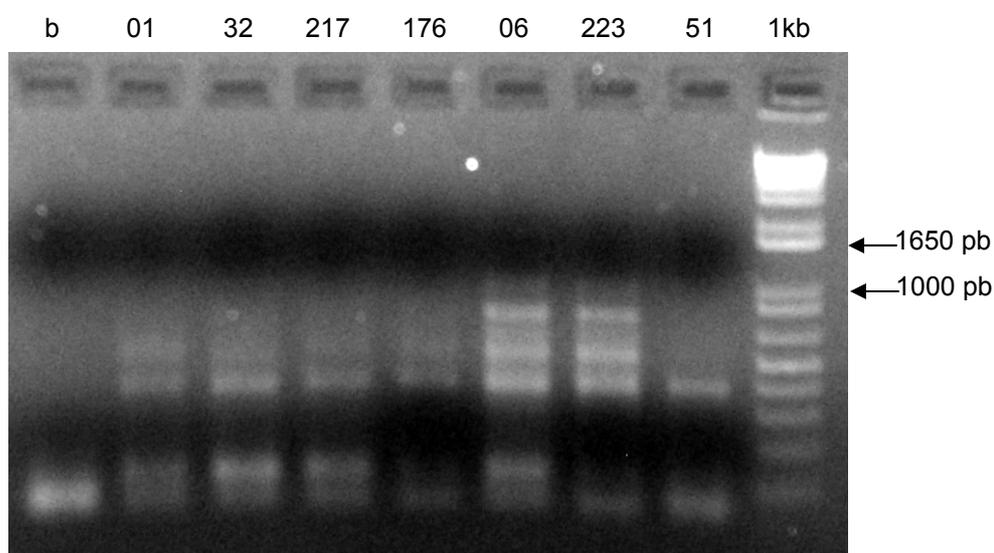


Figura 7: Gel mostrando bandas referentes à PCR com os iniciadores MATCgramF/R visualizadas em gel de agarose 1% corados com brometo de etídeo sob luz UV.

Assim, tentando-se obter a amplificação da região desejada foram realizados vários teste incluindo PCR com gradiente de temperatura de anelamento, variações nas concentrações do DNA genômico, uso de diferentes tampões e iniciadores.

Na PCR com gradiente de temperatura de anelamento, variou-se 1°C a partir de 51°C até 59°C. Foram utilizados os DNAs genômicos de apenas dois isolados, 06 e 223. Somente na reação realizada com a temperatura de anelamento de 52°C e com o DNA do isolado 06 foi visualizada a banda de 1400 pb correspondente ao amplicon desejado como mostrado na Figura 8.

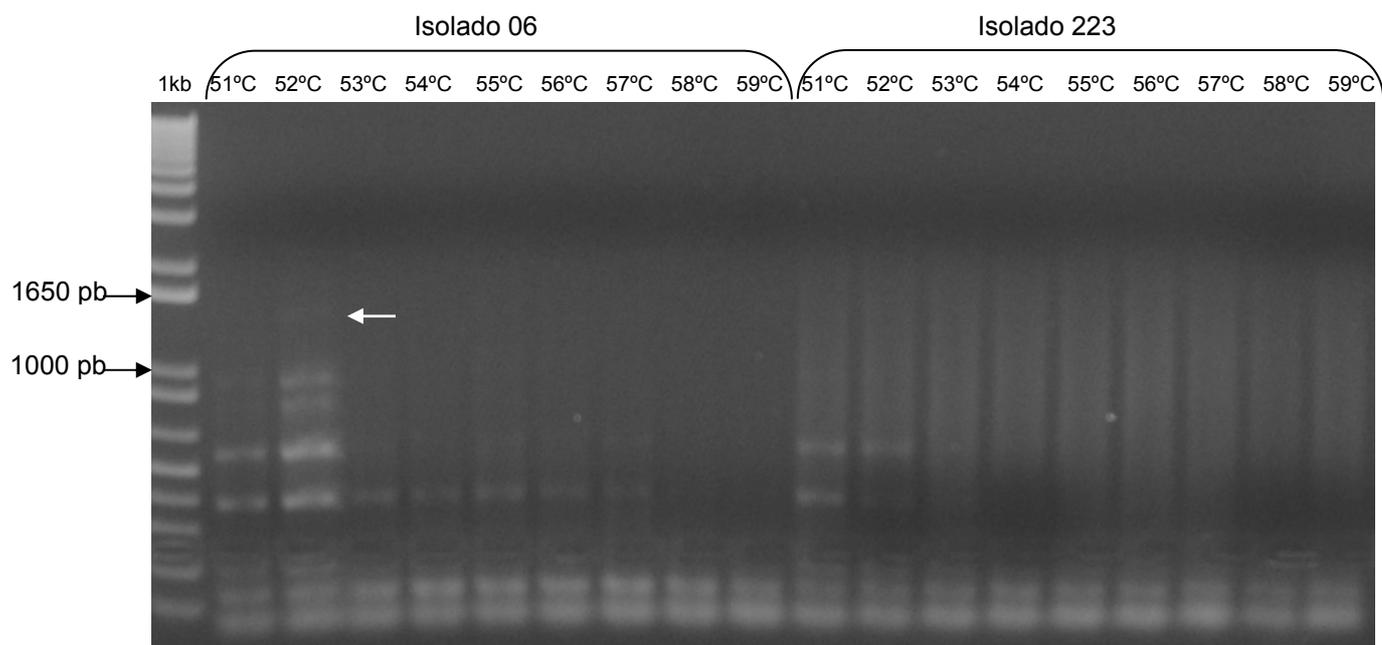


Figura 8: Gel mostrando bandas obtidas pela amplificação do *MAT1-2* na PCR gradiente com os iniciadores MATCgramF/R, variando a temperatura de anelamento de 51°C a 59°C e utilizando os DNAs dos isolados 06 e 223, visualizadas em gel de agarose 1% corados com brometo de etídeo sob luz UV. Seta branca: amplicon do tamanho esperado de 1400 pb.

Para se determinar a concentração de DNA mais adequada à reação, foi realizada uma PCR com diluições de DNA genômico. Foi determinado que o DNA seria utilizado em uma concentração de 50ng/reação, pois nessa concentração a banda de interesse foi obtida embora ainda estivessem presentes bandas inespecíficas.

Para que a PCR apresentasse uma maior especificidade, foram testados diferentes tampões na reação. Foram utilizados doze tampões descritos no Manual do Opti-Prime™ PCR Optimization (Stratagene). Como pode ser analisado na figura abaixo (Figura 9), a banda que representaria o amplicon desejado foi obtida com os tampões 6, 8 e 10. Porém, houve ainda a ocorrência de bandas inespecíficas.

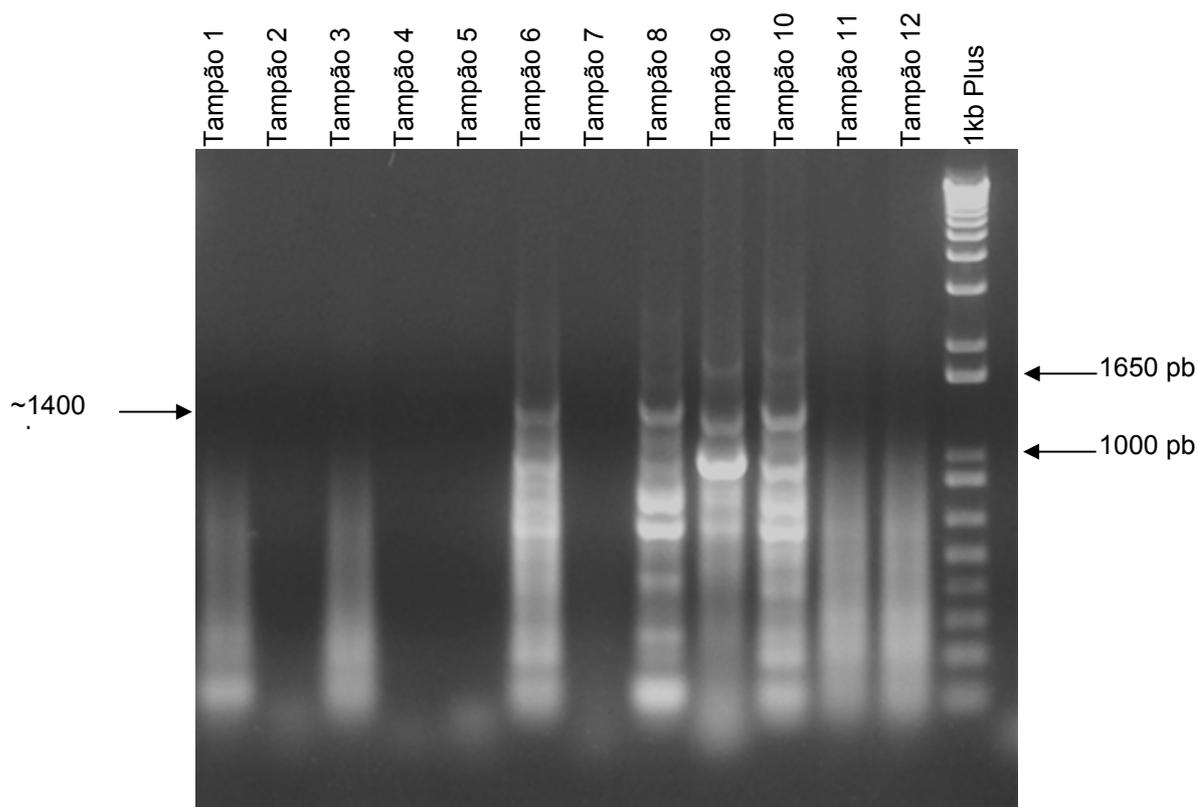


Figura 9: Gel mostrando bandas obtidas pela amplificação do *MAT1-2* em teste de uma PCR com diferentes tampões, tampão 1 ao 12 de acordo com o kit Opti-Prime™ PCR Optimization (Stratagene) e utilizando o DNA do isolado 06, visualizadas em gel de agarose 1% corados com brometo de etídeo sob luz UV.

Constatando-se que seria muito difícil a obtenção de uma banda única a partir da PCR com os iniciadores MATCgramF/R e objetivando-se amplificar todo o gene *MAT1-2* sem a interferência de amplificações inespecíficas, foi desenhado outro par de iniciadores, MATCgram2F/R, com base na mesma seqüência do cosmídeo do trabalho de Du (2002). Esses iniciadores abrangem uma região maior que os iniciadores MATCgramF/R (de aproximadamente 1600 pb), sendo então externos a estes. Esses novos iniciadores passaram pelo mesmo processo de otimização da PCR.

Inicialmente testou-se a quantidade de DNA na reação de PCR usando uma diluição seriada do DNA de 100 a 5 ng/reação (20  $\mu$ L). Porém, em nenhuma dessas

condições a banda de 1600 pb foi nitidamente observada, como mostra a figura abaixo (Figura 10).

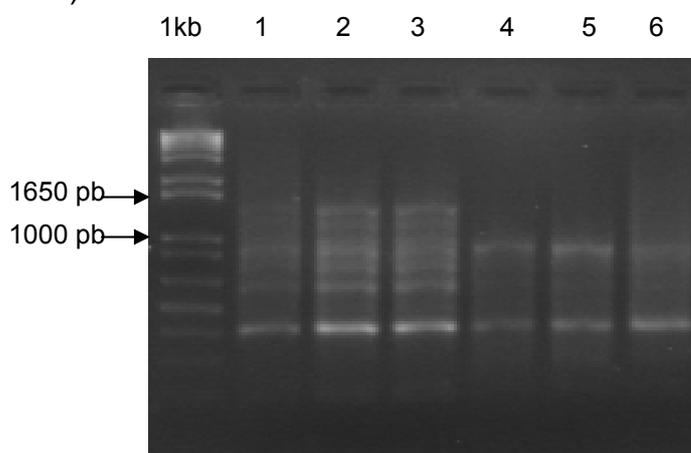


Figura 10: Gel mostrando bandas obtidas pela amplificação do *MAT1-2* em PCR que testou a quantidade de DNA do isolado 06 a 100ng (canaleta 1), 50ng (canaleta 2), 30ng (canaleta 3), 20ng (canaleta 4), 10ng (canaleta 5), e 5ng/reação (canaleta 6), visualizadas em gel de agarose 1% corados com brometo de etídeo sob luz UV.

Com esse resultado, a PCR passou a ser conduzida com DNA a 50ng/reação(20 $\mu$ L). Foram testados vários tampões nessas condições e o único que levou à obtenção da uma banda de aproximadamente 1600 pb foi Pré-mix da Phoneutria, como retratado na Figura 11.

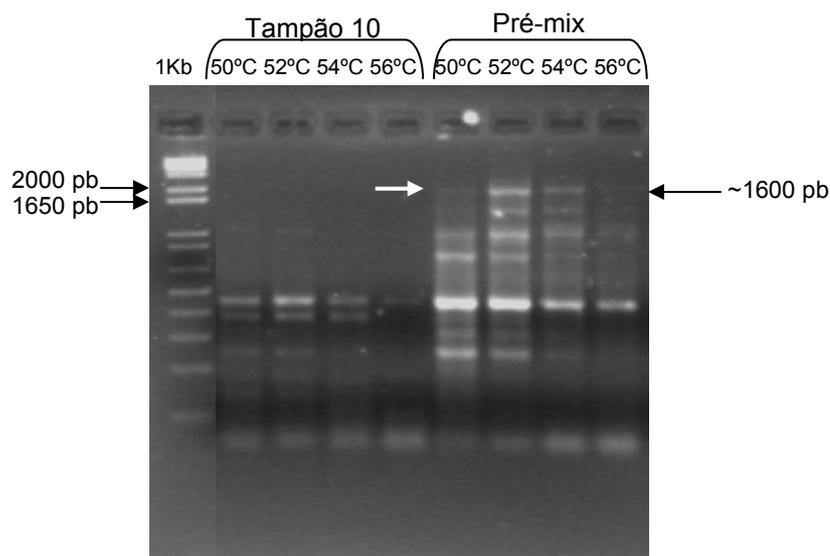


Figura 11: Gel mostrando bandas obtidas pela amplificação do *MAT1-2* em PCR com diferentes tampões e utilizando o DNA do isolado 06 de *C. sublineolum*, visualizadas em gel de agarose 1% corados com brometo de etídeo sob luz UV. Canaletas 1-4: PCR com tampão 10 do kit Opti-Prime™ PCR Optimization (Stratagene) e com temperatura de anelamento de 50°C, 52°C, 54°C e 56°C, respectivamente. Canaletas 5-8: PCR com o Pré-mix Phoneutria e com temperatura de anelamento de 50°C, 52°C, 54°C e 56°C, respectivamente. Seta branca: amplicon do tamanho esperado, 1600 pb, referente à amplificação do *MAT1-2*.

Para se certificar do funcionamento dos iniciadores que foram desenhados com base na seqüência do *MAT1-2* de *C. graminicola*, os DNAs de quatro diferentes isolados desse organismo foram utilizados como controle para a PCR. O resultado abaixo (Figura 12) mostra que as amplificações utilizando os DNAs controles de isolados de *C. graminicola* apresentaram a amplificação de tamanho esperado para os iniciadores MATCgramF/R (1400 pb), porém com amplificação inespecífica nas reações com os quatro DNAs controles. Para os iniciadores MATCgram2F/R era esperada a banda de 1600 pb, mas a reação com dois DNAs controles apresentaram bandas inespecíficas. No entanto, utilizando-se os DNAs de *C. sublineolum* foram obtidas amplificações com o tamanho próximo mas maior que o esperado (1600 pb), além das amplificações inespecíficas.

