
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-
GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA**

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS *Botryosphaeria
rhodina* PRODUTORES DE JASMONATOS**

ROZANA DE MEDEIROS SOUSA GALVÃO

**Manaus- AM
2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-
GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA**

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS *Botryosphaeria
rhodina* PRODUTORES DE JASMONATOS**

ROZANA DE MEDEIROS SOUSA GALVÃO

**Tese apresentada ao Programa Multi-
Institucional de Pós-Graduação em
Biotecnologia/Universidade Federal do
Amazonas, com requisito parcial para a
obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia, área de concentração:
Agroflorestal.**

Orientador: Prof. Dr. José Odair Pereira

**Manaus – AM
2008**

Ficha Catalográfica

Medeiros-Galvão, R. S.

G182d Diversidade genética de isolados de *Botryosphaeria rhodina* produtores de jasmonatos / Rozana de Medeiros Sousa Galvão.2008.

115 f: il. Color, 31 cm.

Orientador: Prof. Dr. José Odair Pereira

Tese (Doutorado) – Programa de Doutorado Multidisciplinar em Biotecnologia - Universidade Federal do Amazonas – 2008.

1 Jasmonatos 2. Região ITS 3. AFLP 4. *Botryosphaeria rhodina*. I. Pereira, José Odair II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

ROZANA DE MEDEIROS SOUSA GALVÃO

**DIVERSIDADE GENÉTICA DO ISOLADO
BOTRYOSPHAERIA RHODINA PRODUTOR DE
JASMONATOS**

**Tese apresentada ao Programa Multi-
Institucional de Pós-Graduação em
Biotecnologia/Universidade Federal do
Amazonas, com requisito parcial para a
obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia, área de concentração:
Agroflorestal.**

Aprovada em: 22/02/2008

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Lúcio Azevedo (CBA)

Profa. Dra Miriam Verginia Lourenço (UNAERP)

Profa. Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro (UFAM)

Profa. Dra. Mayra Kassawara Martins (CBA)

Prof. José Odair Pereira (UFAM)

A minha mãe Neliza, ao meu esposo Erison, as minhas filhas Rebecca, Beatriz e as famílias Medeiros e Galvão pelo apoio incondicional e incentivo para a realização deste trabalho, ofereço.

Ao Amigo Altair Fernandes dos Santos

(In memoriam)

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho em especial à:

À DEUS que é fonte de inspiração e sabedoria

Ao Prof. Dr. José Odair Pereira, pela orientação, apoio, incentivo, paciência e acima de tudo pela grande amizade.

Aos meus grandes amigos e professores da Genética/UFAM: Prof. Dr. José das Neves Falcão, Profa. Dra. Maria José Melo Freitas e Araújo (*in memorian*), Prof. Dr. Luiz Alberto dos Santos Monjeló, Prof. MsC. Altair Fernandes dos Santos (*in Memoriam*) e Prof. Valter Cantarini Guimarães que muito me incentivaram para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos do Departamento de Biologia/ICB em especial a amiga Profa. Msc. Martha de Aguiar Falcão e ao Prof. Dr. Paulo F. Burhnheim (*in memorian*) que muito me incentivaram para a realização deste trabalho.

A Profa. Dra. Suzelei de Castro França pelo grande apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho pelo incentivo e amizade.

A Profa. Dra. Izeni Pires Farias, pela amizade e incentivo.

A Profa. Dra. Doriane Picanço pela grande e valiosa amizade.

A Profa. Dra. Maria das Neves Souza da Silva Viana pela grande amizade.

A Profa. Dra. Miriam Lourenço pelas orientações, apoio e amizade.

A Profa. Dra. Lúcia Belém, Verônica e A...pelo grande apoio. meninas da Química

A Dra. Mayra K. Martins, pela colaboração e amizade.

Aos amigos Pedro de Queiroz Costa Neto, Themis de Jesus da Silva e Aline C. Rondon pela grande e intensa amizade.

Aos amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos, Aline, Luciana, Antonia...

Ao técnicos do Laboratório de Genética Animal, José Rufino, a amiga Elza Quadros e aos diversos estagiários que participaram diretamente deste trabalho.

À Universidade Federal do Amazonas, a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, ao Instituto de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Agrárias, ao Departamento de Biologia e ao Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA), pela oportunidade de realização deste trabalho e por todos os conhecimentos transmitidos.

Aos amigos e colegas do Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas pelas discussões científicas, pelos momentos agradáveis e paciência nos momentos difíceis.

Ao meu esposo Erison pelo companheirismo, compreensão, amor e dedicação.

As minhas princesas Rebecca e Beatriz pela compreensão, paciência, alegria e acima de tudo o amor.

A minha mãe Neliza que com todo o esforço, dedicação e compreensão contribuiu para o término deste trabalho.

A todos que, de uma forma ou de outra colaboraram para realização deste trabalho.

AGRADEÇO

**Contigo posso avançar
contra uma tropa; com o
meu Deus posso transpor
muralhas
Samuel 22.1-3**

RESUMO

Os microrganismos produzem substâncias químicas como resultado do metabolismo primário e secundário. No metabolismo secundário estão envolvidas vias metabólicas para a síntese de produtos naturais que não são essenciais para o crescimento do organismo produtor. O fungo *Botryosphaeria rhodina*, tem despertado um interesse crescente devido à produção de uma série de ácidos graxos ciclopentanos, do tipo ácido jasmônico (AJ), com propriedades reguladoras do crescimento de plantas superiores. Usualmente o AJ é um regulador de crescimento vegetal endógeno, sintetizado de maneira natural por uma grande variedade de plantas, pertence aos reguladores de crescimento vegetal (RCV) denominados jasmonatos, sendo os mais representativos o ácido (-)-jasmônico (-)-AJ e o ácido(+)-7-isojasmônico [(+)-7-isoAJ] os quais se encontram amplamente distribuídos nas plantas. AJ tem inúmeras aplicações conhecidas tais como a utilização do AJ na fabricação de perfumes; na produção do chá preto; na redução do consumo de estimulador de crescimento; na produção de malte em indústrias de cerveja; no aumento da produção de taxol; na produção de flavorizantes alimentícios, entre outros. Os microrganismos produzem substâncias químicas como resultado do metabolismo primário e secundário. No metabolismo secundário estão envolvidas vias metabólicas para a síntese de produtos naturais que não são essenciais para o crescimento do organismo produtor. O fungo *B. rhodina*, tem despertado um interesse crescente devido à produção de uma série de ácidos graxos ciclopentanos, do tipo AJ, com propriedades reguladoras do crescimento de plantas superiores. A importância crescente do uso de microrganismos na biotecnologia nos levou a propor a prospecção dos metabólitos produzidos pelos microrganismos existentes em espécies vegetais da Amazônia. Desse modo, foram obtidos isolados de *B. rhodina* capazes de produzir o ácido jasmônico e seus derivados os quais foram caracterizados geneticamente por meio de seqüenciamento do DNA ribossomal e pela técnica de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados). Trinta e quatro linhagens de *B. rhodina* isoladas como patógenos de plantas tropicais, tais como: citros, manga, mogno africano, mamão, cupuaçu e madeira cortada foram analisadas para verificar a capacidade de produção de AJ utilizando-se a metodologia de Miersch et al., 1989. Os ensaios para produção de AJ e seus derivados foram realizados em meio Miersch (M1) e Miersch Modificado (M2) e, avaliados em placas de Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e quantificados por meio de Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Após a avaliação da produção de jasmonatos as linhagens foram submetidas à análise molecular de regiões ITS