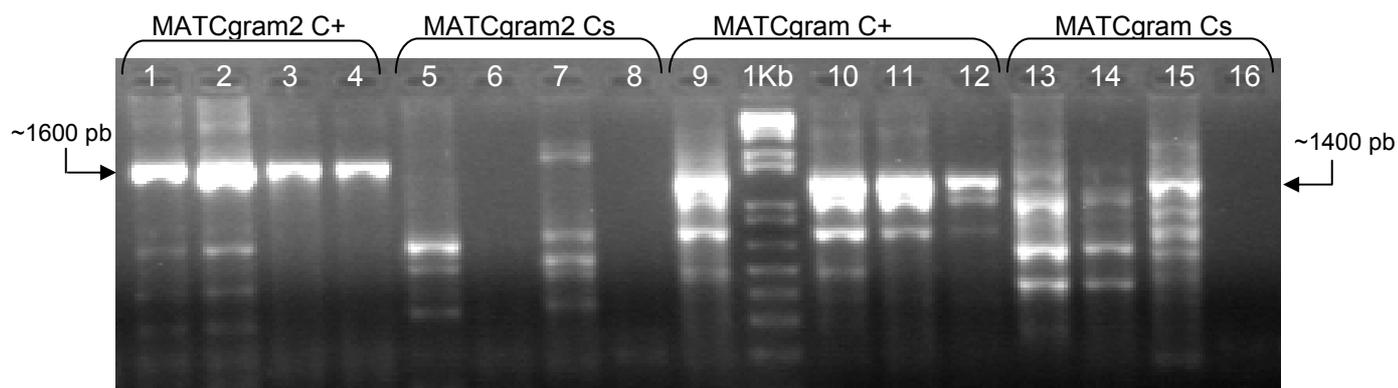


Figura 12: Bandas obtidas na PCR para amplificação do *MAT1-2* visualizadas em gel de agarose 1% corados com brometo de etídeo sob luz UV. Canaletas 1-8: PCR com o par de iniciadores MATCgram2; canaletas 1-4: amostras de *C. graminicola* 1, 2, 3 e 4; Canaletas 5-8: isolados 223, 176, 06 e 51 de *C. sublineolum*. Canaletas 9-16: PCR com o par de iniciadores MATCgram; canaletas 9-12: amostras de *C. graminicola* 1, 2, 3 e 4; Canaletas 13-16: isolados 223, 176, 06 e 51 *C. sublineolum*.

Embora as amplificações obtidas para os isolados de *C. sublineolum* não terem sido exatamente do tamanho das amplificações obtidas para os controles, as bandas com tamanho aproximado foram purificadas e clonadas para o seqüenciamento.

Outra tentativa realizada para se obter a seqüência de todo o gene *MAT1-2* foi a realização de duas reações de PCR: uma com os iniciadores MATCgramF e HMGCgR e outra reação com os iniciadores MATCgramR e HMGCgF. Era esperada para a primeira reação uma amplificação de aproximadamente 895 pb e para a segunda uma de 711 pb. Porém, nessa PCR também houve amplificação inespecífica. A primeira reação produziu duas bandas de aproximadamente 1200 pb e 850 pb. A segunda produziu três bandas de 1400 pb, 1000 pb e 700 pb aproximadamente. Essas cinco bandas também foram purificadas e clonadas para o seqüenciamento (resultado não indicado).

### 4.3 Seqüenciamento do Gene *MAT1-2*

Através do seqüenciamento de amplicons obtidos pelo uso dos iniciadores descritos no item acima, foi obtida a seqüência do gene *MAT1-2* de *C. sublineolum* (Figura 13). Os bancos de dados públicos de seqüências de DNA têm registradas apenas as seqüências da região HMG do gene *MAT1-2* de *C. sublineolum*, sendo este portanto o primeiro relato da determinação da seqüência de *MAT1-2*. No entanto, é do nosso conhecimento que a seqüência de isolados americanos foi determinada, devido a troca de informações informais do nosso grupo com o do Dr. B. Hillman da Rutgers University. A seqüência final resultou do alinhamento de no mínimo quatro seqüências obtidas de reações com cada combinação dos iniciadores: MATCgramF, MATCgramR, HMGF e MAT-73, e de seqüências com o DNA dos isolados 06, 24 e 176. Foi obtida então uma seqüência de 1597 pb, sendo apenas 36 pb antecedentes ao códon de início da tradução (ATG), 842 pb referente à ORF do *MAT1-2*. Nesta ORF foram identificados três éxons de 195 pb, 315 pb e 204 pb, e dois íntrons de 70 pb e 55 pb, como mostrado no alinhamento abaixo (Figura 13), que traz também a seqüência protéica predita para essa ORF identificada. Os íntrons e éxons foram determinados através da identificação de sítios de *splicing* conservados. Essa proteína predita teria 238 aminoácidos e a região HMG compreende os aminoácidos 149 a 203.



A seqüência do *MAT1-2* de *C. sublineolum*, cuja ORF foi identificada na região compreendida entre as bases 773 e 1620, foi alinhada às seqüências do *MAT1-2* de *C. graminicola* (Vaillancourt, comunicação pessoal) e *C. cereale* (Crouch, comunicação pessoal). Nesse alinhamento pode ser percebida uma grande similaridade entre as seqüências, principalmente na região que compreende a ORF de *MAT1-2*, incluindo aí a região HMG que começa na base 1292 e termina na 1517. À jusante da ORF pode ser encontrado um grande gap de 31 pb que ocorre apenas para *C. sublineolum* e pode ser uma peculiaridade que diferencia essa espécie de *C. graminicola* e *C. cereale*. O aumento das diferenças nas seqüências de uma espécie em comparação com as outras fora da ORF de *MAT1-2* pode respaldar a necessidade da otimização dos iniciadores desenhados com base nas seqüências das outras espécies de *Colletotrichum* para ser utilizados nas ampliações das regiões de *C. sublineolum*.



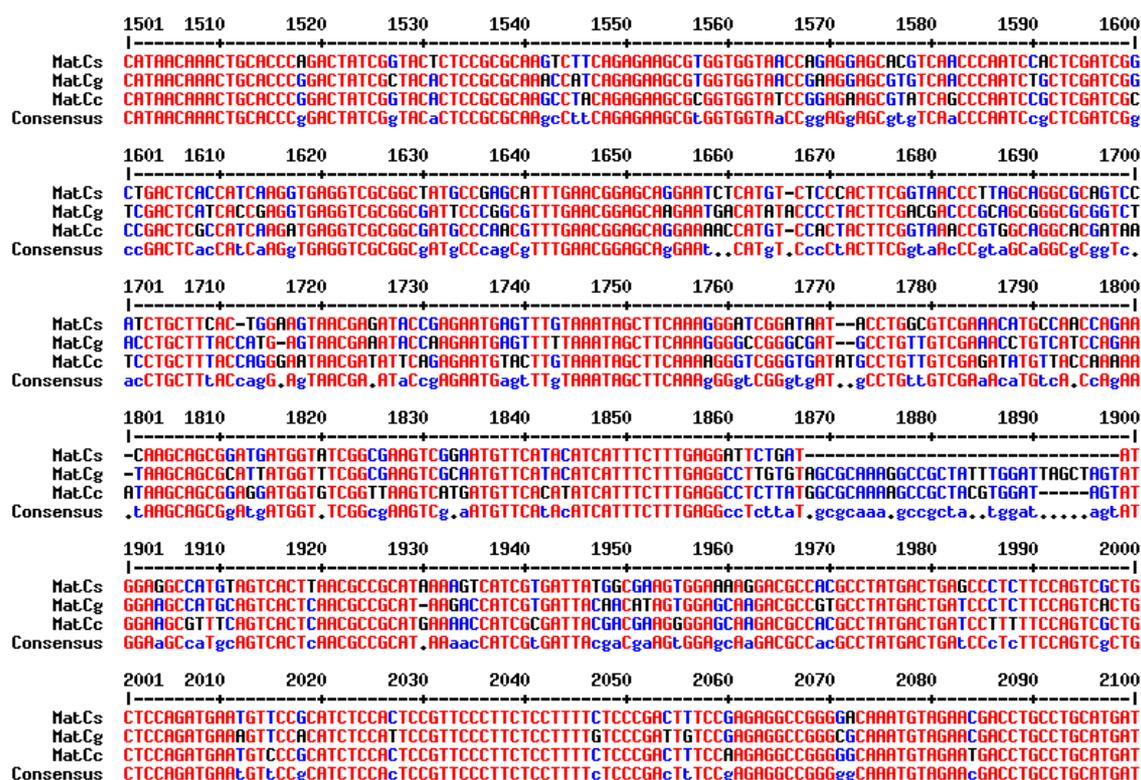


Figura 14: Alinhamento das seqüências do MAT1-2 de *C. sublineolum* (Cs), *C. graminicola* (Cg) e *C. cereale* (Cc). Realizado no programa MultiAlin (Corpet, 1988). Em vermelho as bases comuns para as três espécies, em azul as bases comuns para duas espécies, em preto bases singulares para as três espécies e (-) representa *gap* na seqüência. Abaixo de cada alinhamento é mostrada a seqüência consenso para as três espécies.

As seqüências protéicas de MAT1-2 de *C. sublineolum* e *C. graminicola* obtidas foram alinhadas no programa ClustalX2.0.3. Esse alinhamento mostrou a grande similaridade entre as seqüências de aminoácidos, 90,38%. Sendo que 5,02% (12 de 238 aminoácidos) representam substituições por aminoácidos com características químicas semelhantes, o que acarretaria uma menor possibilidade de diferença estrutural e funcional da proteína. A região HMG encontra-se na posição de 149 a 203. Dentro dessa região há apenas uma diferença de *C. sublineolum* para *C. graminicola*, a posição 156 há a substituição de uma histidina por uma glutamina o que provavelmente não deve causar grandes variações na estrutura terciária da proteína.

pMatCs	***** MALIFNPGKIVRRNIDPTQVHPEILRIVMRILDLHLNAFDSTIAVPGNDYTAFGEEGRLLMAMRMGRVLRKSVMWVKDGI
pMatCg	***** MALIFNPGKIVARNIDPTQVHPEILRIVMRILDLHLNAFESTIAVSGNDYTAFGEEGRLFMAMQMGRLRKSVMWVKDGI
pMatCs	***** ETNSNRWPLGSCDRFITGPQMIVSVNGIADVRRPPPHFLEDAAEATTHRANTPEREIKVPRSPKAFILYRKDRQAQVKQ
pMatCg	***** DENSNRWLLGPCDRFITGPHMIVSVNGIADVRRPPPQFLEAAEATTHRVTPEREIKVPRPPNAFILYRKDRQAQVKK
pMatCs	***** MDPQIQNKGISQLLGKAWNAESHEVREKXRALAKAYKERHNKLHPDYRYSPRKSSSEKRGGRSTSTQSTRSADSPSR
pMatCg	***** MDPQIQNKGISQLLGKAWNAESHEVREKXRALAKAYKERHNKLHPDYRYTPRKPSEKRGGRSSVSTQSTRSADSPSR

Figura 15: Alinhamento das seqüências protéicas de 238 aminoácidos referentes à *MAT1-2* de *C. sublineolum* e *C. graminicola*, realizado no programa ClustalX2.0.3, utilizando a matriz pam120 com os parâmetros *gap opening* e *gap extension* de 11 e 4 respectivamente. (\*): Aminoácido conservado, (:): substituição por aminoácidos com características químicas similares e (.) indica substituição neutra de aminoácidos, as cores representam grupos de aminoácidos estabelecidos da seguinte forma: Laranja: GPST, Vermelho: HKR, Azul: FWY, Verde: ILMV.

#### 4.4 Estudo das Regiões Flanqueadoras de *MAT1-2*

Foram necessários vários passos para otimizar a reação de amplificação com os iniciadores recebidos através da colaboração com os pesquisadores Jo Anne Crouch e Dr. Bradley Hillman. Segundo eles, apenas as reações para os pares de iniciadores referentes ao *MAT* e à *W1* estavam otimizadas para *C. cereale* e nenhum deles havia sido otimizado para *C. sublineolum*. Para otimizar a reação de PCR para as regiões flanqueadoras foi realizada PCR com gradiente de temperatura para cada par de iniciadores, assim como uma reação para estabelecer a concentração de DNA mais adequada. Reações com adjuvantes também foram testados nas reações: foi usado DMSO a 5%, a BSA a 100 µg/ml e gelatina a 0,2%. A melhor condição foi estabelecida com a temperatura de anelamento de 55°C, com o tampão 10 do Opti-Prime™ PCR Optimization Kit da

Stratagene, com 50ng de DNA genômico por reação (20 $\mu$ L) e com o uso da gelatina a 0,2% como adjuvante. Porém, bandas inespecíficas continuaram presentes e em algumas reações não foi possível obter o produto do tamanho esperado.

Na Figura 16 estão representados os produtos das ampliações das regiões W1 e W2 que deveriam corresponder a bandas de 948 pb e 853 pb, respectivamente. O fragmento gerado com os iniciadores da região W1, por apresentar o tamanho esperado, foi então submetido à clonagem e seqüenciamento.

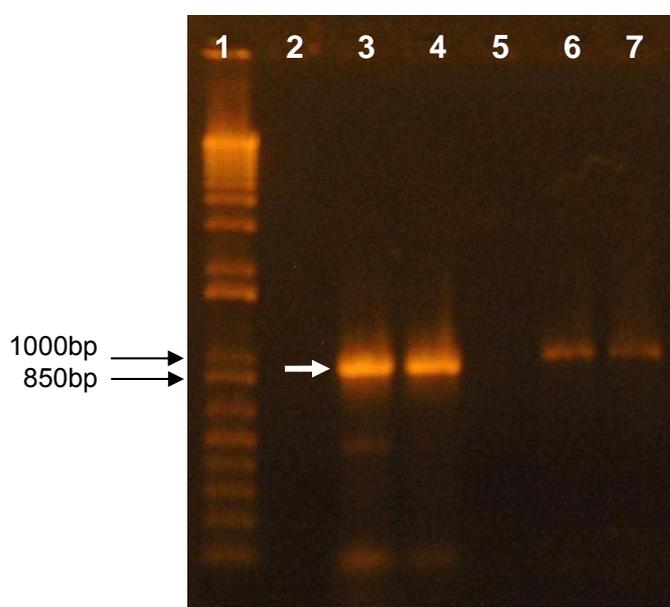


Figura 16: Gel mostrando bandas referentes à amplificação das regiões flanqueadoras W1 e W2 do *MAT1-2* visualizadas em gel de agarose 1% corados com brometo de etídeo sob luz UV. 1. Marcador de Peso Molecular 1Kb Plus (Invitrogen); 2. branco W1; 3. W1 do Isolado 24; 4. W1 do Isolado 06; 5. branco W2; 6. W2 do Isolado 24; 7. W2 do Isolado 06. Seta branca: Amplicon de tamanho correspondente ao esperado.

A Figura 17 mostra os produtos das PCRs para as regiões W3 (972 pb), W4 (752 pb) e W5 (896 pb). Com esses pares de iniciadores houve amplificação inespecífica. Ainda assim, das três regiões, uma banda de tamanho esperado (indicada na figura) com os iniciadores W3 foi clonada e seqüenciada. As demais

reações não produziram bandas com o tamanho esperado mesmo depois de muitas tentativas de otimização.

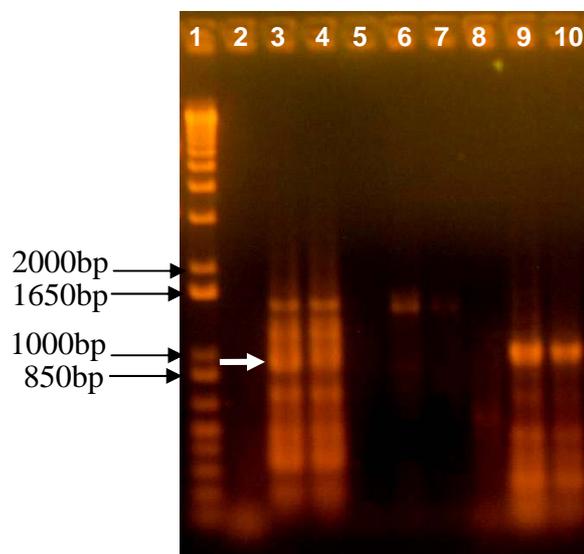


Figura 17: Bandas referentes à amplificação das regiões flangeadoras W3, W4 e W5 do *MAT1-2* visualizadas em gel de agarose 1% corados com brometo de etídeo sob luz UV. 1. Marcador de Peso Molecular 1Kb Plus (Invitrogen); 2. branco W3; 3. W3 do Isolado 24; 4. W3 do Isolado 06; 5. branco W4; 6. W4 do Isolado 24; 7. W4 do Isolado 06; 8. branco W5; 9. W5 do Isolado 24; 10. W5 do Isolado 06. Seta branca: Amplicon de tamanho correspondente ao esperado.

As reações com iniciadores das regiões W6, W7 e W8 também produziram bandas inespecíficas. Um gel com os produtos das amplificações das regiões W6, W7 e W8, está representado na Figura 18. A reação de W6 que deveriam resultar em bandas de 998 pb, não produziu amplificação alguma. Produtos de tamanhos esperados ocorreram apenas para W7 e W8, de aproximadamente 800 pb. Os produtos de W7 e W8 foram clonados e seqüenciados.

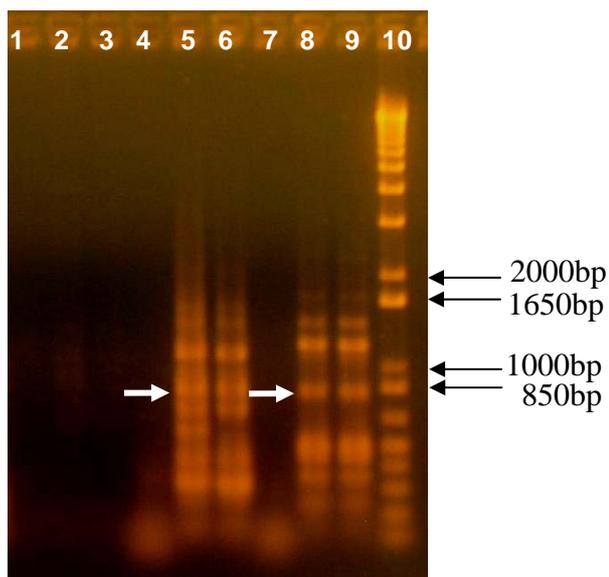


Figura 18: Bandas referentes à amplificação das regiões flangeadoras W6, W7 e W8 do *MAT1-2* visualizadas em gel de agarose 1% corados com brometo de etídeo sob luz UV. 1. branco W6; 2. W6 do Isolado 24; 3. W6 do Isolado 06; 4. branco W7; 5. W7 do Isolado 24; 6. W7 do Isolado 06; 7. branco W8; 8. W8 do Isolado 24; 9. W8 do Isolado 06; 10. Marcador de Peso Molecular 1Kb Plus (Invitrogen);. Seta branca: Amplicon de tamanho correspondente ao esperado.

Os iniciadores das duas últimas regiões que foram amplificadas - W9 (830 pb) e W10 (801 pb) - também produziram bandas inespecíficas (Figura 19). Somente a PCR para a região W10 resultou em uma amplificação com tamanho próximo do que era esperado. A banda foi isolada do gel, purificada, e então foi clonada e o DNA seqüenciado.

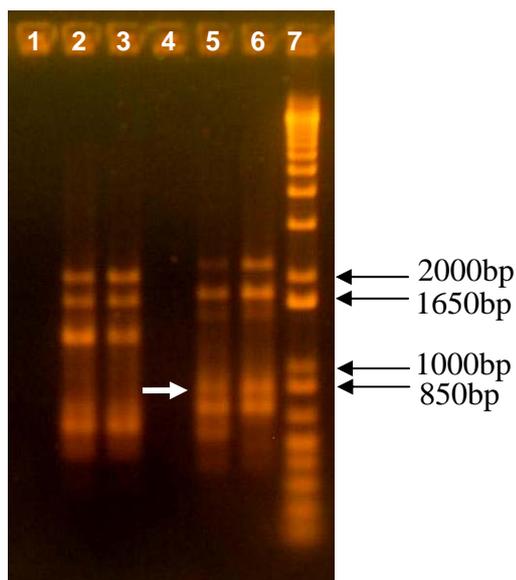


Figura 19: Bandas referentes à amplificação das regiões flangeadoras W9 e W10 do *MAT1-2* visualizadas em gel de agarose 1% corados com brometo de etídeo sob luz UV. 1. branco W9; 2. W9 do Isolado 24; 3. W9 do Isolado 06; 4. branco W10; 5. W10 do Isolado 24; 6. W10 do Isolado 06; 7. Marcador de Peso Molecular 1Kb Plus (Invitrogen);. Seta branca: Amplicon de tamanho correspondente ao esperado.

A banda referente aos produtos da PCR para algumas regiões flangeadoras foi purificada do gel de agarose, e o DNA foi clonado e seqüenciado, como é o caso dos amplicons de W1, W3, W7, W8 e W10. Excetuando-se a região W1, que será tratada com maiores detalhes posteriormente, as seqüências obtidas para W3, W7, W8 e W10 não apresentaram similaridade com nenhuma seqüência do Genbank e não permitiram nenhum tipo de sobreposição na tentativa de se formar algum contig. Essa dificuldade na obtenção de bandas únicas pode ser explicada pelo fato da metodologia adotada neste projeto ser diferente da adotada por Crouch na obtenção de seqüências das regiões flangeadoras do *MAT1-2* de *C. cereale*, pois essa pesquisadora realizou as PCRs utilizando como molde um cosmídeo e não o DNA genômico que pode trazer à PCR maiores complicações como foi o caso do aparecimento de bandas inespecíficas. Além disso, o organismo estudado nesse

projeto, *C. sublineolum*, é de espécie distinta da que serviu como base para o desenho dos iniciadores, o *C. cereale*.

#### **4.5 Análise da Variabilidade Genética de *C. sublineolum***

A variabilidade genética pode indiretamente ser uma evidência para reprodução sexual, indicando, por exemplo, possíveis pares para acasalamento. A possibilidade de se usar genes com diferentes pressões seletivas se apresentou como uma boa oportunidade para que fossem analisados os isolados brasileiros de *C. sublineolum* e para que assim se pudesse inferir sobre a estrutura genética dessas populações. A descoberta da região W1 (Crouch, comunicação pessoal) e a indicação da boa resolução para se diferenciar os isolados de *C. cereale* abriu a possibilidade de se usar a região W1 como uma ferramenta de análise da variabilidade genética também em *C. sublineolum*. A região do rDNA (incluindo as ITS) resulta na caracterização dos isolados até na classificação da espécie. Essa região é amplamente utilizada em estudos da diversidade de comunidades de solos e de identificação e diferenciação de fungos patogênicos (Anderson & Cairney, 2004; Du *et al.*, 2005). Já a região HMG do gene *MAT 1-2* mostrou maior resolução que a região ITS para as espécies de *Colletotrichum* (Du *et al.*, 2005). Foi decidido para este estudo analisar as três regiões que poderiam indicar o nível de variabilidade dos isolados de *C. sublineolum*, comparando-as entre si para verificar aquela que forneceria melhores informações sobre variabilidade intraespecífica.

#### 4.5.1 Análise de Variabilidade da Região W1

Como informado ao nosso grupo de trabalho por J.A. Crouch, a região W1 foi caracterizada como uma boa região para diferenciar intraespecificamente os isolados de *C. cereale*. Com a expectativa que essa diferenciação fosse possível também para os isolados de *C. sublineolum* foi realizada a PCR da região W1 de todos os isolados de *C. sublineolum*. Uma banda de aproximadamente 948 pb foi obtida para todos os isolados, como ilustrado em uma das PCRs na Figura 20 que representa o resultado obtido com a amplificação da região W1 de alguns isolados.

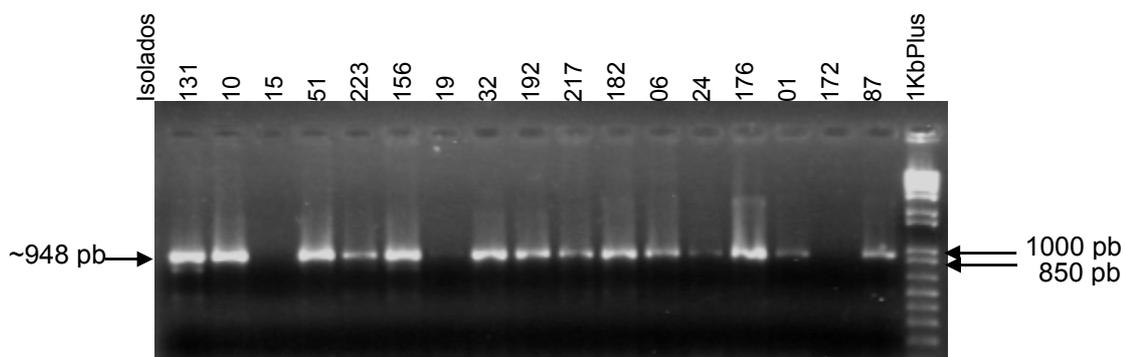


Figura 20: Gel mostrando bandas referentes à amplificação da região W1 de aproximadamente 948 pb visualizadas em gel de agarose 1% corados com brometo de etídeo sob luz UV.

Além dos DNAs dos isolados de *C. sublineolum*, os DNAs da linhagem CA de *C. cereale* e os DNAs dos quatro isolados de *C. graminicola* foram utilizados na PCR. A PCR com o DNA de *C. cereale* resultou na banda esperada de 948 pb, mas a PCR com o DNA dos quatro isolados de *C. graminicola* não apresentou nenhuma amplificação, nem mesmo quando a temperatura de anelamento foi diminuída para 50°C.

Para a análise da seqüência da região W1 10 isolados foram selecionados (01 e 32 de Jardinópolis-SP, 51 de Ipiáu-MG, 223 e 217 de Sete Lagoas-MG, 06 e 24 de Pelotas-RS e 176, 156 e 182 de Guaira-SP) e os produtos gerados foram seqüenciados. Além desses isolados, o DNA da linhagem CA de *C. cereale*, cedida por Crouch, foi seqüenciada. Não foi possível comparar essas seqüências com as seqüências de *C. graminicola* pois não houve amplificação para essa região nessa espécie. O alinhamento das seqüências obtidas é mostrado na Figura 21.

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100  
 217/SeteLagoas-MG ATCGCTCAGTATTACCGGTTACATCGTTTGGTCATCAGCTTCTGATCAGCTCCGACGGCAATGTTTCGAAA-CCTTGGAGCGGATATTGGTATATGCAA  
 156/Guaira-SP ATCGCTCAGTATTACCGGTTACATCGTTTGGTCATCAGCTTCTGATCAGCTCCGACGGCAATGTTTCGAAA-CCTTGGAGCGGATATTGGTATATGCAA  
 182/Guaira-SP ATCGCTCAGTATTACCGGTTACATCGTTTGGTCATCAGCTTCTGATCAGCTCCGACGGCAATGTTTCGAAA-CCTTGGAGCGGATATTGGTATATGCAA  
 223/SeteLagoas-MG ATCGCTCAGTATTACCGGTTACATCGTTTGGTCATCAGCTTCTGATCAGCTCCGACGGCAATGTTTCGAAA-CCTTGGAGCGGATATTGGTATATGCAA  
 01/Jardinopolis-SP ATCGCTCAGTATTACCGGTTACATCGTTTGGTCATCAGCTTCTGATCAGCTCCGACGGCAATGTTTCGAAA-CCTTGGAGCGGATATTGGTATATGCAA  
 51/Ipiacu-MG ATCGCTCAGTATTACCGGTTACATCGTTTGGTCATCAGCTTCTGATCAGCTCCGACGGCAATGTTTCGAAA-CCTTGGAGCGGATATTGGTATATGCAA  
 176/Guaira-SP ATCGCTCAGTATTACCGGTTACATCGTTTGGTCATCAGCTTCTGATCAGCTCCGACGGCAATGTTTCGAAA-CCTTGGAGCGGATATTGGTATATGCAA  
 06/Pelotas-RS ATCGCTCAGTATTACCGGTTACATCGTTTGGTCATCAGCTTCTGATCAGCTCCGACGGCAATGTTTCGAAA-CCTTGGAGCGGATATTGGTATATGCAA  
 24/Pelotas-RS ATCGCTCAGTATTACCGGTTACATCGTTTGGTCATCAGCTTCTGATCAGCTCCGACGGCAATGTTTCGAAA-CCTTGGAGCGGATATTGGTATATGCAA  
 32/Jardinopolis-SP ATCGCTCAGTATTACCGGTTACATCGTTTGGTCATCAGCTTCTGATCAGCTCCGACGGCAATGTTTCGAAA-CCTTGGAGCGGATATTGGTATATGCAA  
 C.cereale-CA CTTGATTTGACTTGCTTTGTTCCAGCATGATACCTGCCACCGCTTAGGATGGAGATTTCGAAATCCGTGACGCAACATATGTAATATATGCAA  
 Consensus aTcGcTcaGTAaTcaCgTtTacaCgTtGtGtAcCagctCtGatcaGctcGcaGgcaATgTTCGAAA.CctTGGagcggaTATtGgTATATGCAA