do rDNA para avaliação da diversidade genética. A extração do DNA foi realizada por métodos clássicos, seguido da amplificação das regiões conservadas ITS do rDNA por meio da técnica de PCR, onde foram utilizados os oligonucleotídeos ITS1 e ITS4. A distância genética entre as linhagens variou de 0 a 1,6%. A taxa de transição/transversão foi de 1,2. Os alinhamentos foram submetidos ainda ao Programa TCS, resultando na identificação de nove haplótipos e 10 sítios polimórficos. A matriz de distância genética assim como a árvore filogenética resultante mostrou pouca divergência genética nas regiões de DNA analisadas. Também foi feita a análise das linhagens de *B. rhodina* por meio de marcadores moleculares AFLP. Para a obtenção dos resultados foram utilizadas quatro combinações de iniciadores nas reações AFLP, possibilitando a geração de 300 marcadores polimórficos. O número médio de bandas obtidas por iniciador foi de 79% e a porcentagem de bandas polimórficas foi de 95%. A distância genética entre as linhagens de *B. rhodina* foi de 29,19%, e a porcentagem de loci polimórfico foi de 0,95%. Todas as linhagens investigadas foram agrupadas em quatro grupos e foram obtidos indicadores de alta variabilidade genética entre todos os isolados.

Palavras Chaves: Ácido Jasmônico, *Botryosphaeria rhodina*, rDNA, Marcadores AFLP

ABSTRACT

In this work three Brazilian *B. rhodina*, and also two strains from Cuba, selected for their ability to produce jasmonate compounds, were submitted to molecular analysis of internal transcribed spacers- ITS regions of rDNA to characterize their genetic variability. rDNA extraction procedures were conducted according classic protocols followed by amplification, via the PCR technique, of conserved ITS regions with the primers ITS1 and ITS4. The PCR products were purified using the GFX purification kit (*GE-Healthcare*), resolved in “MegaBace” 1000 – DNA Analysis System (*GE-Healthcar*) and further identified by comparative analysis with ITS regions of rDNA sequences from the databases available at the *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Analyses were performed with the BLAST tool and the multiple alignments of sequences with Clustal W program from the computational package BioEdit. Moreover, analysis using the TCS program resulted in the identification of nine haplotypes separated by ten polymorphic sites. AFLP analyses were also implemented using four combinations of oligonucleotide primers which resulted in the generation of 300 polymorphic markers. The mean number of amplified fragments by primer pair was 79 with up to 95% of polymorphic bands. The genetic distance between *B. rhodina* strains was estimated in 29.19%. Dendogram constructed with Jaccard’s coefficient of similarity showed that analyzed strains were assembled in four groups with high genetic variability found in all strains.

Keywords: *Botryosphaeria rhodina*, Jasmonates, rDNA, AFLP markers

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do Ácido Jasmônico.....	15
Figura 2 – Modelo esquemático da estrutura do rDNA com destaque o acoplamento dos iniciadores para amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2-18S 5,8S e 28S.....	22
Figura 3 – Esquema da Biossíntese do Ácido Jasmônico, seu éster metil jasmonatos (MeAJ) e seus derivados (jasmonatos), sintetizados a partir do ácido linolênico e linoleico através da via dos octadecanóicos.....	37
Figura 4 – Linhagens de <i>B. rhodina</i> , em diferentes meios de cultura: A) Sólido; B) Massa Micelial após a filtração e C) Meio Líquido filtrado, para iniciar a extração do AJ.....	48
Figura 5 – Curva de Crescimento de 7 linhagens de <i>B. rhodina</i> utilizando-se meio Malte-Ágar sólido.....	49
Figura 6 – Curva de Crescimento de 7 linhagens de <i>B. rhodina</i> em meio Miersch sólido.....	50
Figura 7 – Crescimento das linhagens de <i>B. rhodina</i> nos meios Malte-Ágar (MA) e Meio Miersch (M1) após 5 dias.....	51
Figura 8 - CCDC das amostras no 13º dia de fermentação no meio M1: 1 – Padrão de AJ; 2 – Linhagem C 83; 3 - Linhagem C 3.4.7.9; 4 – Padrão de AJ; 5 – Linhagem Kijn 3.1.....	52
Figura 9 — Perfil Cromatográfico das amostras de fermentação no meio MIERSCH Modificado (M2) em CCDC em linhagens de <i>B. rhodina</i> : (C 83, C 81, Mg 1, Mg 03, Mg 06, Mg 08, Mg 09, Mg 10, Mg 11, Mg 12, Mg 13, Mg 14, Mg 15, Mg 16, Mg 17, Mg 18, Mg 19, Mg 20, Mg 21. Padrão de AG e Ácido Jasmônico (AJ).....	53
Figura 10 – Perfil cromatográfico do composto Fr6 (Rt – 12.23 produzido pela linhagem Kifn 3.1.....	56
Figura 11 – Haplótipos identificados com o Programa TCS. Foram obtidos nove haplótipos de <i>Botryosphaeria rhodina</i> . O haplótipo com maior probabilidade de ser o ancestral está representado no quadrado. Os valores identificados na figura significam em quais sítios ocorreram as mutações e os círculos o significam haplótipos não amostrados.....	71

Figura 12 – Porcentagem de bases 23,2% de adenina, 24,2% de timina, 24,1% de guanina e 28,2% de citocina.....	75
Figura 13 – Árvore filogenética da distância genética entre os trinta e três isolados de <i>Botryosphaeria rhodina</i> baseado nas sequências das regiões ITS. A árvore foi construída, utilizando o método de <i>neighbor-joining</i> /Programa Mega. Uma análise de <i>bootstrap</i> foi feita com 1000 repetições.....	78
Figura 14 – Padrão de DNA genômico de <i>B. rhodina</i> amplificado pela técnica de AFLP, utilizando-se duas combinações de primers (EcoRI+AT/MseI+C). M = Marcador de peso molecular (50pb); Linhagens = 1 -33.....	95
Figura 15 – Dendrograma de similaridade genética entre linhagens de <i>B. rhodina</i> baseado em análise de agrupamento UPGMA usando coeficientes de similaridade de Jaccard para o perfil obtido por meio dos primers de AFLP EcoRI+AG/MseI+C, EcoRI+AT/MseI+C EcoRI+TA/MseI+C e EcoRI+TC/MseI+C, com <i>bootstrap</i> de 1000 repetições.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Linhagens de <i>Botryosphaeria rhodina</i> utilizados nos ensaios da produção de jasmonatos; Local de coleta e hospedeiros/parte da planta (folha, frutos e madeira).....	39
Tabela 2 - Diferença morfológica entre algumas linhagens de <i>B. rhodina</i> cultivadas em meio MA: malte-ágar e em M1: meio Miersch.....	46
Tabela 3 - Velocidade de crescimento de <i>B. rhodina</i> em meio Malte- Agar.....	48
Tabela 4 - Velocidade de crescimento de <i>B. rhodina</i> em meio Miersch.....	49
Tabela 5 - Quantificação de AJ produzido pelas linhagens de <i>Botryosphaeria rhodina</i> em fermentação submersa por 13 dias, utilizando meio de cultivo Miesch Modificado (M2).....	54
Tabela 6 – Linhagens de <i>Botryosphaeria rhodina</i> , Hospedeiros, Local de Coleta, e Sequência Correspondente no GenBank.....	69
Tabela 7 - Substituições de bases (Transição/Transversão - TS/TV).....	73
Tabela 8 - Distância genética (em %) entre as trinta e três linhagens de <i>Botryosphaeria rhodina</i>	76
Tabela 09 - Combinação de oligonucleotídeos (Gibco BRL) utilizados no estudo sobre variabilidade de linhagens de <i>Botryosphaeria rhodina</i> produtoras de jasmonatos.....	89
Tabela 10 - Combinações de Iniciadores nas reações AFLP e respectivos números médios de bandas, a porcentagem de bandas polimórficas das Linhagens de <i>B. rhodina</i>	93
Tabela 11 – Matriz de similaridade genética entre 33 linhagens de <i>B. rhodina</i> obtidos de diferentes hospedeiros tropicais, comparados par a par utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard.....	96
Tabela 12 – Menores índices de distanciamento genético entre as linhagens de <i>B. rhodina</i>	97