101 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200  
 217/SeteLagoas-MG GAACCAAGATTTCAGAGAAAGATTTCGCTGATGACATGGTTCTCGTCCCGGCTGGGACGTTGTTTCAGCCTACCAAAACACAGAAAGGTTAGCCTA  
 156/Guaira-SP GAACCAAGATTTCAGAGAAAGATTTCGCTGATGACATGGTTCTCGTCCCGGCTGGGACGTTGTTTCAGCCTACCAAAACACAGAAAGGTTAGCCTA  
 182/Guaira-SP GAACCAAGATTTCAGAGAAAGATTTCGCTGATGACATGGTTCTCGTCCCGGCTGGGACGTTGTTTCAGCCTACCAAAACACAGAAAGGTTAGCCTA  
 223/SeteLagoas-MG GAACCAAGATTTCAGAGAAAGATTTCGCTGATGACATGGTTCTCGTCCCGGCTGGGACGTTGTTTCAGCCTACCAAAACACAGAAAGGTTAGCCTA  
 01/Jardinopolis-SP GAACCAAGATTTCAGAGAAAGATTTCGCTGATGACATGGTTCTCGTCCCGGCTGGGACGTTGTTTCAGCCTACCAAAACACAGAAAGGTTAGCCTA  
 51/Ipiacu-MG GAACCAAGATTTCAGAGAAAGATTTCGCTGATGACATGGTTCTCGTCCCGGCTGGGACGTTGTTTCAGCCTACCAAAACACAGAAAGGTTAGCCTA  
 176/Guaira-SP GAACCAAGATTTCAGAGAAAGATTTCGCTGATGACATGGTTCTCGTCCCGGCTGGGACGTTGTTTCAGCCTACCAAAACACAGAAAGGTTAGCCTA  
 06/Pelotas-RS GAACCAAGATTTCAGAGAAAGATTTCGCTGATGACATGGTTCTCGTCCCGGCTGGGACGTTGTTTCAGCCTACCAAAACACAGAAAGGTTAGCCTA  
 24/Pelotas-RS GAACCAAGATTTCAGAGAAAGATTTCGCTGATGACATGGTTCTCGTCCCGGCTGGGACGTTGTTTCAGCCTACCAAAACACAGAAAGGTTAGCCTA  
 32/Jardinopolis-SP GAACCAAGATTTCAGAGAAAGATTTCGCTGATGACATGGTTCTCGTCCCGGCTGGGACGTTGTTTCAGCCTACCAAAACACAGAAAGGTTAGCCTA  
 C.cereale-CA GAACCAAGATTTCAGAGAAAGATTTCGCTGATGACATGGTTCTCGTCCCGGCTGGGACGTTGTTTCAGCCTACCAAAACACAGAAAGGTTAGCCTA  
 Consensus GAaACCAAGATTCAGAGAAAGATTTCGCTGATGACATGGTTCTCGTCCCGGCTGGGACGTTGTTTCAGCCTACCAAAACACAGAAAGGTTAGCCTA

201 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300  
 217/SeteLagoas-MG TCCGACTTTGACGGGTGGGTGTGACTGACTCACCGGACAGGATACCTGGTGTCTATATACACACGACACGCGACATGCTGCCAATCCGGCCGCA  
 156/Guaira-SP TCCGACTTTGACGGGTGGGTGTGACTGACTCACCGGACAGGATACCTGGTGTCTATATACACACGACACGCGACATGCTGCCAATCCGGCCGCA  
 182/Guaira-SP TCCGACTTTGACGGGTGGGTGTGACTGACTCACCGGACAGGATACCTGGTGTCTATATACACACGACACGCGACATGCTGCCAATCCGGCCGCA  
 223/SeteLagoas-MG TCCGACTTTGACGGGTGGGTGTGACTGACTCACCGGACAGGATACCTGGTGTCTATATACACACGACACGCGACATGCTGCCAATCCGGCCGCA  
 01/Jardinopolis-SP TCCGACTTTGACGGGTGGGTGTGACTGACTCACCGGACAGGATACCTGGTGTCTATATACACACGACACGCGACATGCTGCCAATCCGGCCGCA  
 51/Ipiacu-MG TCCGACTTTGACGGGTGGGTGTGACTGACTCACCGGACAGGATACCTGGTGTCTATATACACACGACACGCGACATGCTGCCAATCCGGCCGCA  
 176/Guaira-SP TCCGACTTTGACGGGTGGGTGTGACTGACTCACCGGACAGGATACCTGGTGTCTATATACACACGACACGCGACATGCTGCCAATCCGGCCGCA  
 06/Pelotas-RS TCCGACTTTGACGGGTGGGTGTGACTGACTCACCGGACAGGATACCTGGTGTCTATATACACACGACACGCGACATGCTGCCAATCCGGCCGCA  
 24/Pelotas-RS TCCGACTTTGACGGGTGGGTGTGACTGACTCACCGGACAGGATACCTGGTGTCTATATACACACGACACGCGACATGCTGCCAATCCGGCCGCA  
 32/Jardinopolis-SP TCCGACTTTGACGGGTGGGTGTGACTGACTCACCGGACAGGATACCTGGTGTCTATATACACACGACACGCGACATGCTGCCAATCCGGCCGCA  
 C.cereale-CA TCCGACTTTGACGGGTGGGTGTGACTGACTCACCGGACAGGATACCTGGTGTCTATATACACACGACACGCGACATGCTGCCAATCCGGCCGCA  
 Consensus TcCgacTTTGaACGGGTGGGTGTGACTGACTCACCGGACAGGATACCTGGTGTCTATATACACACGACACGCGACATGCTGCCAATCCGGCCGCA

301 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400  
 217/SeteLagoas-MG GGAAGGCATTACGGGCATTCTCCGGCCCCAATCTCCCTCACTAGCTTTCCGCGACTGCCGAGACCCAGCAGATTGGCGGTACCCGGACCTGACCAA  
 156/Guaira-SP GGAAGGCATTACGGGCATTCTCCGGCCCCAATCTCCCTCACTAGCTTTCCGCGACTGCCGAGACCCAGCAGATTGGCGGTACCCGGACCTGACCAA  
 182/Guaira-SP GGAAGGCATTACGGGCATTCTCCGGCCCCAATCTCCCTCACTAGCTTTCCGCGACTGCCGAGACCCAGCAGATTGGCGGTACCCGGACCTGACCAA  
 223/SeteLagoas-MG GGAAGGCATTACGGGCATTCTCCGGCCCCAATCTCCCTCACTAGCTTTCCGCGACTGCCGAGACCCAGCAGATTGGCGGTACCCGGACCTGACCAA  
 01/Jardinopolis-SP GGAAGGCATTACGGGCATTCTCCGGCCCCAATCTCCCTCACTAGCTTTCCGCGACTGCCGAGACCCAGCAGATTGGCGGTACCCGGACCTGACCAA  
 51/Ipiacu-MG GGAAGGCATTACGGGCATTCTCCGGCCCCAATCTCCCTCACTAGCTTTCCGCGACTGCCGAGACCCAGCAGATTGGCGGTACCCGGACCTGACCAA  
 176/Guaira-SP GGAAGGCATTACGGGCATTCTCCGGCCCCAATCTCCCTCACTAGCTTTCCGCGACTGCCGAGACCCAGCAGATTGGCGGTACCCGGACCTGACCAA  
 06/Pelotas-RS GGAAGGCATTACGGGCATTCTCCGGCCCCAATCTCCCTCACTAGCTTTCCGCGACTGCCGAGACCCAGCAGATTGGCGGTACCCGGACCTGACCAA  
 24/Pelotas-RS GGAAGGCATTACGGGCATTCTCCGGCCCCAATCTCCCTCACTAGCTTTCCGCGACTGCCGAGACCCAGCAGATTGGCGGTACCCGGACCTGACCAA  
 32/Jardinopolis-SP GGAAGGCATTACGGGCATTCTCCGGCCCCAATCTCCCTCACTAGCTTTCCGCGACTGCCGAGACCCAGCAGATTGGCGGTACCCGGACCTGACCAA  
 C.cereale-CA GGAAGGCATTACGGGCATTCTCCGGCCCCAATCTCCCTCACTAGCTTTCCGCGACTGCCGAGACCCAGCAGATTGGCGGTACCCGGACCTGACCAA  
 Consensus GGAAGGCATTACGGGCATTCTCCGGCCCCAATCTCCCTCACTAGCTTTCCGCGACTGCCGAGACCCAGCAGATTGGCGGTACCCGGACCTGACCAA

401 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500  
 217/SeteLagoas-MG CTACTTGGTAGAGTGGACGAGACACGCTTGACTCCGAGGGCCGCTGCGTGGTCTCGAATCCCGGCTTTGCTGATCGGAACCTACAGCCGGCCA  
 156/Guaira-SP CTACTTGGTAGAGTGGACGAGACACGCTTGACTCCGAGGGCCGCTGCGTGGTCTCGAATCCCGGCTTTGCTGATCGGAACCTACAGCCGGCCA  
 182/Guaira-SP CTACTTGGTAGAGTGGACGAGACACGCTTGACTCCGAGGGCCGCTGCGTGGTCTCGAATCCCGGCTTTGCTGATCGGAACCTACAGCCGGCCA  
 223/SeteLagoas-MG CTACTTGGTAGAGTGGACGAGACACGCTTGACTCCGAGGGCCGCTGCGTGGTCTCGAATCCCGGCTTTGCTGATCGGAACCTACAGCCGGCCA  
 01/Jardinopolis-SP CTACTTGGTAGAGTGGACGAGACACGCTTGACTCCGAGGGCCGCTGCGTGGTCTCGAATCCCGGCTTTGCTGATCGGAACCTACAGCCGGCCA  
 51/Ipiacu-MG CTACTTGGTAGAGTGGACGAGACACGCTTGACTCCGAGGGCCGCTGCGTGGTCTCGAATCCCGGCTTTGCTGATCGGAACCTACAGCCGGCCA  
 176/Guaira-SP CTACTTGGTAGAGTGGACGAGACACGCTTGACTCCGAGGGCCGCTGCGTGGTCTCGAATCCCGGCTTTGCTGATCGGAACCTACAGCCGGCCA  
 06/Pelotas-RS CTACTTGGTAGAGTGGACGAGACACGCTTGACTCCGAGGGCCGCTGCGTGGTCTCGAATCCCGGCTTTGCTGATCGGAACCTACAGCCGGCCA  
 24/Pelotas-RS CTACTTGGTAGAGTGGACGAGACACGCTTGACTCCGAGGGCCGCTGCGTGGTCTCGAATCCCGGCTTTGCTGATCGGAACCTACAGCCGGCCA  
 32/Jardinopolis-SP CTACTTGGTAGAGTGGACGAGACACGCTTGACTCCGAGGGCCGCTGCGTGGTCTCGAATCCCGGCTTTGCTGATCGGAACCTACAGCCGGCCA  
 C.cereale-CA CTACTTGGTAGAGTGGACGAGACACGCTTGACTCCGAGGGCCGCTGCGTGGTCTCGAATCCCGGCTTTGCTGATCGGAACCTACAGCCGGCCA  
 Consensus CTActTGGTAGAGTGGACGAGACACGCTTGACTCCGAGGGCCGCTGCGTGGTCTCGAATCCCGGCTTTGCTGATCGGAACCTACAGCCGGCCA

501 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600  
 217/SeteLagoas-MG CGCGGACTCCTCCCGGACGATTCCGGCTCGGGTACCTCAGCGCTCTCAGCGGAGGGTGGGAAACCTCGTGGCGGCGGGGAAACAGGTCATCCTAAC  
 156/Guaira-SP CGCGGACTCCTCCCGGACGATTCCGGCTCGGGTACCTCAGCGCTCTCAGCGGAGGGTGGGAAACCTCGTGGCGGCGGGGAAACAGGTCATCCTAAC  
 182/Guaira-SP CGCGGACTCCTCCCGGACGATTCCGGCTCGGGTACCTCAGCGCTCTCAGCGGAGGGTGGGAAACCTCGTGGCGGCGGGGAAACAGGTCATCCTAAC  
 223/SeteLagoas-MG CGCGGACTCCTCCCGGACGATTCCGGCTCGGGTACCTCAGCGCTCTCAGCGGAGGGTGGGAAACCTCGTGGCGGCGGGGAAACAGGTCATCCTAAC  
 01/Jardinopolis-SP CGCGGACTCCTCCCGGACGATTCCGGCTCGGGTACCTCAGCGCTCTCAGCGGAGGGTGGGAAACCTCGTGGCGGCGGGGAAACAGGTCATCCTAAC  
 51/Ipiacu-MG CGCGGACTCCTCCCGGACGATTCCGGCTCGGGTACCTCAGCGCTCTCAGCGGAGGGTGGGAAACCTCGTGGCGGCGGGGAAACAGGTCATCCTAAC  
 176/Guaira-SP CGCGGACTCCTCCCGGACGATTCCGGCTCGGGTACCTCAGCGCTCTCAGCGGAGGGTGGGAAACCTCGTGGCGGCGGGGAAACAGGTCATCCTAAC  
 06/Pelotas-RS CGCGGACTCCTCCCGGACGATTCCGGCTCGGGTACCTCAGCGCTCTCAGCGGAGGGTGGGAAACCTCGTGGCGGCGGGGAAACAGGTCATCCTAAC  
 24/Pelotas-RS CGCGGACTCCTCCCGGACGATTCCGGCTCGGGTACCTCAGCGCTCTCAGCGGAGGGTGGGAAACCTCGTGGCGGCGGGGAAACAGGTCATCCTAAC  
 32/Jardinopolis-SP CGCGGACTCCTCCCGGACGATTCCGGCTCGGGTACCTCAGCGCTCTCAGCGGAGGGTGGGAAACCTCGTGGCGGCGGGGAAACAGGTCATCCTAAC  
 C.cereale-CA CGCGGACTCCTCCCGGACGATTCCGGCTCGGGTACCTCAGCGCTCTCAGCGGAGGGTGGGAAACCTCGTGGCGGCGGGGAAACAGGTCATCCTAAC  
 Consensus CGCGGACTCCTCCCGGACGATTCCGGCTCGGGTACCTCAGCGCTCTCAGCGGAGGGTGGGAAACCTCGTGGCGGCGGGGAAACAGGTCATCCTAAC

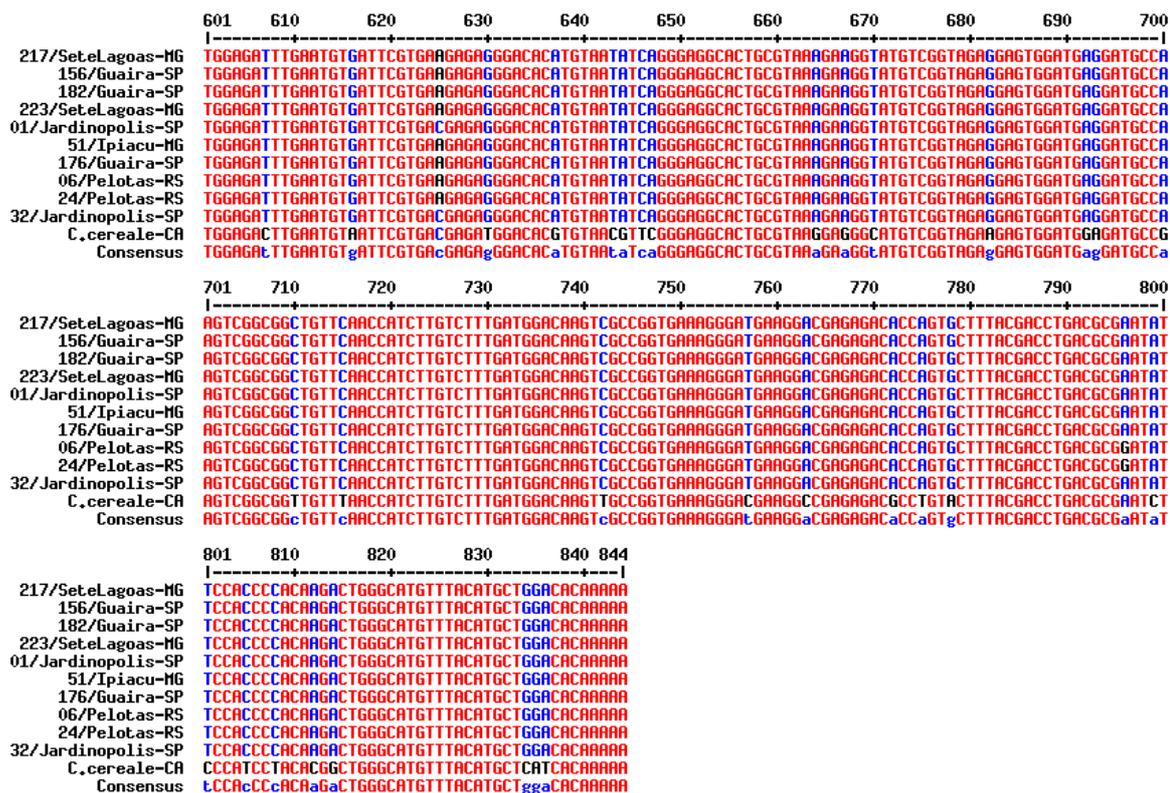


Figura 21: Alinhamento das seqüências da região flanqueadora W1 do gene *MAT1-2* realizado no programa MultiAlin (Corpet, 1988). Em vermelho as bases comuns para as três espécies, em azul as bases comuns para duas espécies, em preto bases singulares para as três espécies e (-) representa *gap* na seqüência. Abaixo de cada alinhamento é mostrada a seqüência consenso para as duas espécies.

As seqüências da região W1 dos isolados de *C. sublineolum* quando comparadas entre si apresentaram pouca variação. Essa diferença acentuou-se significativamente quando se comparou as seqüências de *C. sublineolum* e *C. cereale*. Com essas seqüências foi gerada a árvore utilizando o algoritmo NJ com 1000 repetições e bootstrap (mostrada na Figura 22).

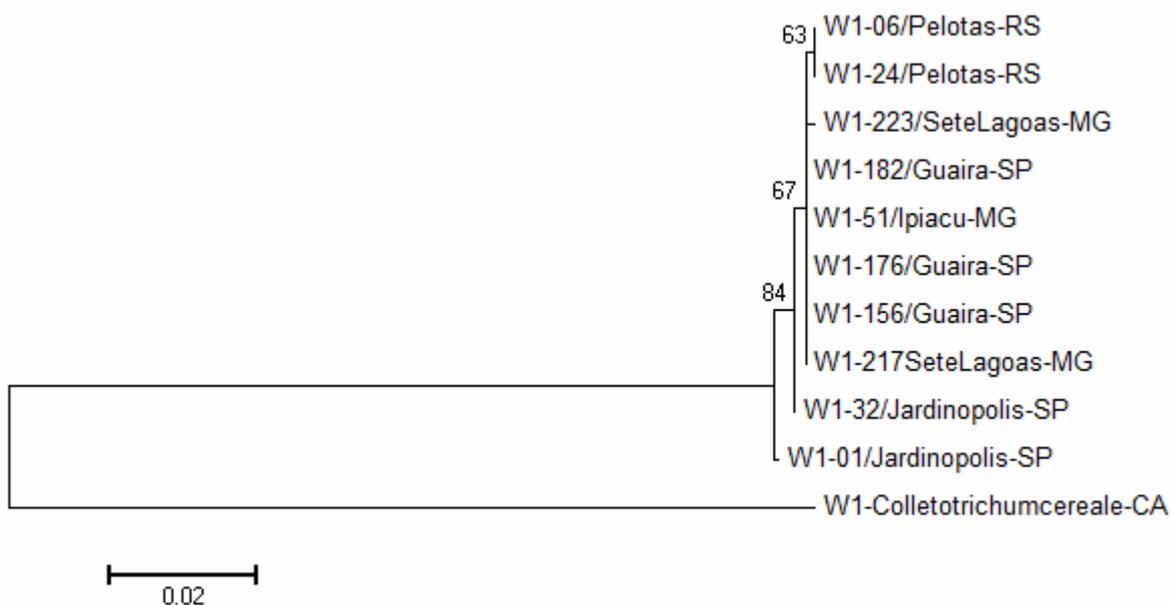


Figura 22: Árvore gerada com as seqüência da região W1 pelo algoritmo NJ com 1000 repetições de bootstrap.

Nessa árvore, pode-se perceber nitidamente a separação de *C. cereale* dos isolados de *C. sublineolum*. Outro ponto que se destacou foi o agrupamento dos isolados de Pelotas-RS por um Bootstrap de 63%. Isso pode ser um reflexo da maior separação geográfica dos isolados de Pelotas-RS quando relacionados aos demais isolados que se concentram na região sudeste.

As seqüências da região W1 de *C. sublineolum* foram submetidas ao Blastn e apresentaram alta similaridade com a seqüência do gene de DNA liase de *Beauveria bassiana* (eValue=5e-41 e 66% de identidade). Essa ORF de DNA liase já havia sido encontrada em *C. cereale* por Crouch (dados não publicados) e em *C. graminicola* por Du (2002).

Para analisar comparativamente a seqüência da proteína cogitada para a região W1 foi realizado o Blastx da seqüência e então se obteve seqüências de DNA liase depositadas no GenBank de espécies próximas a *C. sublineolum* e de espécies modelo para fazer um alinhamento que é mostrado na Figura 23.

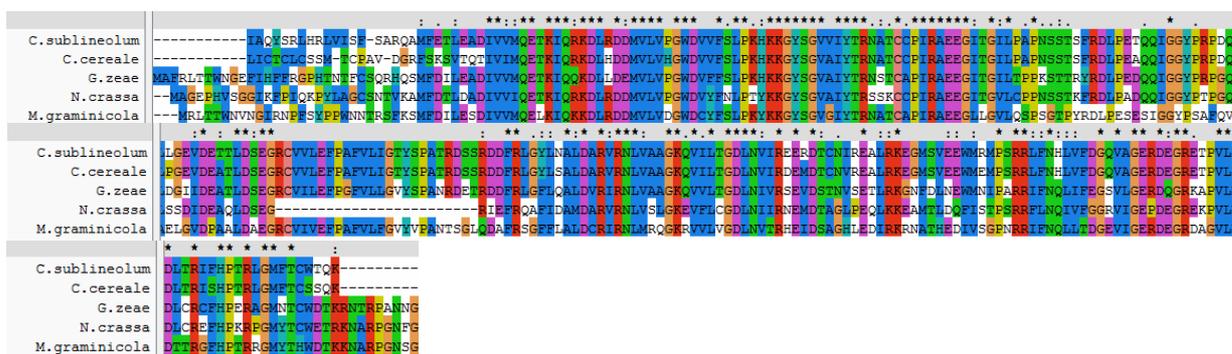


Figura 23: Alinhamento da ORF traduzida encontrada na região W1 de *C. sublineolum* com seqüências de DNA liase das espécies *Giberella zeae* (número de acesso: XP\_389065), *N. crassa* (número de acesso: XP\_964325.2) e *Mycosphaerella graminicola* (número de acesso: AAL30835.1), realizado com o programa ClustalX2.0.3, utilizando a matriz pam120 com os parâmetros *gap opening* e *gap extension* de 11 e 4 respectivamente. (\*): Aminoácido conservado, (:): substituição por aminoácidos com características químicas similares e (.) indica substituição neutra de aminoácidos, as cores representam grupos de aminoácidos estabelecidos da seguinte forma: Laranja: GPST, Vermelho: HKR, Azul: FWY, Verde: ILMV.

#### 4.5.2 Análise de Variabilidade da Região HMG

Para se analisar e comparar os dados obtidos com o seqüenciamento da região W1, foi realizado o seqüenciamento da região HMG do *MAT1-2*, sabidamente bastante conservada e capaz de diferenciar as espécies de *Colletotrichum* (Du *et al.*, 2005). De todos os isolados de *C. sublineolum* amplificados, os dez que foram analisados para a região W1, foram também selecionados para o seqüenciamento da região HMG: 01 e 32 de Jardinópolis-SP, 51 de Ipiaçu-MG, 223 e 217 de Sete Lagoas-MG, 06 e 24 de Pelotas-RS e 176, 156 e 182 de Guaira-SP. O seqüenciamento do produto de PCR obtido na amplificação da região HMG do gene *MAT1-2* permitiu a comparação das seqüências dos 10 isolados com seqüências dessa região de outros fungos ascomicetos depositadas no GenBank. Os resultados

obtidos nos seqüenciamentos foram submetidos ao Blastn e correspondiam à região HMG do *MAT1-2* de *C. sublineolium* (número de acesso: DQ002866.2, identidade de ~98%; eValue ~8e-60). Todas essas dez seqüências foram alinhadas juntamente com as seqüências da região HMG do *MAT1-2* de *G. graminicola*, (número de acesso: DQ002858) (Figura 24). As seqüências dos isolados de *C. sublineolium* apresentaram uma homologia superior a 99,09%, pois nas seqüência de 220 pb apenas 2 pb diferenciaram-se, nas posições 108 e 113. Não houve diferença quando se comparou a seqüência do HMG de *C. sublineolium* depositada no GenBank com seis seqüências dos isolados brasileiros. A similaridade encontrada entre *C. sublineolium* foi 91,36%, uma maior diferença foi encontrada na análise entre os isolados de *C. sublineolium* e *C. cereale* na qual a similaridade foi de 90,90%. Isso demonstra a alta similaridade dessa região quando se analisa a seqüência de DNA até mesmo entre espécies.

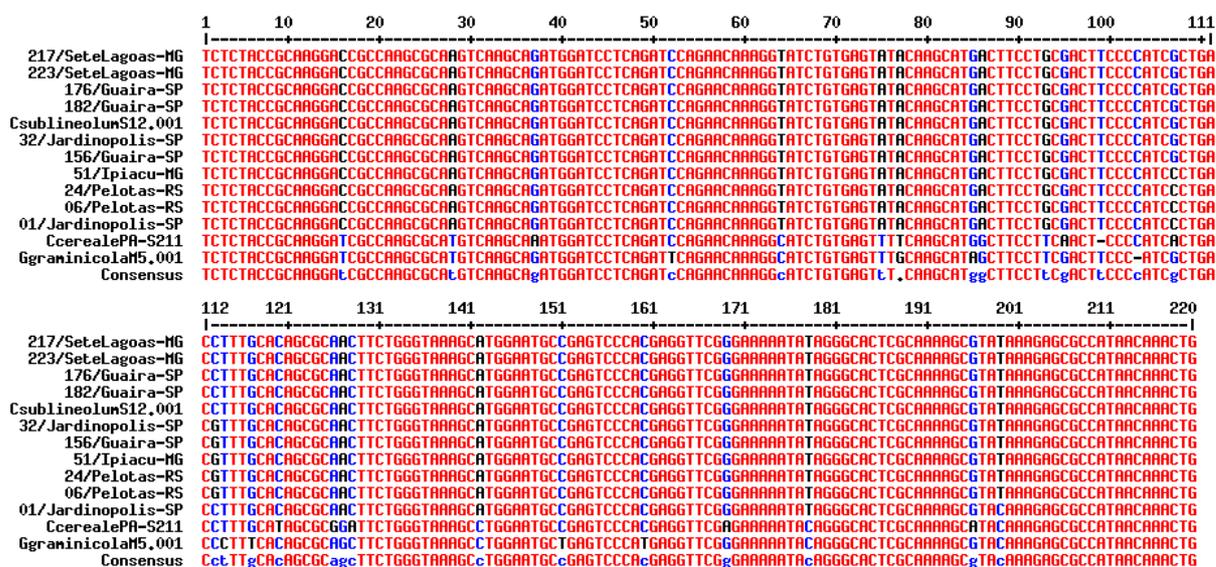


Figura 24: Alinhamento das seqüências da região HMG do gene *MAT1-2* realizado no programa MultiAlin (Corpet, 1988). Em vermelho as bases comuns para as três espécies, em azul as bases comuns para duas espécies, em preto bases singulares para as três espécies e (-) representa *gap* na seqüência. Abaixo de cada alinhamento é mostrada a seqüência consenso para as três espécies.

Com as seqüências obtidas para a região HMG foi gerada uma árvore utilizando o algoritmo NJ com 1000 repetições de bootstrap. A árvore (Figura 25) mostra que o agrupamento das seqüências de *C. sublineolum* se separa das seqüências de *G. graminicola* e *C. cereale*. Deve-se ressaltar que os isolados de Pelotas-RS formaram um agrupamento definido dentro do agrupamento de *C. sublineolum*, com este tipo de análise.

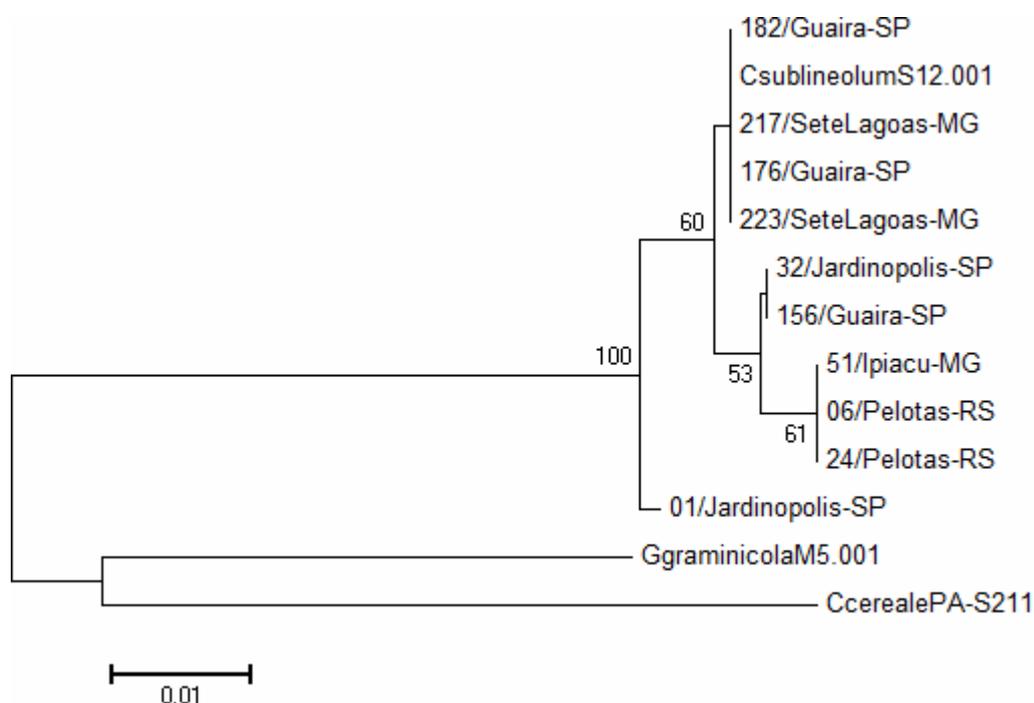


Figura 25: Árvore gerada com as seqüência da região HMG do *MAT1-2* pelo algoritmo NJ com 1000 repetições de bootstrap.

Foram usadas também as seqüências protéicas da região HMG de todos os isolados de *C. sublineolum* que foram comparadas às seqüências protéicas do HMG de *G. graminicola* (número de acesso: AF204961.1) e *C. cereale* (número de acesso: DQ663520). Como era de se esperar, essa região se mostrou altamente similar em todas as seqüências analisadas abaixo, aproximadamente 97% de similaridade.