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	09
1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
1.1. Característica do Gênero <i>Botryosphaeria</i>	11
1.2 Ácido Jasmônico Produzido por <i>Botryosphaeria rhodina</i>	13
1.2.1 Produção de Jasmonatos.....	16
1.2.2 Detecção e Quantificação dos Jasmonatos.....	18
1.2.2.1 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (TLC-CCDC).....	18
1.2.2.2. Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC).....	18
1.3. Análise da Variabilidade Genética em Microrganismos.....	19
1.3.1 Métodos Moleculares para detecção de diversidade genética.....	19
1.3.2 Identificação Molecular de <i>Botryosphaeria</i>	20
1.4 Evolução dos Genes Nucleares de RNA Ribossômico.....	21
1.5 Marcadores Moleculares AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).....	22
1.5.1 Digestão do DNA genômico.....	23
1.5.2 Ligação dos adaptadores.....	25
1.5.3 Amplificação Seletiva.....	25
1.5.4 Análise no gel.....	27
1.6 Caracterização dos Marcadores AFLP.....	27
1.7 Análise dos Marcadores AFLP.....	29
1.8 Vantagens dos Marcadores AFLP.....	30
1.9 Limitações dos Marcadores AFLP.....	31
2 PRODUÇÃO DE ÁCIDO JASMÔNICO E SEUS DERIVADOS POR FUNGO <i>Botryosphaeria rhodina</i> ISOLADOS DE PLANTAS TROPICAIS.....	32
RESUMO.....	32
ABSTRACT.....	33
2.1 INTRODUÇÃO.....	34
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
2.2.1 Material Biológico.....	38
2.2.2 Amostras.....	41
2.2.3 Meio de Cultura.....	41
2.2.4 Soluções para Isolamento de Microrganismos.....	41
2.2.5 Soluções para Extração e Identificação de Ácido Jasmônico.....	42
2.2.6 Isolamento de fungos.....	42
2.2.7 Identificação dos Fungos Isolados.....	43
2.2.8 Determinação da Produção de Jasmonatos pelas Linhagens de <i>Botryosphaeria rhodina</i>	44
2.2.8.1 Crescimento das Isolados em Cultivo Submerso (Fermentação).....	44
2.2.8.2 Métodos Analíticos.....	44
2.2.8.3 Extração, detecção e quantificação de AJ nos fermentados.....	45
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	47
2.3.1 Caracterização morfológica de <i>Botryosphaeria rhodina</i>	47
2.3.2 Determinação da Velocidade de Crescimento em Malte-agar e Meio Miersch...	49
2.3.2.1 Observações fisiológicas do crescimento.....	49
2.3.3 Detecção de Jasmonatos produzidos por <i>Botryosphaeria rhodina</i> por meio de Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC).....	52
2.3.4 Perfil cromatográfico da linhagem <i>B. rhodina</i>	54

2.4. CONCLUSÃO.....	58
3. DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE <i>Botryosphaeria rhodina</i> PRODUTOR DE JASMONATOS.....	60
RESUMO.....	60
ABSTRACT.....	61
3.1 INTRODUÇÃO.....	63
3.2 MATERIAL DE MÉTODOS.....	64
3.2.1 Material Biológico.....	64
3.2.2 Amostras.....	64
3.2.3 Preparação dos Inóculos.....	65
3.2.4 Extração de Ácidos Nucleicos.....	65
3.2.5 Quantificação do DNA.....	66
3.2.6 Amplificação das Regiões ITS do rDNA.....	66
3.2.7 Purificação do produto amplificado.....	67
3.2.8 Sequenciamento das Regiões ITS + 5,8S + ITS2 do rDNA.....	67
3.2.9 Análise das Sequências Nucleotídicas das Regiões ITS.....	68
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
3.3.1 Análise molecular.....	69
3.3.2 Análise filogenética.....	73
3.4 CONCLUSÃO.....	81
4. DIVERSIDADE GENÉTICA DETECTADA POR AFLP EM LINHAGENS DE <i>Botryosphaeria rhodina</i> PRODUTORAS DE JASMONATOS.....	83
RESUMO.....	83
ABSTRACT.....	84
4.1. INTRODUÇÃO.....	85
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	88
4.2.1 Material Biológico.....	88
4.2.2 Extração de Ácidos Nucléicos.....	88
4.2.3 Análise de Polimorfismo por meio de Marcadores Moleculares AFLP.....	91
4.2.4 Análise de Similaridade Genética por Meio de AFLPs.....	93
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	93
4.3.1. Análise de Marcadores AFLP.....	95
4.3.2. Variabilidade Genética das Linhagens de <i>B. rhodina</i>	103
4.4 ONCLUSÃO.....	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104

INTRODUÇÃO

Os fungos dentre outros microrganismos (bactérias, algas, vírus, protozoários) se destacam não só pela quantidade de espécies conhecidas como também pelas inúmeras aplicações que eles apresentam nas áreas de saúde, nutrição, agricultura energia e meio ambiente. Por outro lado, também são conhecidos os microrganismos patogênicos os quais apesar de serem representativos em número de espécies estão entre os principais microrganismos estudados pelo homem em função de sua importância econômica e a necessidade de se evitar danos em culturas agrícolas (AZEVEDO et al., 2002).

Microrganismos são responsáveis pela produção de importantes ácidos orgânicos, como o ácido cítrico, fármacos, como alguns antibióticos, enzimas de interesse industrial e de elevado valor econômico, destacando-se as celulases, lacases, xilanases, pectinases, amilases, produção de etanol além de representarem papel de destaque no controle de importantes pragas agrícolas (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004).

A diversidade genética dentro de uma espécie é afetada frequentemente pelo comportamento produtivo de indivíduos dentro de populações. Essa variação genética surge porque indivíduos têm formas suavemente diferentes de seus genes. Essas formas diferentes de um gene são conhecidas como alelos e as diferenças podem surgir através de mutações de genes e da recombinação de genes durante a reprodução sexual. Essa variação genética permite que as espécies se adaptem às condições ambientais, por meio de processo de seleção natural (TAMARIN, 1993).

A recombinação cria novas combinações alélicas que podem ser adaptativas. Esse fato explica porque os microrganismos possuem uma importância especial na adaptação ao ambiente em constante transformação. Eles se adaptam rapidamente a muitos compostos orgânicos sintéticos lançados na natureza, um processo evolutivo resultado da seleção de enzimas sintetizadas por essas populações recombinantes (MELO et al., 2002).

Botryosphaeria rhodina é um gênero rico em espécies com uma distribuição cosmopolita, podendo causar danos em diversas madeiras comerciais, árvores frutíferas e ornamentais. Manifestações patogênicas desse fungo caracterizam-se por lesões necróticas no tronco e nos galhos com intensa produção de gomose levando a morte progressiva do ápice das árvores, um processo denominado *dieback* (CROUS, et. al., 2006). Por outro lado *B. rhodina* também pode produzir metabólitos de importância econômica como o ácido jasmônico.