	*****:*****:*****
217/SeteLagoas-MG	LYRKDRQAQVKQMDPQIQNKGISQLLGKAWNAESHEVREKYRALAKAYKERHNKL
223/SeteLagoas-MG	LYRKDRQAQVKQMDPQIQNKGISQLLGKAWNAESHEVREKYRALAKAYKERHNKL
51/Ipiacu-MG	LYRKDRQAQVKQMDPQIQNKGISQLLGKAWNAESHEVREKYRALAKAYKERHNKL
01/Jardinopolis-SP	LYRKDRQAQVKQMDPQIQNKGISQLLGKAWNAESHEVREKYRALAKAYKERHNKL
32/Jardinopolis-SP	LYRKDRQAQVKQMDPQIQNKGISQLLGKAWNAESHEVREKYRALAKAYKERHNKL
156/Guaira-SP	LYRKDRQAQVKQMDPQIQNKGISQLLGKAWNAESHEVREKYRALAKAYKERHNKL
176/Guaira-SP	LYRKDRQAQVKQMDPQIQNKGISQLLGKAWNAESHEVREKYRALAKAYKERHNKL
182/Guaira-SP	LYRKDRQAQVKQMDPQIQNKGISQLLGKAWNAESHEVREKYRALAKAYKERHNKL
06/Pelotas-RS	LYRKDRQAQVKQMDPQIQNKGISQLLGKAWNAESHEVREKYRALAKAYKERHNKL
24/Pelotas-RS	LYRKDRQAQVKQMDPQIQNKGISQLLGKAWNAESHEVREKYRALAKAYKERHNKL
CsublineolumS12.001	LYRKDRQAQVKQMDPQIQNKGISQLLGKAWNAESHEVREKYRALAKAYKERHNKL
GgraminicolaM5.001	LYRKDRQAHVKQMDPQIQNKGISQLLGKAWNAESHEVREKYRALAKAYKERHNKL
CcerealePA-S211	LYRKDRQAHVKQMDPQIQNKGISRILGKAWNAESHEVREKYRALAKAYKERHNKL

Figura 26: Alinhamento da região codificadora do HMG do *MAT1-2* de *C. sublineolum* com seqüências de *G. graminicola* e *C. cereale*, realizado com o programa ClustalX2.0.3, utilizando a matriz pam120 com os parâmetros *gap opening* e *gap extension* de 11 e 4 respectivamente. (\*): Aminoácido conservado, (:) substituição por aminoácidos com características químicas similares e (.) indica substituição neutra de aminoácidos, as cores representam grupos de aminoácidos estabelecidos da seguinte forma: Laranja: GPST, Vermelho: HKR, Azul: FWY, Verde: ILMV.

### 4.5.3 Análise da Variabilidade da Região ITS

Amplamente utilizada para análises de diversidade de microrganismos no ambiente (Anderson & Cairney, 2004), a região ITS pode também ser utilizada para determinar a relação filogenética de espécies de fungos e validar a análise de outras seqüências que possam, da mesma forma, determinar essa relação filogenética (Du *et al.*, 2005). A amplificação da região ITS resultou no produto esperado de aproximadamente 600 pb, como mostrado na Figura 27.

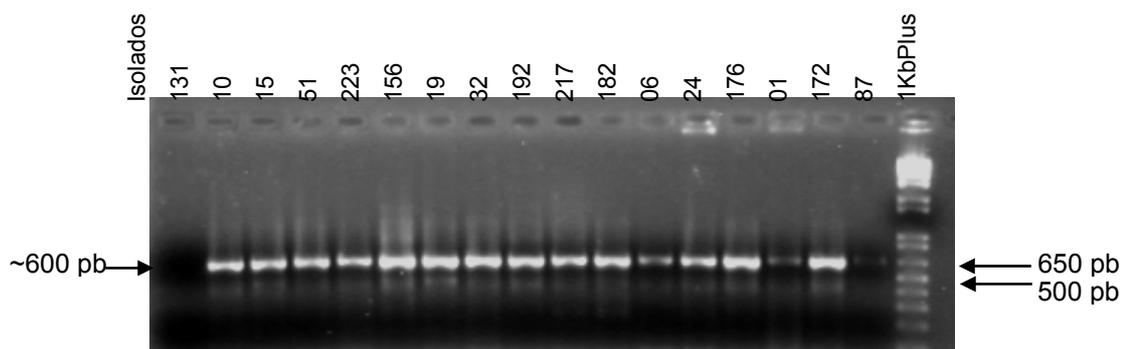


Figura 27: Bandas referentes à amplificação da região ITS de aproximadamente 600 pb visualizadas em gel de agarose 1% corados com brometo de etídeo sob luz UV.

Os mesmos 10 isolados seqüenciados para a região HMG e W1 tiveram a região ITS seqüenciada. As seqüências obtidas foram alinhadas com seqüências de *C. sublineolum* (número de acesso: DQ003114.1), *G. graminicola*, anamorfa de *C. graminicola* (número de acesso: DQ003111.1) e *G. tucumanensis*, anamorfa de *C. cereale* (número de acesso: AY944753.1).

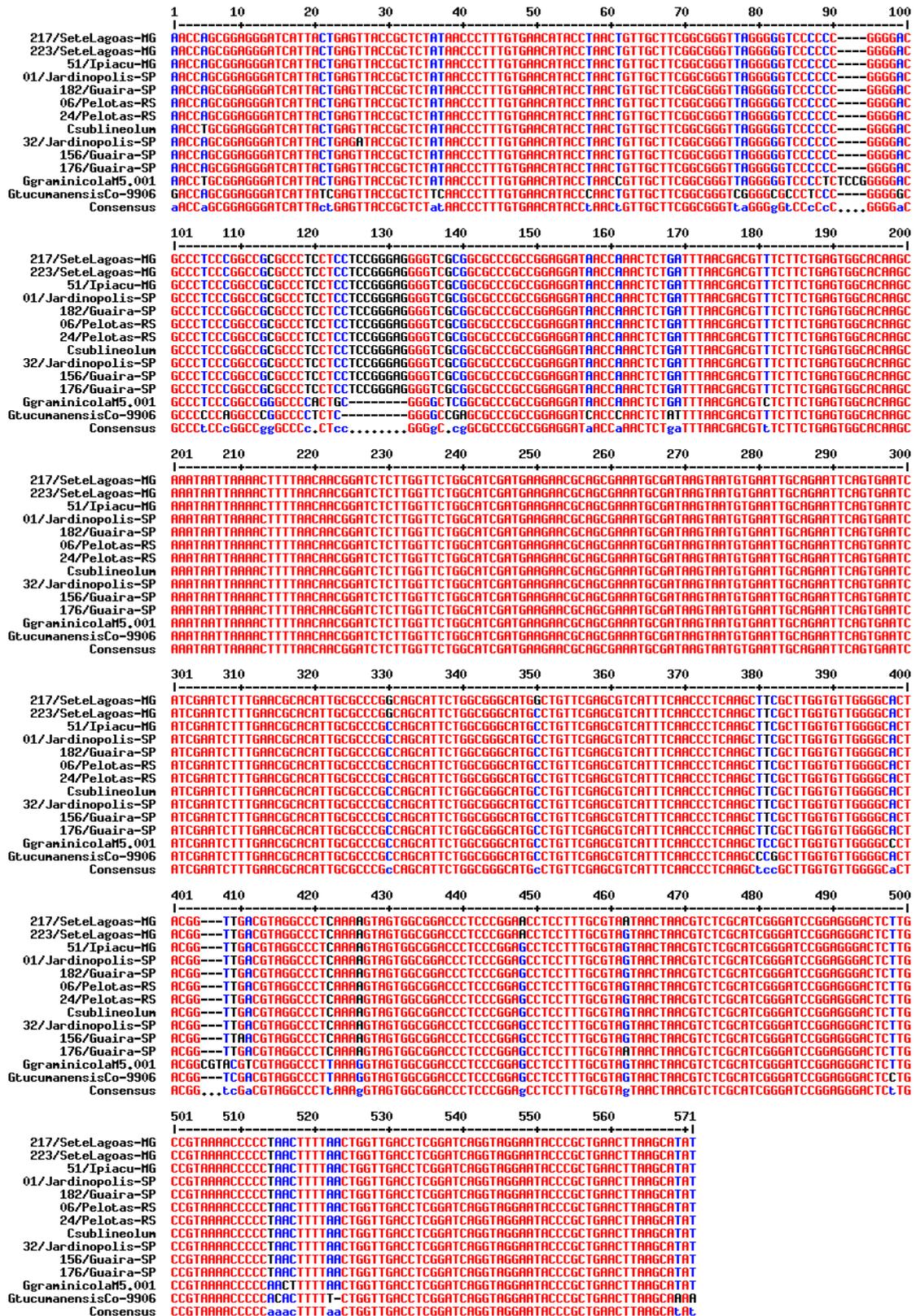


Figura 28: Alinhamento das seqüências da região ITS realizado no programa MultiAlin (Corpet,1988). Em vermelho as bases comuns para as três espécies, em azul as bases comuns para duas espécies, em preto bases singulares para as três espécies e (-) representa gap na seqüência. Abaixo de cada alinhamento é mostrada a seqüência consenso para as três espécies.

As seqüências dos isolados de *C. sublineolum* quando comparadas apresentaram variação, com a similaridade de 99,12%. Entre os isolados de *C. sublineolum* e *G. graminicola* a similaridade foi de 94,57% e entre *C. sublineolum* e *C. cereale* foi de 91,59%. Essa região pôde separar muito bem o grupo de seqüência de *C. sublineolum* das espécies *G. graminicola* e *G. tucumanensis*. Com essas seqüências foi gerada a árvore da Figura 29, onde é possível observar a separação das seqüências de *C. sublineolum* das de *G. graminicola* com um bootstrap de 99%. Esta análise agrupou os isolados de Sete Lagoas, MG, dentro do *cluster* de *C. sublineolum*

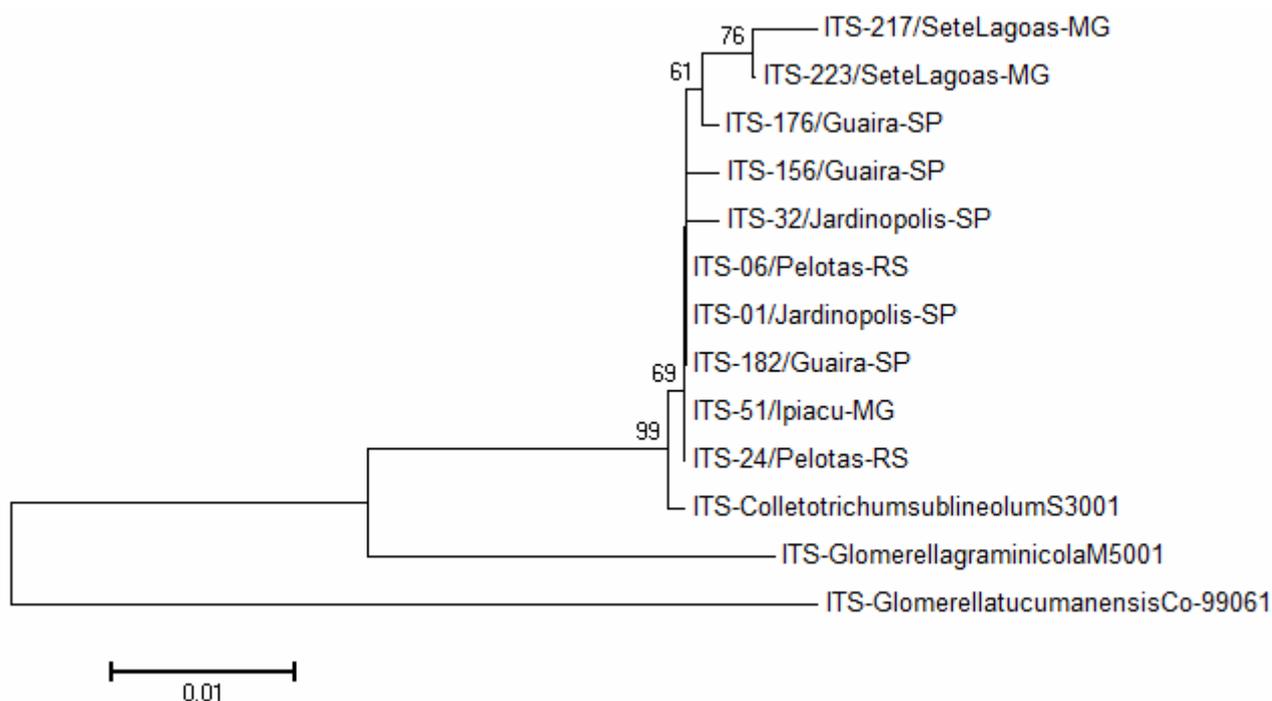


Figura 29: Árvore gerada com as seqüência da região ITS pelo algoritmo NJ com 1000 repetições de bootstrap.

As análises das seqüências de W1, HMG e ITS mostraram-se bastante congruentes com os dados de Du *et al.* (2005). Os isolados de *C. sublineolum* separaram-se nitidamente das espécies *C. graminicola* e *C. cereale*. Nas análises

das seqüências da região HMG a seqüência de *C. sublineolum* obtida do banco de dados formou um cluster com os demais isolados dessa espécie. No entanto, nas análises das seqüências de ITS a seqüência de *C. sublineolum* do banco de dados agrupou-se com os demais isolados de *C. sublineolum* mas sem se misturar pois se separou dos outros com um bootstrap de 69%. Isso pode ter ocorrido por se tratar de isolado americano em comparação com os isolados brasileiros.

#### 4.5.4 Análise da Variabilidade pelo Método MLSA

Para se obter uma melhor resolução desse dados, a análise de MLSA (*Multilocus Sequencing Analysis*) foi realizada. Essa análise deriva do método MLST (*Multilocus Sequencing Typing*) que é utilizada para caracterização de linhagens distintas de bactérias analisando seqüências de um grupo de locos *housekeeping*. Já o método MLSA permite uma utilização mais ampla e tem como objetivo caracterizar isolados genotipicamente, combinando seqüências de diferentes locos que podem ser até específicos daquele grupo em estudo (Pontes *et al.*, 2007). Essa técnica também já foi utilizada em fungos como *Aspergillus fumigatus* (Bain *et al.*, 2007) e *Candida albicans* (Odds *et al.*, 2007). No estudo com *A. fumigatus* um dos locos selecionados foi o loco *mating-type*. A análise de MLSA foi então realizada para os isolados de *C. sublineolum* comparando apenas com *C. cereale*, pois esse é o único que possui a região W1 seqüenciada. As seqüências das regiões W1, ITS e HMG foram colocadas de forma contínua para cada isolado, gerando então uma seqüência de 1573 pb. Essas seqüências foram realinhadas e utilizadas para se obter uma árvore (Figura 30) com o algoritmo NJ com 1000 repetições de bootstrap.

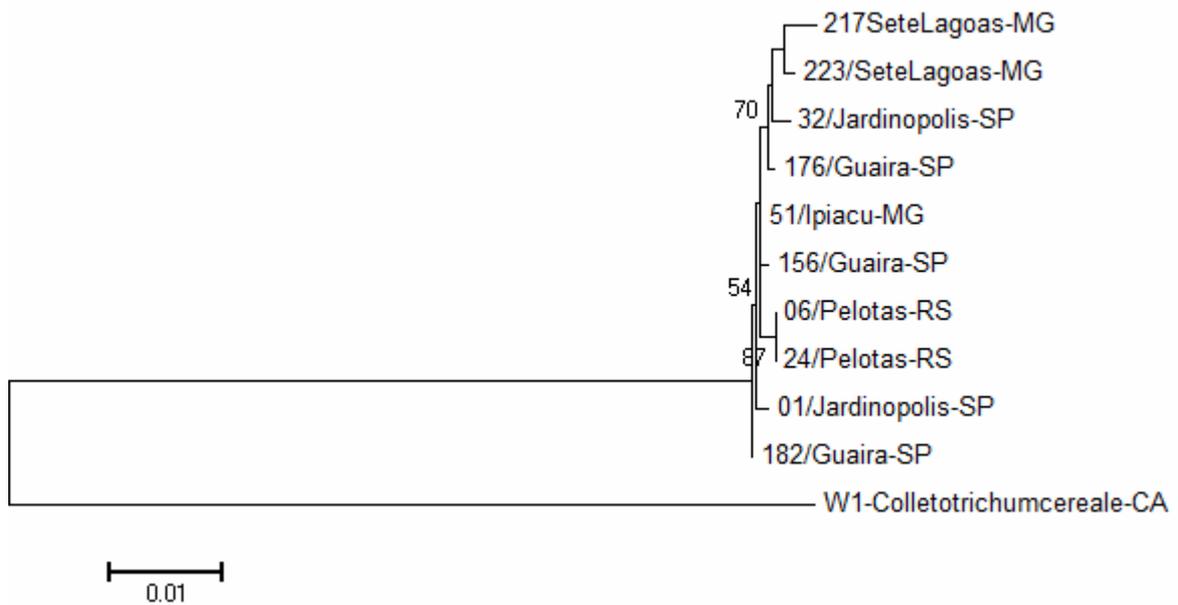


Figura 30: Árvore gerada com as seqüência da região W1, ITS e HMG pelo algoritmo NJ com 1000 repetições de bootstrap.

Com esse tipo de análise foi possível confirmar a tendência dos isolados de Pelotas-RS a formar um grupo com bootstrap de 87% dentro do agrupamento maior de *C. sublineolum*. Essa tendência pode indicar uma variação nesses isolados de Pelotas-RS, principalmente porque esses são de uma região geográfica mais distante daquelas dos demais isolados.

## 5 DISCUSSÃO

Os fungos ascomicetos apresentam sistema de acasalamento bipolar com duas seqüências alternativas, idiomorfos, no loco *MAT*, o *MAT1-1* e o *MAT1-2*. Mesmo em fungos onde a reprodução sexuada não foi observada, os dois idiomorfos já foram detectados. Nesses casos, ainda é possível fazer inferências se existe reprodução sexual através da proporção dos indivíduos carregando um ou outro idiomorfo. Desse fato surgiu a idéia de triagem dos genes *mating-type* em *C. sublineolum*. A PCR é uma ferramenta poderosa, mas se a seqüência alvo não é amplificada pouco pode se concluir se o genoma do organismo não é conhecido.

O idiomorfo *MAT1-2* já havia sido detectado em *C. graminicola* isolado de milho e outras gramíneas, através de PCR da região HMG; porém o idiomorfo *MAT1-1* não foi encontrado nos isolados analisados (Vaillancourt *et al.* 2000). Os autores reportaram o insucesso ao tentar amplificar o gene *MAT1-1* com iniciadores degenerados para a região  $\alpha$ -box, que está presente em *MAT1-1* de inúmeros ascomicetos. Em um grupo de espécies homotáticas do gênero *Neurospora*, apenas o idiomorfo A (*MAT1-1*) foi identificado (Glass *et al.*, 1988). Curiosamente, nenhum grupo contendo apenas o gene correspondente ao *MAT1-2* foi encontrado. Não é claro ainda se um terceiro idiomorfo possa ocorrer em ascomicetos. Foi sugerido, no entanto, por Vaillancourt *et al.* (2000), que se *C. graminicola* possui um homólogo ao *MAT1-1* de ascomicetos, a seqüência  $\alpha$ -box não é bem conservada. O mesmo foi observado para *C. sublineolum*, que no estudo realizado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa: a amplificação da região  $\alpha$ -box do gene *MAT1-1* não foi realizada com sucesso, sendo apenas *MAT1-2* identificado em aproximadamente 200 isolados (Groenner-Penna, 2005). Se essa busca pela região HMG resultasse numa média de 50% de isolados apresentando o *MAT1-2*, poderia ser proposto que, apesar de não ter sido detectado, outro determinante sexual ocorreria noutros 50% dos

isolados indicando a formação de parceiros sexuais. No entanto, todos os isolados analisados anteriormente e nesse trabalho apresentaram a região correspondente ao HMG de *MAT1-2*. Esse fato foi também observado no estudo de *mating-type* de *C. graminicola* isolado da gramínea *Agrostis palustris* (Chen *et al.*, 2002). Nesse estudo os autores obtiveram ampliações somente do *MAT1-2* de todos os 35 isolados estudados e não obtiveram ampliações do *MAT1-1*.

O estudo de Cisar & TeBeest (1999) demonstrou que *Colletotrichum gloeosporioides* não se encaixa no sistema de acasalamento apresentado pela maioria dos fungos ascomicetos. Foi sugerido que o acasalamento nessa espécie é controlado por um único loco, mas com múltiplos alelos. No entanto a hipótese que foi levantada por Vaillancourt *et al.* (2000) para *C. graminicola* se baseia também no estudo onde isolados de *C. graminicola* de milho foram identificados como formas homotáticas e heterotáticas e os fenótipos variavam de completamente estéreis a extremamente férteis, mostrando que a estrutura da reprodução sexuada em *C. sublineolum* pode ser mais complexa que as já descritas em ascomicetos.

Vaillancourt *et al.* (2000) demonstrou que há outros dois locos denominados *Cfr1* e *Cfr2* que também apresentam função de reconhecimento e compatibilidade, na reprodução sexuada de *C. graminicola*. A possibilidade colocada por esse grupo de pesquisa é que o loco *Cfr1* possui um papel na via de fertilidade e estabelece funções como as encontradas para genes envolvidos no heterotalismo desbalanceado descrito em *G. cingulata* por Wheeler em 1954. Já *Cfr2* deve ter alelos distintos para o acasalamento, tendo então o mesmo perfil do *MAT*. Se extrapolados para nosso estudo, esses dados sugerem que, se existente, o mecanismo genético de reprodução sexuada do fungo *C. sublineolum* pode também apresentar a mesma complexidade sugerida para *C. graminicola*.

No campo, diferentes estratégias reprodutivas podem ser utilizadas de acordo com as condições ambientais e biológicas que influenciam uma determinada população. No campo, os fungos reproduzem-se continuamente, de forma vegetativa ou assexuada, ocorrendo eventos isolados de reprodução sexuada. É comum a ocorrência de esterilidade feminina por mutação; esse é um fator importante na determinação da razão de gerações sexuais/assexuais, que pode ser de 1:15 a 1:2300, como por exemplo para *Giberella fujikuroi* (Leslie e Klein, 1996). Considerando a reprodução vegetativa como basal na natureza, a reprodução sexuada só ocorreria raramente, decorrente de uma adversidade no ambiente, por isso as estruturas reprodutivas de *C. sublineolum* podem não ter sido encontradas na natureza.

O isolamento e caracterização de todo o gene *MAT1-2* de *C. sublineolum* permitiu se conhecer a possível seqüência protéica deste fator de transcrição. A ausência de alteração genética que pudesse indicar comprometido funcional, como por exemplo a presença de códons de parada antecipados ou nos sítios de *splicing*, respalda a hipótese que a reprodução sexual pode acontecer nessa espécie, lembrando que Vaillancourt *et al.* (2000) conseguiram em laboratório realizar a reprodução sexuada na espécie aparentada *C. graminicola*.

Estudos realizados com *C. sublineolum* isolados de sorgo no Brasil, demonstraram que esses isolados são altamente heterogêneos em relação à virulência e que não há similaridade entre os dendrogramas gerados com dados relacionados à virulência e os dendrogramas gerados com dados obtidos com marcadores de RAPD (Valério *et al.*, 2005). As seqüências de *C. sublineolum* apresentaram-se extremamente homogêneas alcançando uma similaridade de até 99%, principalmente para a região HMG. Isso era esperado já que o HMG faz uma

diferenciação interespecífica apesar da alta taxa de evolução (Pöggeler, 1999). Os dados de Du *et al.* (2005) também mostraram uma grande homogeneidade das seqüências do HMG de *C. sublineolum* de diferentes regiões do mundo. O HMG serviu para mostrar um agrupamento dos isolados de Pelotas, mas é importante ressaltar que esses dados, pelo número de amostras utilizadas, representam apenas tendências, indicando possível variabilidade. Essa tendência não foi observada com o uso das seqüências ITS, apesar de esses dados terem separado os isolados de Sete Lagoas em um grupo à parte.

Neste trabalho, nas análises realizadas com os fungos *C. graminicola* e *C. sublineolum* a similaridade protéica da região do HMG de *MAT1-2* apresentou-se praticamente idêntica (1 aminoácido diferente em 55), retratando ainda mais a proximidade entre essas duas espécies. Quando a seqüência de DNA do HMG de *MAT1-2* de *C. graminicola* de *A. palustris* foi analisado notou-se similaridade com a região de *MAT1-2* de vários fungos (Chen *et al.*, 2002). Quando as seqüências foram comparadas com seqüências de *MAT1-2* de *C. graminicola* isolado de milho, houve 90-92% de similaridade, já quando a comparação foi com *MAT1-2* de *C. gloeosporioides*, a similaridade encontrada foi baixa (50-52%). Os dados deste trabalho confirmam a capacidade da região HMG em diferenciar isolados interespecificamente.

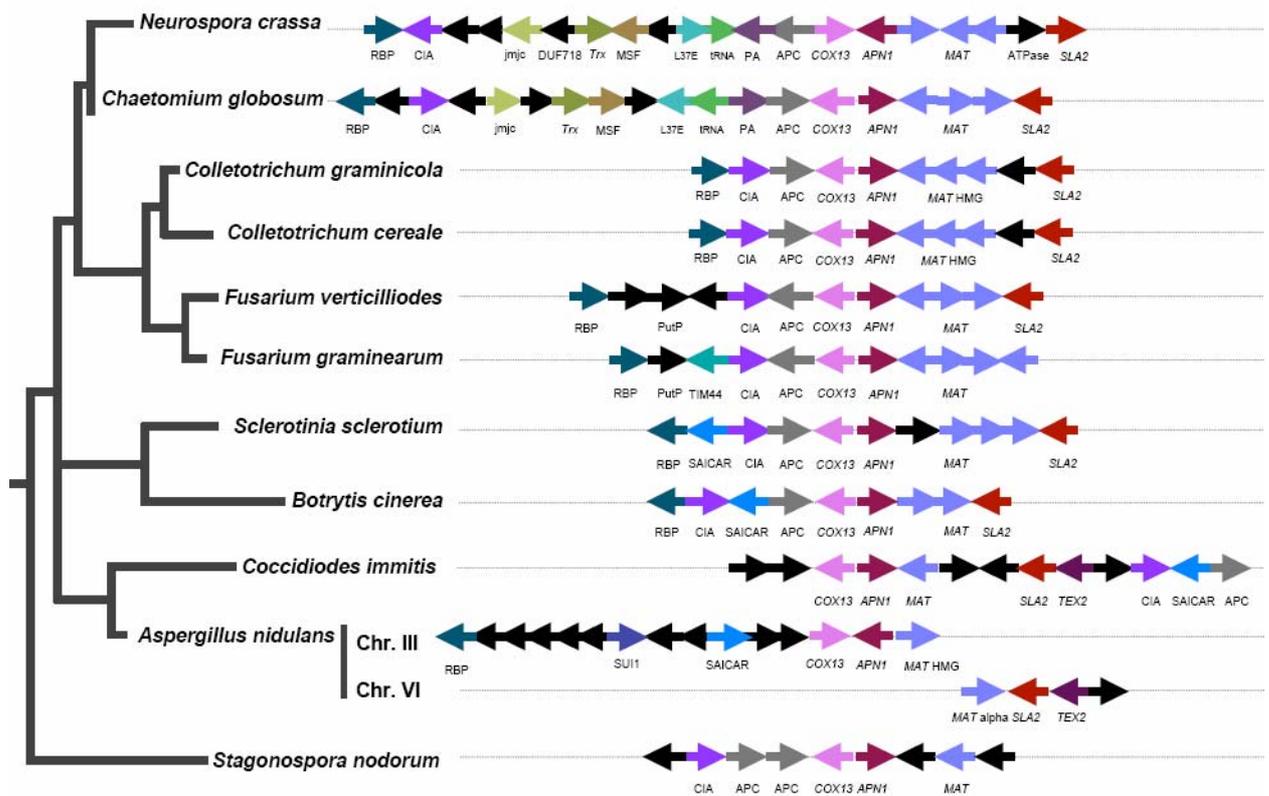


Figura 31: Evolução e arquitetura do *cluster* do gene *mating-type* em fungos filamentosos ascomicetos (Adaptado de Crouch, comunicação pessoal).

Em fungos ascomicetos existe uma grande sintenia no bloco gênico em que se localiza o loco *MAT* (Fraser *et al.*, 2004). Diversos estudos de identificação desse loco envolvido na reprodução sexuada demonstraram que os locos vizinhos apresentavam-se os mesmos até em espécies bem divergentes. Dados preliminares de J. A. Crouch (comunicação pessoal) as espécies *C. graminicola* e *C. sublineolum* seguem a mesma sintenia apresentada por fungos (Figura 31) como, por exemplo, *Fusarium graminearum*, *Coccidioides immitis*, *Neurospora crassa*, entre outros.

O presente estudo é o primeiro feito com linhagens brasileiras na tentativa de se isolar genes flanqueadores da região *Mat* de *Colletotrichum sublineolum*. Embora, não tenha sido possível investigar em detalhes todos os genes os quais os iniciadores estavam disponíveis, foi possível analisar uma importante região, a W1

que permitiu a identificação da DNA liase *APN1* a montante do loco *mating-type*. O gene *APN1* codifica uma DNA liase, cuja função é o reparo do DNA e é um dos genes adjacentes ao *MAT* na maioria das espécies estudadas até o momento. Essa região foi indicada por J. A. Crouch (comunicação pessoal) como eficiente na diferenciação intraespecífica de isolados de *C. cereale* e como discutido anteriormente, foi também eficiente em *C. sublineolum*.