Os jasmonatos (AJs) são compostos derivados de lipídeos que regulam o crescimento, o desenvolvimento e a resposta a estresses em plantas. Sua principal atividade é a indução da expressão gênica, embora pouco seja conhecido sobre os componentes que ativam e os que transmitem sinais que desencadeiam respostas fisiológicas (ROSA JUNIOR, 2005).

A importância crescente do uso de microrganismos na biotecnologia nos levou a propor a prospecção dos metabólitos produzidos pelos microrganismos existentes em espécies vegetais da Amazônia. Desse modo, foram obtidos isolados de *Botryosphaeria rhodina* capazes de produzir o ácido jasmônico e seus derivados os quais foram caracterizados geneticamente por meio de sequenciamento do DNA ribossomal e pela técnica de Polimorfismo de tamanho de fragmentos amplificados (AFLP).

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Característica do Gênero *Botryosphaeria*

Botryosphaeria tem sido relatado com frequência como um fitopatógeno com distribuição mundial, causando doenças em diversas plantas de importância econômica como: *Eucalyptus citridora* (SILVEIRA et al., 1996), melaleuca – *Melaleuca quinquenervia* (RAYACHHETRY e ELLIOT, 1997), acácia (ROUX e WINGFIELD, 1997), pinheiro e ciprestes (ENCINAS e DANIEL, 1999), árvores frutíferas (BOOKS e FERRIN, 1994; LI et al., 1995; KIM et al., 2001; CARDOSO, MAIA e PESSOA, 2002) e ornamentais (RAMOS et al., 1997; YUAN e MOHAMMED, 1999; SWART et al., 2000; SANCHEZ et al., 2003).

Botryosphaeria está presente em mais de 500 hospedeiros, aqui incluídos um grande número de frutas tropicais tais como cajueiro, coqueiro, goiabeira, gravioleira, mamoeiro, videira, tamareira, etc.

O gênero *Botryosphaeria* pertence ao Domínio: Eucariota; Reino: Fungi; Filo Ascomycota; Classe: Pyrenomycetes ou Loculoascomycetes; Ordem: Dothideales; Família: Botryosphaeriaceae (GUARRO, GENÉ e STCHIGEL, 1999).

Os anamorfos de *Botryosphaeria* podem ser classificados em: *Botryodiplodia* (*Lasiodiplodia*), *Dothiorella*, *Diplodia*, *Macrophoma* e *Sphaeropsi*. (CROUS e PALM, 1999).

O gênero *Botryosphaeria* (Ces. & De Not.) apresenta um estroma preto, multiloculado, às vezes uniloculado, ostiolado, pescoço curto, agregado e irrompente através do tecido. Apresentam parede ascomal espessa, pseudoparenquimatosa, células externas de paredes espessas, marrom escuro, e as internas menores, hialinas e paredes delgadas. Centro com numerosas pseudoparáfises filamentosas. Ascospores bitunicados, clavados ou oblongos, pedicelados ou sésseis, 8 ascospores. Ascospores hialinos e unicelulares, tornando-se marrom e septados em algumas espécies; ovóides, fusoides a elipsóide, inequilateral; mais largos no

meio, liso, ocasionalmente verrugosos, às vezes com uma camada gelatinosa fina (HANLIN, 1996).

As espécies de *Botryosphaeria* são comuns, geralmente na fase anamórfica. Há discordância na literatura quanto a delimitação do gênero e das espécies. Barr inclui *Guignardia* Viala & Ravaz como sinônimo de *Botryosphaeria*, mas Sivanesan não (SIVANESAN, 1984).

Apesar de poder penetrar diretamente nos tecidos sadios do hospedeiro, seu desenvolvimento é muito mais intenso quando a infecção ocorre através de um ferimento. Lesões causadas por outros patógenos como *Colletotrichum* sp, *Oidium* sp e *Xanthomonas* sp, favorecem a penetração de *Botryosphaeria* (KIMATI et al., 1997).

Algumas espécies de *Botryosphaeria* tem sido citadas como endofíticas em eucalipto (SMITH; WINGFIELD; PETRINI, 1996).

O *B. rhodina*, causa à podridão negra dos frutos, também chamada de podridão interna dos frutos. Geralmente, *B. rhodina*, aproveita ferimentos externos na casca dos frutos, provocados por insetos, problemas fisiológicos ou danos mecânicos, para penetrar nos frutos e provocar o apodrecimento da polpa, a qual fica enegrecida ou por vezes, amarelada e liquefeita. Os conídios são inicialmente hialinos, unicelulares, e de parede celular grossa, tornando-se posteriormente pigmentados de marrom-escuro, uniseptados com estrias longitudinais (SWART et al., 2000).

Botryosphaeria possui uma grande capacidade para utilizar os carboidratos como única fonte de carbono e energia, pois cresce rapidamente na presença de altas concentrações de amido e sacarose. O seu grande poder de penetração em tecidos vegetais explica a rapidez com que é capaz de multiplicação nos frutos e nas plantas (CROUS et al., 2006).

Botryosphaeria apresenta aproximadamente 18 gêneros anamorfos associados a *Diplodia* (conídios principalmente ovóides, pigmentados), ou *Fusicoccum* (conídios

principalmente fusoides hialinos). Porém há numerosos anamorfos conidiais que tem características morfológicas intermediárias entre *Diplodia* e *Fusicoccum*. (CROUS et al., 2006).

1.2 Ácido Jasmônico Produzido por *Botryosphaeria rhodina*

O estudo das interações fisiológico-bioquímico-moleculares que ocorrem entre plantas e seus patógenos têm recebido atenção crescente. Hoje, já se entendem melhor os mecanismos envolvidos na produção de sintomas de certas doenças, bem como detalhes bioquímicos da atividade agressora de inúmeros fitopatógenos. Atualmente com base nos estudos com a planta modelo *Arabidopsis thaliana*, os mecanismos de defesa das plantas tem sido mais bem compreendidos (MEDEIROS, 2003).

Os primeiros estudos sobre a produção de jasmonatos por via microbiana se deram em 1968 por Broadbent et al., (1968), a partir do crescimento de *Lasiodiplodia theobromae* anamorfo de *Botryodiplodia theobromae*. Aldridge et al., (1971) relataram a produção de jasmonatos com rendimento de 500 mg/L após 13 dias de cultivo do fungo *B. theobromae*. Já no início da década de 80, novas descobertas foram feitas em relação à produção de jasmonatos utilizando o fungo *B. theobromae*, onde a linhagem selecionada produziu após 7 dias de cultivo em meio líquido contendo sacarose, farinha de soja, licor de milho e soluções de sais, 800mg/L do ácido (+)7-isojasmônico (isoAJ) como único produto biossintético (MIERSCH et al., 1987).

O grande interesse comercial da indústria do perfume por ácido jasmônico tem estimulado fortemente o estudo de sua estrutura e síntese. (LEMUS et al., 2000).

O Ácido Jasmônico (AJ), seu metil éster (MeAJ) e seus derivados (jamonatos) estão amplamente distribuídos no reino vegetal e são sintetizados a partir do ácido linolênico e linoléico por meio da via dos octadecanóicos. Estes ácidos graxos de 18 átomos de carbono (C18), derivados de lipídeos de membrana, representam na atualidade um novo tipo de

fitormônio que desempenham papéis cruciais no crescimento, desenvolvimento e respostas a diferentes condições de estresse ambiental da planta (CORTÊS, 2000). Vários trabalhos nos últimos anos têm permitido descrever a participação chave destas moléculas na regulação das respostas dos vegetais, relacionados com a depredação e ataque de patógenos.

Os jasmonatos encontram-se amplamente distribuídos nas plantas (150 famílias e 206 espécies). Os mais representativos correspondem ao ácido (-) jasmônico {(-)-AJ} e o ácido (+) -7- isojasmônico {(+)-7-iso AJ} (SALISBURY & ROSS, 1992).

O AJ influencia em vários aspectos o crescimento e desenvolvimento do vegetal. Tem-se sugerido que os jasmonatos participam na via transdutora de sinais associados às respostas de injúria mecânica, processos de senescência, abscisão de folhas, inibição de germinação e indução de tubérculos. A função que mais chamou a atenção de pesquisadores foi à capacidade de promover a senescência das folhas. A resposta à senescência inclui perda de clorofila, degradação de proteínas do cloroplasto, acúmulo de novas proteínas que interferem no processo de fotossíntese e aumento nos níveis de proteases e peroxidases (CORTÊS, 2000).

Parthier (1990) e Koda (1992) afirmaram que a degradação da clorofila acompanhada de outros efeitos tais como o incremento da respiração celular, atividade da protease e peroxidase e a redução da atividade fotossintética caracterizam a indução da senescência das folhas pelos jasmonatos. O AJ desempenha ainda um papel importante na defesa das plantas contra danos causados por raios UV-B e UV-C (SCHALLER, 2001).

O AJ, com sua fórmula empírica de $C_{12}H_{18}O_3$ (Figura. 01), e peso molecular 210, é um óleo amarelo viscoso em seu estado puro. Em temperatura ambiente é solúvel em clorofórmio, acetato de etila, acetona e éter e pouco solúvel em água. (ALTUNA et al., 1999).

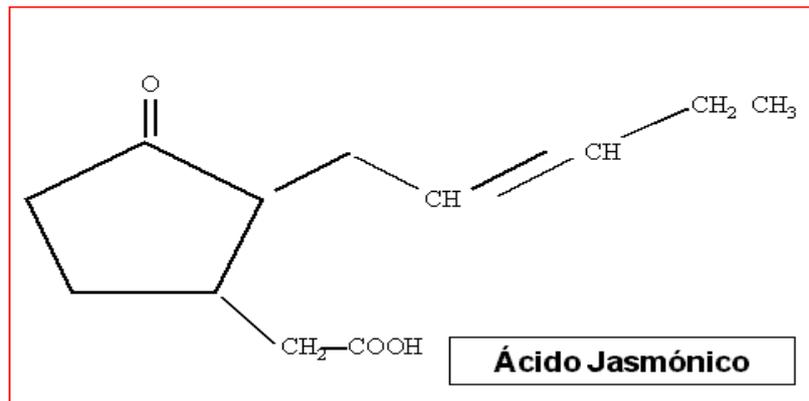


Figura 1 - Estrutura do Ácido Jasmônico.

O ácido jasmônico (AJ) e seus derivados, denominados jasmonatos constituem um grupo de substâncias endógenas reguladoras do crescimento vegetal, identificadas em uma grande variedade de espécies vegetais (MEYER et al., 1984).

O AJ tem inúmeras aplicações conhecidas atualmente. Dentre a documentação patentada, podemos ressaltar alguns exemplos, como a utilização do AJ na fabricação de perfumes, o qual provoca um aumento e fortalecimento da fragrância; na produção do chá preto, provocando um aumento do aroma do chá; na redução do consumo de estimulador de crescimento na produção de malte em indústrias de cerveja; no aumento da produção de taxol, importante agente terapêutico; na produção de flavorizantes alimentícios, entre outros (LEMUS, 2000).

A aplicação de AJ resultou na produção de inibidores de proteases em plantas de *Lycopersicum esculentum* (tomate), (FARNER & RYAN, 1990) e tubérculos de *Solanum* (batata), (YAMAGASHI, 1993), enquanto que em *Oryza sativa* (arroz) inibiu a germinação de esporos de *Pyricularia oryzae*, fungo que provoca a doença conhecida como tizão do arroz (HAMBERG, 1992). A resposta de folhas de plantas de arroz ao estresse induzido por AJ caracterizou-se por uma significativa alteração no padrão de proteína com a indução de cerca de doze proteínas, várias delas com alta homologia com proteínas relacionadas a patogenicidade, como a taumatina, uma proteína da classe PR5; um precursor de beta 1,3-

glucanase; uma PR proteína intracelular codificada pelo gene PBZI e uma proteína antifúngica. Tais resultados sugerem que o AJ desempenha um papel no mecanismo de defesa próprio do arroz (RAKWAL et al., 2000). Soluções aquosas de metil jasmonato ($5 \times 10^{-6} M$) aplicadas a plantas de *Glycine max* (soja), induziram aumento no teor de proteínas reserva das raízes maduras e nos talos (MASON & MULLET, 1990).

1.2.1 Produção de Jasmonatos

A obtenção de AJ e seus derivados, pode ocorrer por meio de processo extrativo de plantas superiores, por via química, ou ainda por fermentação microbiana. A via predominante de obtenção é a extração de fontes naturais. O baixo rendimento desse produto justifica o seu alto custo no mercado (ALTUNA et al., 2000).

O conhecimento sobre a produção de jasmonatos a partir de microrganismos seja ainda limitado, alguns relatos demonstraram ser esta a via mais vantajosa economicamente. Segundo Miersch et al., (1989), as linhagens *B. theobromae* e *Gibberella fujikuroi* são as mais representativas produtoras deste composto.

Os estudos realizados em cultivo líquido revelaram que *B. rhodina* é capaz de produzir este tipo de substância como resultado de seu metabolismo secundário com rendimentos satisfatórios, (MIERSCH et al., 1987).

Os primeiros estudos sobre a produção de jasmonatos por via microbiana se deram em 1968 por BROADBENT et al., (1968). Partindo de um meio contendo glicose, glicerol ou uma mistura dos dois como fonte de carbono, um nitrato de metal alcalino ou um sal de amônio, licor de milho, peptona, extrato de levedura e a partir do crescimento de *L. theobromae* (syn *B. theobromae*) obtiveram jasmonatos. ALDRIDGE et al., (1971) relataram a produção de jasmonatos com rendimento de 500 mg/L após 13 dias de cultivo do fungo *B. theobromae* em frascos de 1L, contendo meio Czapek.

No início da década de 80 novas descobertas foram feitas em relação à produção de jasmonatos utilizando o fungo *B. theobromae*, onde a linhagem selecionada produziu após sete dias de cultivo em meio líquido contendo sacarose, farinha de soja, licor de milho e soluções de sais, 800 mg/L do ácido (+) 7-isojasmônico (isoAJ) como único produto biossintético (MIERSCH et al., 1987).

No início da década de 90, Miersch et al., (1993) publicaram resultados com 46 espécies de fungos pertencentes a 23 gêneros entre eles *Micena*, *Aspergillus*, *Collybia*, *Coprinus*, *Daedalea*, *Fomes*, *Fusarium*, *Gleoporus*, *Polyporus*, *Rhizoctonia*, *Stropharia*, *Trichoderma*, avaliados sob as mesmas condições do cultivo de *B. theobromae*.

Uma alta produção de jasmonatos também foi obtida utilizando a frutose e a dextrose, possivelmente pelo fato de não necessitarem de hidrólise enzimática prévia, como acontece na assimilação da sacarose, do amido e da lactose (ENG et al., 1998).

Há correlação inversa entre produção de jasmonatos e biomassa. Um baixo crescimento e alta produção de jasmonatos foram obtidos utilizando fontes de carbono a partir do sorbitol e amido (ENG et al., 1998).

Segundo Altuna et al., (2000) os melhores resultados em relação à produção de jasmonatos foram alcançados utilizando a sacarose como fonte de carbono e alguns sais inorgânicos, ao passo que ao substituir a sacarose pela glicose a produção caiu consideravelmente.