Outro locos vizinhos de *MAT1-2* podem ser destacados, como o *COX13* que codifica a subunidade VI da citocromo oxidase c, e *SLA2* que codifica uma proteína de organização do citoesqueleto celular. Esses locos são freqüentemente identificados em estudos que visam a descrever o gene *MAT* de fungos ascomicetos, como no estudo desse loco em espécies de *Coccidioides* (Mandel *et al.*, 2007), em *Leptosphaeria maculans* (Cozijnsen e Howlett, 2002) e em *Neosartorya fischeri* (Rydholm, 2007). A finalização do projeto genoma de *C. graminicola* certamente deixará mais claro a organização desta região o que poderá ser de grande utilidade para se identificar mais facilmente os genes correspondentes em *C. sublineolum* e outras espécies do gênero que são menos estudadas, devido ao seu menor impacto econômico.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali, M.E.K., & Warren, H.L. (1987) Physiological races of *Colletotrichum graminicola* on sorghum. *Plant Disease* 71: 402-404.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., & Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Arie, T., Christiansen, S. K., Yoder, O. C. & Turgeon, B. G. (1997). Efficient cloning of ascomycete mating type genes by PCR amplification of the conserved *MAT* HMG box. *Fungal Genetics and Biology*, 21: 118-130.
- Arie, T., Kaneko, I., Yoshida, T., Noguchi, M., Nomura, Y., & Yamaguchi, I. (2000) Mating-type genes from asexual phytopathogenic ascomycetes *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata*. *Molecular Plant Microbe Interaction* 13: 1330-1339.
- Astell, C. R., Ahlstrom-Jonasson, L., Smith, M., Tacheltl, K., Nasmyth, K. A. & Hall, B. D. (1981). The sequence of the DNAs coding for the mating-type loci of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, 1: 15 - 23.
- Bain, J.M., Tavanti, A., Davidson, A.D., Jacobsen, M.D., Shaw D., Gow, N.A.R., & Odds, F.C. (2007). Multilocus Sequence Typing of the Pathogenic Fungus *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 45 (5): 1469-1477. □
- Bennett, R.S., Yun, S.H., Lee, T.Y., Turgeon, B.G., Arseniuk, E., Cunfer, B.M., & Bergstrom, G.C. (2003) Identity and conservation of mating type genes in geographically diverse isolates of *Phaeosphaeria nodorum*. *Fungal Genetics and Biology* 40: 25-37.
- Casela, C. R., Ferreira, A. S. & Schaffert, R. E. (1992). Sorghum disease in Brazil. In: De Milano, W. A. J., Frederiksen, R. A. & Bengston, G. D.. Sorghum and Millets disease: a second world review. Patancheru: India, ICRISAT, p: 57-62.

- Casela, C. R., Ferreira, A. S., Santos, F. G. (1998). Associação de virulência de *Colletotrichum graminicola* à resistência genética em sorgo. *Fitopatologia Brasileira*, 23: 143-146.
- Casela, C.R., & Frederiksen, R.A. (1993) Survival of *Colletotrichum-Graminicola* Sclerotia in Sorghum Stalk Residues. *Plant Disease* 77: 825-827.
- Chen, F., Goodwin, P. H., Khan, A. & Hsiang, T. (2002). Population structure and mating-type genes of *Colletotrichum graminicola* from *Agrostis palustris*. *Canadian Journal of Microbiology*, 48: 427-436.
- Cisar, C.R., & TeBeest, D.O. (1999) Mating-type system of the filamentous ascomycete *Glomerella cingulata*. *Current Genetics*, 35: 127-133.
- Coppin, E., Arnaise, S., Contamine, V. & Picard, M. (1993). Deletion of the mating-type sequences in *Podospora anserina* abolishes mating without affecting vegetative functions and sexual differentiation. *Molecular General Genetics*, 241: 409-414.
- Coppin, E., Debuchy, R., Arnaise, S. & Picard, M. (1997). Mating type and sexual development in filamentous ascomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61: 411-428.
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*, 16 (22), 10881-10890.
- Costa, R.V., Casela, C.R., Zambolim, L., & Ferreira, A.S. (2003) A antracnose do sorgo. *Fitopatologia Brasileira* 28: 345-354.
- Cozijnsen, A.J., & Hoelett, E.B. Characterisation of the mating-type locus of the plant pathogenic ascomycete *Leptosphaeria maculans*. (2003) *Current Genetics* 43: 351–357.

- Crouch, J.A., Clarke, B.B., & Hillman, B.I. (2006) Unraveling evolutionary relationships among the divergent lineages of *Colletotrichum* causing anthracnose disease in turfgrass and corn. *Phytopathology* 96: 46-60.
- Debuchy, R. & Coppin, E. (1992). The mating types of *Podospora anserina*: functional analysis and sequence of the fertilization domains. *Molecular General Genetics*, 233: 113-121.
- Du, M.Z. (2002) Use of the HMG Sequence of the MAT-2 Mating Type Gene for Phylogenetic Analysis of *Colletotrichum* Species Complexes M.S. Thesis. Lexington KY: University of Kentucky.
- Du, M.Z., Schardl, C.L., Nuckles, E.M., & Vaillancourt, L.J. (2005b) Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Collectotrichum* species complexes. *Mycologia* 97: 641-658.
- Dyer, P.S., Furneaux, P.A., Douhan, G., & Murray, T.D. (2001) A multiplex PCR test for determination of mating type applied to the plant pathogens *Tapesia yallundae* and *Tapesia acuformis*. *Fungal Genetics and Biology* 33: 173-180.
- Frederiksen R. A. & Bandyopadhyay R. (1999). Contemporary global movement of emerging plant diseases. *Annals of New York Academic Science*, 894: 28-36.
- Ferreira, A.S., & Casela, C.R. (1986) Raças patogênicas de *C. graminicola*, agente causal da antracnose em sorgo (*Sorghum bicolor*). *Fitopatologia Brasileira* 11: 83-87.
- Ferreira, A. S. & Casela, C. R. (1995). Ocorrência de *Claviceps sorghi*, agente causal da doença ergot no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, 20: 302.
- Ferreira, A. V. B., Saupe S. & Glass, N. L. (1996). Transcriptional analysis of the mtA idiomorph of *Neurospora crassa* identifies two genes in addition to *mtA-1*. *Molecular General Genetics*, 250: 767-774.

- Ferreira, A. V. B., An, Z., Metzberg, R. L. & Glass, N. L. (1998). Characterization of mat A-2, mat A-3 and matA Mating-Type Mutants of *Neurospora crassa*. *Genetics*, 48: 1068-1079.
- Fraser, J.A., Diezmann, S., Subaran, R.L., Allen, A., Lengeler, K.B., Dietrich, F.S., & Heitman, J. (2004). Convergent Evolution of Chromosomal Sex-Determining Regions in The Animal And Fungal Kingdoms. *PLoS biology*, 2 (12): 2243-2255.
- Gale, L. R. (2002). A population genetic approach to variation in *Colletotrichum graminicola*, the causal agent of sorghum anthracnose. In: Leslie, J. F.. *Sorghum and Millets Disease: World Agriculture Series*. p: 191-199.
- Glass, N. L., Vollmer, S. J., Staben, C., Grotelueschen, J., Metzberg, R. & Yanofsky, C. (1988). DNAs of the two mating-type alleles of *Neurospora crassa* are highly dissimilar. *Science*, 241: 570-573.
- Glass, N. L. & Kuldau, G. A. (1992). Mating type and vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes. *Annual Review of Phytopathology*, 30: 201-224.
- Groenner-Penna, M. (2005). Triagem de isolados do fungo *Colletotrichum graminicola* para a presença de genes *mating-type* como estratégia para verificar a estrutura de populações isoladas de culturas de sorgo. Monografia de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas com Ênfase em Genética, da Universidade Federal de Minas Gerais.
- Haber, J.E. (1998) Mating-type Gene Switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Genetics* 32: 561-599
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp.* Ser. 41:95-98.
- Herskowitz, I., Rine, J., & Strathern, J. (1992). Mating-type determination and mating-type interconversion in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *The Molecular and*

*Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Gene Expression* (Jones, E.W., Pringle, J.R., & Broach, J.R., eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, pp583-656.

Idnurm, A., Walton, F.J., Floyd, A., & Heitman, J. (2008). Identification of the sex genes in an early diverged fungus. *Nature*, 451: 193-196.

Kronstad, J. W. & Staben (1997). Mating type in filamentous fungi. *Annual Review of Genetic*, 31: 245-276.

Kuriena, B.T., & Scofield, R.H. (2002). Extraction of Nucleic Acid Fragments from Gels. *Analytical Biochemistry*, 302 (1): 1-9.

Larena, I., O. Salazar, V. Gonza'lez, M. Julia'n, & V. Rubio. (1999). Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. *Journal of Biotechnology*. 75:187–194.

Leslie, J. F. & Frederiksen, R. A. (1995). Variable Pathogens: A scenario. In: Leslie, J. F., Frederiksen, R. A. & Borlaug, N. , Disease analysis through genetics and biotechnology. Ames: Iowa State University, p:3-8.

Leslie, J. F. & Klein, K. K. (1996). Female fertility and mating type effective populations size and evolution in filamentous fungi. *Genetics*, 144: 557-567.

Mandel, M.A., Barker, B.M., Kroken, S., Ronsley, S.D., & Orbach, M. (2007). Genomic and Population Analyses of the Mating Type Loci in *Coccidioides* Species Reveal Evidence for Sexual Reproduction and Gene Acquisition. *Eukaryotic Cell*, 6 (7): 1189–1199.

Marcus, S. (2005). Colony PCR to Analyze *E. coli* Transformants. Disponível em: <http://www.chem.ualberta.ca/~bioservices/SOP%20files/DNA%20and%20protein%20SOPs/Colony%20PCR%20to%20Analyze%20Transformants.doc>. Acesso em: 22/08/2006 às 17:00.

- Metzenberg, R. L. & Glass, N. L. (1990). Mating type and mating strategies in *Neurospora*. *BioEssays*, 12: 53-59.
- Moller, E.M., Bahnweg, G., Sandermann, H., & Geiger, H.H. (1992) A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research* 20: 6115-6116.
- Odds, F.C., Bougnoux, M.E., Shaw, D.J., Bain, J.M., Davidson, A.D., Diogo, D., Jacobsen, M.D., Lecomte, M., Li, S., Tavanti, A., Maiden, M.C.J., Gow, N.A.R., & d'Enfert, C. (2007). Molecular Phylogenetics of *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 6 (6): 1041-1052.
- Paithankar, K.R., & Prasad, K.S.N. (1991) Precipitation of DNA by Polyethylene-Glycol and Ethanol. *Nucleic Acids Research* 19: 1346-1346.
- Pastor-Corrales, M.A., & Frederiksen, R.A. (1979) Sorghum reaction to anthracnose in the United States, Guatemala, and Brazil. *Sorghum Newsletter* 22: 127-128.
- Perkins, D. D. & Turner, B. C. (1988). *Neurospora* from natural populations: toward the population biology of haploid eukaryote. *Experimental Mycologia*, 12: 91-131.
- Pinto, N.F.J.A. (2003). Controle Químico da Antracnose (*Colletotrichum graminicola*) do Sorgo. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 2 (3): 148-152.
- Pöggeler, S. (1999). Phylogenetic relationships between mating-type sequences from homotallic and heterotallic ascomycetes. *Current Genetics*, 36: 222-231.
- Politis, D. J. (1975). The identity and perfect state of *Colletotrichum graminicola*. *Mycologia*, 67: 56-62.
- Pontes, D.S., Lima-Bittencourt, C.I., Chartone-Souza, E., & Nascimento, A.M.A. (2007). Molecular approaches: advantages and artifacts in assessing bacterial diversity. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 34: 463-473.

- Rodriguez-Guerra, R., Ramirez-Rueda, M.T., Cabral-Enciso, M., Garcia-Serrano, M., Lira-Maldonado, Z., Guevara-Gonzalez, R.G., Gonzalez-Chavira, M., & Simpson, J. (2005) Heterothallic mating observed between Mexican isolates of *Glomerella lindemuthiana*. *Mycologia* 97: 793-803.
- Rosewich, U. L., Pettway, R. E., McDonald, B. A., Duncan, R. R. & Frederiksen, R. A. (1998). Genetic structure and temporal dynamics of a *Colletotrichum graminicola* population in a sorghum disease nursery. *Ecology and Population Biology*, 88: 1087-1093.
- Rydholm, C., Dyer, P.S., & Lutzoni, F. (2007) DNA Sequence Characterization and Molecular Evolution of *MAT1* and *MAT2* Mating-Type Loci of the Self-Compatible Ascomycete Mold *Neosartorya fischeri*. *Eukaryotic Cell*, 6 (5): 868–874.
- Sambrook, J. & Russel, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Silva, C. C. (2003). Detecção de genes mating-type em leveduras e fungos filamentosos. Monografia de conclusão do Bacharelado em Genética, na Universidade Federal de Minas Gerais.
- Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Matthijs, J. S., Foster, J. W., Frischauf, A. M., Lovell-Badge, R. & Goodfellow, P. N. (1990). A gene from human sex determination region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 34: 240-244.
- Solomon, P.S., Parker, K., Loughman, R., & Oliver, R.P. (2004) Both mating types of *Phaeosphaeria* (anamorph *Stagonospora*) *nodorum* are present in Western Australia. *European Journal of Plant Pathology* 110: 763-766.
- Souza, C.A., Silva, C.C., & Ferreira, A.V. (2003) Sex in fungi: lessons of gene regulation. *Genetic and Molecular Research* 2: 136-147.

- Staben, C. & Yanofsky, C. (1990). *Neurospora crassa* a mating-type region. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87: 4917-4921.
- Sreenivasaprasad S, Mills PR, Meehan BM, & Brown AE. (1996). Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. *Genome*, 39 (3): 499-512.
- Sugimoto, A., Iino, Y., Maeda, T., Watanabe, Y. & Yamamoto, M. (1991). *Schizosaccharomyces pombe ste11+* encodes a transcriptional factor with a HMG motif that is critical regulator of sexual development. *Genes Development*, 5: 1990-1999.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Turgeon, B. G., Bohlmann, H., Ciuffetii, L. M., Christiansen, S. K., Yang, G., Schäfer, W. & Yoder, O. C. (1993). Cloning and analysis of cross fertility between two self-sterile strains of *Glomerella graminicola*. *Mycologia*, 92: 430-435.
- Turgeon, B. G. (1998). Application of mating type gene technology to problems in fungal biology. *Annual Review of Phytopathology*, 36:115 - 137.
- Turgeon, B. G. & Yoder, O. C. (2000). Proposed nomenclature for mating type genes of filamentous ascomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, 31: 1-5.
- Vaillancourt, L. & Hanau, R. (1992). A method for genetic analysis of *Glomerella graminicola* (*Colletotrichum graminicola*) from maize. *Phytopathology*, 81: 530-534.
- Vaillancourt, L.J., & Hanau, R.M. (1992) Genetic and Morphological Comparisons of *Glomerella* (*Colletotrichum*) Isolates from Maize and from Sorghum. *Experimental Mycology* 16: 219-229.

- Vaillancourt, L., Du, M., Wang, J., Rollins, J. & Hanau, R. (2000). Genetic analysis of cross fertility between two self-sterile strains of *Glomerella graminicola*. *Mycologia*, 92: 430-435.
- Vaillancourt, L., & Hanau, R. (2000). Genetic and morphological comparisons of *Glomerella (Colletotrichum)* isolates from maize and sorghum. *Experimental Mycologia*, 16: 219-229.
- Valério, H. M. (2004). Avaliação de misturas de diferentes linhagens de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) como estratégia para o manejo da antracnose (*Colletotrichum graminicola*). Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia – ICB – Universidade Federal de Minas Gerais.
- Valério, H. M., Resende, M. A., Weikert-Oliveira, R. C. B. & Casela, C. R. (2005). Virulence & molecular diversity in *Colletotrichum graminicola* from Brazil. *Mycopathology*, 159: 449-459.
- Wharton, P. S..The Sorghum Anthracnose WebPage. Disponível em:  
<http://www.sorghumanthracnose.org>. Acesso em 14/04/2005 às 15:00.
- Yun, S.H., Arie, T., Kaneko, I., Yoder, O.C., & Turgeon, B.G. (2000) Molecular organization of mating type loci in heterothallic, homothallic, and asexual *Gibberella/Fusarium* species. *Fungal Genetic and Biology* 31: 7-20.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)