Gunther et al., (1990) relataram que sais inorgânicos como sódio, potássio ou nitrato de cálcio foram as melhores fontes para a produção de jasmonatos com *B. theobromae* (linhagem D7/2), permitindo uma concentração final de jasmonatos de até 800 mg/L com sacarose ou glicose como fontes de carbono.

1.2.2 Detecção e Quantificação dos Jasmonatos

1.2.2.1. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (TLC-CCDC)

Os jasmonatos podem ser detectados por meio da técnica de cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC).

A cromatografia em camada delgada (TLC-CCD) é uma técnica cromatográfica que utiliza uma fase fixa formando uma camada plana e uma fase móvel líquida do tipo *open-bed*. Apresenta uma série de vantagens devido à sua simplicidade: como a fase móvel avança por capilaridade, requer equipamento relativamente simples; permite correr várias amostras simultaneamente em cada placa, dando agilidade e baixo custo; a implantação da amostra pode ser feita com um capilar de vidro simples; a detecção estática em TLC oferece numerosas possibilidades, já que é possível utilizar muitos reagentes diferentes que permitam a visualização final. Uma vez realizada a corrida, deve medir-se a relação entre a frente final do solvente e cada fração detectada estabelecendo, assim, o R_f , que dá uma idéia grosseira da polaridade da fração (MOYNA et al., 2002).

Para a quantificação dos jasmonatos pode ser utilizada a técnica de cromatografia em fase gasosa (CG), após a conversão dos jasmonatos em sua forma de metil éster, cromatografia em fase gasosa com espectrometria de massas (CG/EM) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (UEDA et al., 1994).

1.2.2.2. Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC)

As únicas técnicas de cromatografia líquida em coluna que tem achado utilidade na análise de essências são as técnicas de cromatografia líquida de alto desempenho, nas quais são utilizadas altas pressões, para que o solvente e a amostra avancem por uma coluna recheada com uma fase estacionária sólida de grãos muito pequenos e de uma superfície ativa muito elevada. Como em todas as técnicas de cromatografia líquida, deve-se considerar as

características da fase estacionária, do solvente e do sistema de alimentação do solvente e do sistema de detecção (SERAFINI et al., 2002).

1.3. Análise da Variabilidade Genética em Microrganismos

1.3.1 Métodos Moleculares para detecção de diversidade genética

Muitas são as técnicas que podem ser utilizadas nos estudos de variabilidade genética em microrganismos. Algumas utilizam o número e o tamanho de plasmídios e de cromossomos ou comparam a produção de proteínas ou enzimas específicas (isoenzimas) para diferenciar indivíduos e populações. Dentre as mais modernas, estão aquelas envolvendo diretamente o DNA tais como seqüenciamento, RFLP, RAPD e DGGE, (SERAFINI et al., 2002).

Marcadores moleculares são importantes ferramentas que podem ser usadas na caracterização genética de populações de fitopatógenos. Marcas moleculares podem ser usadas para avaliar os níveis de diversidade genética e relações filogenéticas entre e dentro de determinada espécie, sendo uma ferramenta auxiliar na determinação de raças ou patótipos (MAJER et al., 1996). Alguns tipos de marcadores moleculares utilizados com esta finalidade, como aqueles baseados em isoenzimas, são fáceis de serem manipulados, mas apresentam baixo polimorfismo entre os fungos fitopatogênicos (BURDON & ROELFS, 1985; TOOLEY et al., 1985). Marcadores fundamentados em diferenças na molécula DNA são mais eficientes na detecção de diversidade genética. Mais recentemente, a técnica que tem por base a amplificação de polimorfismo de comprimento via reação em cadeia da polimerase (AFLP – Amplified fragment length polymorphisms) vem sendo utilizada para estudos desta natureza em diversos organismos (MÜELLER & WOLFENBARGER, 1999), entre eles os fungos fitopatogênicos (SALEH et al., 2003). Esta técnica combina a especificidade, a resolução e o

poder de amostragem genômica das enzimas de restrição com a rapidez e praticidade da detecção de polimorfismos da PCR (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

Outra ferramenta utilizada para estudos filogenéticos é a análise da região espaçadora transcrita do DNA ribossomal (rDNA). A unidade do DNA ribossomal de organismos eucariotos é formada pelo arranjo, em *tandem*, de três regiões gênicas (18S, 5,8S e 28S) e duas não gênicas (ITS e IGS). O rDNA é considerado uma região conservada do genoma dos organismos, com poucas mutações ocorridas durante a evolução das espécies (HILLIS & DIXON, 1991; APEL & GORDON, 1995). Exatamente por apresentar esta característica, o rDNA é atrativo para ser utilizado como marcador em estudo de sistemática (MILLER et al., 1999). A região ITS apresenta relativamente maiores taxas de mutação quando comparada as outras regiões do rDNA. Assim, ela é indicada para investigação de diversidade entre populações de uma mesma espécie (SAMUELS & SEIFERT, 1995).

1.3.2 Identificação Molecular de *Botryosphaeria*

A identificação de espécies de *Botryosphaeria* é complexa devido ao grande número de espécies anamórficas. Acredita-se que alguns caracteres podem ser informativos ao nível de espécies, por exemplo, pigmentação conidial, morfologia do estroma dentre outras (BUTIN, 1993; SUTTON, 1980). Além disso, estruturas de frutificação de até três espécies de *Botryosphaeria* spp, foram encontradas em um único hospedeiro (BROWN & BRITTON, 1986). Assim, nenhum caráter morfométrico de teleomorfos ou de anamorfos são completamente seguros para identificação definitiva de *Botryosphaeria*.

A solução de problemas taxonômicos de numerosos grupos de fungos tem tido êxito quando também se leva em conta características dos ácidos nucléicos (BERBEE & TAYLOR, 2001; WHITE et al., 1990). Em particular, o DNA ribossomal que tem um espaçador interno que é transcrito (ITS – *internal transcribed spacer*) e a região que codifica

para rRNA 5,8S, tem sido extensivamente usado para analisar as regiões intraespecífica e interespecífica, em adição às características morfológicas convencional e delimitações das espécies (ANDERSON & STASOVSKI, 1992; BAURA, et al., 1992; SALDANHA, et al., 2007).

1.4 Evolução dos Genes Nucleares de RNA Ribossômico

Os RNAs ribossomais são componentes essenciais na fisiologia celular. Estes componentes interagem de modo específico com as proteínas ribossômicas para formar as subunidades dos ribossomos que atuam na síntese de proteínas. Os rRNAs constituem, geralmente, de 80 a 90% da massa de RNA total dos procariontes e eucariontes. Nos eucariontes, essas cópias estão organizadas em *tandem* e agrupadas em uma ou mais regiões cromossômicas. Os RNAs ribossômicos são classificados conforme seu coeficiente de sedimentação sob campo centrífugo, que depende tanto do tamanho, assim como da densidade da molécula, nas unidades Svedberg (S).

De forma geral, cada unidade de repetição do rDNA eucarionte possui uma organização conservada, consistindo de: a) um espaçador externo (ETS, external transcribed spaces), transcrito em uma seqüência que contém a extremidade 5' da molécula precursora do rRNA, esta com alto coeficiente de sedimentação (até 45S). b) uma região que codifica para rRNA 18S; c) um espaçador interno que é transcrito (ITS – internal transcribed spacer) e que contém a região que codifica para, rRNA 5,8 S; d) uma região que codifica para rRNA 25 – 28S e um espaçador externo (NTS – non transcribed spacer), que não é transcrito) (figura 02. O coeficiente de sedimentação de seus produtos de transcrição varia de 23 S, nos procariontes, a 28 S, nos eucariontes superiores (MATIOLI, 2001).

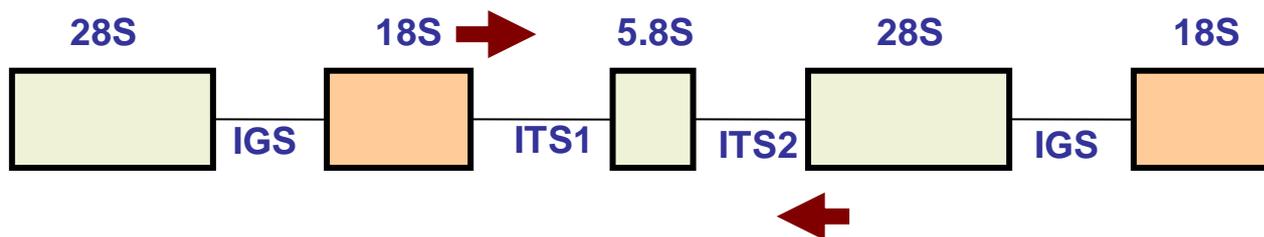


Figura 2 – Modelo esquemático da estrutura do rDNA com destaque o acoplamento dos iniciadores para amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2-18S 5,8S e 28S.

Os genes de rRNA da subunidade maior do ribossomo dos eucariontes estão estruturados como um mosaíco de domínios conservados e variáveis. Domínios variáveis, ou inserções não-conservados que não estão preservados nos genes de rRNA 23S dos procariotos são denominados divergentes (D), variáveis (U) ou ainda segmentos de expansão. Os genes de rRNA 23S/28S são exemplos de que a evolução dos genes ribossômicos e provavelmente de outros genes ribossômicos e provavelmente de outros genes repetido – ocorre em outros níveis além daquele observável com o alinhamento de seqüências de diferentes espécies. Sendo apenas um dos aspectos da evolução molecular, a análise da estrutura primária pode trazer informações relevantes para a evolução estrutural dos transcritos e sua implicação em sua funcionalidade em organismos distintos (MATIOLI, 2001).

1.5 Marcadores Moleculares AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Marcadores do tipo AFLP é uma técnica que permite que fragmentos anônimos do genoma sejam amplificados por PCR após terem sido originadas pela digestão do genoma por enzimas de restrição. Essa técnica foi inicialmente descrita por VOS et al., (1995) e envolve as seguintes etapas: 1: Digestão do genoma por uma enzima de restrição; 2. Ligação de “adaptadores” aos fragmentos gerados; 3. Amplificação dos fragmentos a partir de *primers* que hibridam com os adaptadores.

Como as seqüências que existem nos adaptadores são escolhidas arbitrariamente, a grande vantagem desse método é que as condições de amplificação são ótimas de acordo com parâmetros determinados livremente pelo pesquisador. A fase crítica diz respeito à quantificação do DNA digerido e dos adaptadores para a reação de ligação.

AFLP – representa a tecnologia mais recente para a obtenção de um grande número de marcadores moleculares distribuídos em genomas de procariotos e eucariotos. O ensaio de AFLP combina a especificidade, resolução e poder de amostragem da digestão com enzimas de restrição com a velocidade e praticidade de detecção dos polimorfismos via PCR (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Desde o seu desenvolvimento e divulgação (ZABEAU, 1993), esta técnica tem sido utilizada de forma crescente para finalidades de “*fingerprinting*”, mapeamento genético localizado (Bulk Segregant Analysis) e construção de mapas genéticos, principalmente em espécies de plantas cultivadas que apresentam uma baixa taxa de polimorfismo de DNA.

A análise de AFLP consiste essencialmente de quatro etapas: Na primeira etapa o DNA genômico total do indivíduo é clivado com duas enzimas de restrição. Na segunda etapa, adaptadores específicos são ligados aos terminais dos fragmentos genômicos gerados pela clivagem. Na terceira etapa, uma fração dos fragmentos gerados é amplificada seletivamente via PCR utilizando primers especificamente desenhados para reconhecer seqüências nos adaptadores. Na quarta e última etapa, a subpopulação de fragmentos amplificados é separada em gel de alta resolução (BORÉM & CAIXETA 2006).

1.5.1 Digestão do DNA genômico

Na etapa de digestão do DNA, utiliza-se uma enzima de restrição de corte raro (com sítio de restrição contendo de seis a oito bases) combinada a outra de corte freqüente (com sítio de restrição contendo quatro bases). A complexidade do genoma e fatores como metilação do DNA influenciam a manipulação do número de fragmentos gerados para a

amplificação e, conseqüentemente, a obtenção de um perfil eletroforético com a complexidade desejada.

As enzimas de restrição mais comumente utilizadas são a *EcoRI*, de corte raro e a *MseI* de corte freqüente. No entanto, outras combinações são encontradas. Para coníferas, o DNA foi digerido inicialmente com a combinação *EcoRI/MseI*, no entanto obteve-se um padrão complexo de bandas.

Paglia e Morgante (1998) propuseram a substituição da *EcoRI* por *PstI*, enzima que comprovadamente corta menos o DNA das coníferas e que, portanto, reduziria a complexidade do perfil eletroforético obtido por meio da técnica de AFLP. Para cereais, em espécies com genoma relativamente pequeno, como o arroz, tem sido utilizada *EcoRI* ou *PstI* em combinação com a *MseI*. Para análise de cereais com genoma maiores, como trigo e cevada, são usadas enzimas com sítios de restrição com oito bases, como *SseI* ou *SdaI*.

Desde a publicação original da técnica (Vos et al., 1995), várias combinações de enzimas têm sido usadas, como *EcoRI*, *PstI*, *HindIII* ou *ApaI* combinadas com *MseI* ou *TaqI*. Diferentes combinações de enzimas de restrição, além de variar a complexidade do padrão de bandas, podem afetar o número de polimorfismo detectado (RIDOUT & DONINI, 1999).

A digestão do genoma com duas enzimas de restrição resulta em três fragmentos diferentes de DNA: fragmentos cortados nas duas extremidades com a enzima de corte freqüente, fragmento cortado nas duas extremidades com a enzima de corte raro, e fragmentos cortados com as duas enzimas. Vos et al., (1995), utilizando a combinação de enzimas *EcoRI/MseI*, observaram que, apesar de os fragmentos cortados nas duas extremidades com a *MseI* serem mais freqüentes (90% dos fragmentos) os fragmentos amplificados predominantes são aqueles digeridos em uma extremidade com a enzima *EcoRI* e na outra extremidade com a *MseI*. Segundo eles, essa predominância pode ocorrer porque o primer-*MseI* (primer complementar ao sítio de restrição da *MseI*) tem menor temperatura de anelamento que o

primer-EcoRI. Isso faz com que a amplificação eficiente que a amplificação dos fragmentos cortados com as duas enzimas, nas condições usadas. Além disso, os fragmentos *MseI – MseI*, por serem amplificados com o mesmo *primer*, possuem repetições invertidas na extremidades, o que pode levar ao pareamento das extremidades, competindo com o anelamento do *primer*.

É crucial a utilização de DNA genômico altamente puro para garantir que este seja completamente digerido pelas enzimas de restrição. Digestão incompleta do DNA gera fragmentos parciais; e estes, ao serem amplificados, resultam em padrões de bandas alterados, que podem ser interpretados como falso polimorfismo. A quantidade de DNA parece não afetar a reação.

1.5.2 Ligação dos adaptadores

Na segunda etapa da metodologia, adaptadores de DNA fita dupla são ligados às extremidades dos fragmentos digeridos e servem de sítios de anelamento do *primer* para a subsequente amplificação via PCR. Os adaptadores AFLP consistem de uma seqüência principal do adaptador seguida de uma seqüência específica da enzima de restrição, ou seja, compatível com a extremidade coesiva gerada pela enzima de restrição.

A ligação do adaptador ao fragmento de DNA não restaura os sítios de restrição das enzimas, devido à mudança de base na seqüência do adaptador. Essa mudança no sítio de reconhecimento da enzima impede que ocorra digestão após a ligação, permitindo que a digestão e a ligação ocorram no mesmo tubo. Esta estratégia de reação simultânea não permite que dois fragmentos de DNA se liguem, pois, quando isso ocorre, o sítio de restrição é restaurado e a enzima o corta novamente, liberando os dois fragmentos.

1.5.3 Amplificação Seletiva

Nesta etapa, os fragmentos de DNA, os quais foram anteriormente ligados aos adaptadores, são submetidos a uma reação de PCR com dois *primers* diferentes. Um consiste

na seqüência do adaptador da enzima de corte raro acrescido de um ou mais nucleotídeos aleatórios na extremidade 3' e o outro na seqüência do adaptador da enzima de corte freqüente seguida dos nucleotídeos arbitrários. O uso desse *primers* seletivos reduz a quantidade de fragmentos de DNA. Do conjunto de fragmentos gerados com a digestão, apenas aqueles que contêm os nucleotídeos seletivos flanqueados o sítio de restrição são amplificados. Dessa forma, a complexidade do perfil eletroforético obtido com a técnica de AFLP depende da combinação de enzimas de restrição usadas para digerir o DNA e o número de bases seletivas utilizadas na amplificação dos fragmentos.

Apesar da possibilidade de utilização de diferentes quantidades de nucleotídeos seletivos, a amplificação dos fragmentos, para a maioria das espécies de plantas, é realizada com a adição de três bases no *primer*. Baseado na aplicação da metodologia de AFLP em diferentes plantas e animais, Vos et al., (1995) demonstraram a necessidade da utilização de três bases seletivas para a obtenção de padrão de bandas desejáveis. No entanto, eles observaram que a amplificação dos fragmentos diretamente com primers contendo três bases seletivas resultava em produtos com amplificação não-específica, causando arraste no gel. Para minimizar esse problema, eles propuseram a amplificação do DNA em duas etapas. A primeira, denominada de pré-amplificação, utiliza, primers com as seqüências dos adaptadores com um nucleotídeo seletivo adicional. A população de fragmentos pré-amplificados constituirá o DNA-molde para as reações da segunda etapa, quando se utilizam primers com a seqüência dos adaptadores com três nucleotídeos seletivos adicionais. Esses nucleotídeos adicionais correspondem ao mesmo utilizado na pré-amplificação acrescido de outros dois aleatórios na extremidade 3'.

1.5..4 Análise no gel

Os produtos da amplificação são separados em gel de poliacrilamida desnaturante, o qual proporciona alto nível de resolução. O número de fragmentos visualizados em géis de poliacrilamida varia de algumas dezenas até mais de uma centena. O polimorfismo é identificado pela presença ou ausência de bandas.

Os produtos podem ser revelados com radioatividade. Para isso, um dos primers é marcado com ^{33}P OU ^{32}P , normalmente o primer da enzima de corte raro. Após a separação por eletroforese, os fragmentos são visualizados por auto-radiografia. A utilização requer acomodações apropriadas, treinamento em proteção radiológica, equipamentos de segurança específicos e credenciamento do laboratório, o que pode limitar o uso da técnica.

Uma técnica alternativa é a coloração com nitrato de prata. CHALHOUB et al., (1997), após compararem a visualização do padrão de bandas AFLP por auto-radiografia e coloração de prata, concluíram que a sensibilidade e resolução das duas técnicas são similares. Além de não utilizar material radioativo, a coloração com prata apresenta a vantagem de permitir a recuperação do fragmento amplificado do gel, por meio de uma simples reidratação e transferência direta para tubo de PCR. Essa recuperação é útil quando se faz necessária a caracterização do fragmento específico, como clonagem, seqüenciamento ou preparação de sondas.

1.6 Caracterização dos Marcadores AFLP

As principais características dos marcadores AFLP são: a) a capacidade de analisar, simultaneamente, várias regiões diferentes do genoma (MUELLER & WOLFENBARGER, 1999); b) sua alta reprodutibilidade (BLEARS et al., 1998).

JONES et al., (1997) testaram a repetibilidade do marcador AFLP em oito laboratórios diferentes e detectaram diferença de apenas uma banda AFLP em um total de 172 bandas analisadas.

A técnica apresenta maior repetibilidade e confiabilidade que as técnicas RFLP e RAPD, nas quais se baseia. A obtenção dos marcadores AFLP não depende de hibridização e digestão parcial, que geram a não-reprodutibilidade do RFLP. Além disso, a possibilidade de se empregarem condições mais estritas para o anelamento dos primers nas reações de PCR resulta em maior repetibilidade e robustez do AFLP quando comparado com RAPD (SAVELKOUL et al., 1999).

Outra característica importante desta técnica é o número virtualmente ilimitado de marcas que podem ser geradas. Esta quantidade de bandas pode ser obtida variando-se as enzimas de restrição e a combinação de primers de natureza diversa e com número diferente de nucleotídeos seletivos.

O polimorfismo obtido pelos marcadores AFLP é resultante da: a) mutação no sítio de restrição; b) mutação na seqüência adjacente ao sítio de restrição e complementar à região de anelamento do primer; c) inserção ou deleção dentro dos fragmentos amplificados.

Em geral, o nível de polimorfismo detectado pelo AFLP é menor que o detectado por outros marcadores como RFLP e microssatélites. No entanto, a habilidade de analisar grande número de locos polimórficos simultaneamente, com uma única combinação de primers e em um único gel, resulta em um alto valor informativo do AFLP (RIDOUT & DONINI, 1999).

Devido ao seu valor informativo, estes marcadores de DNA têm sido de grande utilidade para acessar diferenças genéticas entre indivíduos, populações e espécies (MUELLER & WOLFENBARGER, 1999). Essa característica tem permitido a sua aplicação em estudos filogenéticos e discriminação de variedades. O poder de discriminação e a confiabilidade deste marcador poderão ser úteis no registro de variedades, auxiliando nos testes de distinção, homogeneidade e estabilidade (RIDOUT E DONINI, 1999).

De modo geral, os marcadores AFLP estão distribuídos ao longo de todo o genoma, apesar de alguns agrupamentos serem observados em trabalhos de mapeamento (ZHU et al., 2003; van Eck et al., 1995). Além da distribuição aleatória, os marcadores possuem herança mendeliana, fazendo com que esta técnica tenha grande potencial para assistir diferentes áreas da genética e melhoramento de plantas, como monitoramento da herança de características agrônomicas em plantas, diagnóstico de doenças, análise de pedigree e de diversidade genética e análise de marcadores ligados a características de interesse. O uso desses marcadores para estudos específicos, como análise da erosão genética causada pelo melhoramento genético, estimativas da taxa de fecundação cruzada em populações melhoradas (GAIOTTO et al., 1997), também tem sido reportada.

A grande desvantagem dos marcadores AFLP é a dificuldade de identificar variantes alélicas em um loco específico, o que tem levado à utilização da técnica, quase que exclusivamente, como marcador dominante (MUELLER & WOLFENBARGER, 1999; RIDOUT & DONINI, 1999).

1.7 Análise dos Marcadores AFLP

Marcadores genéticos são características qualitativas com herança mendeliana simples, facilmente reconhecida e cuja expressão não é influenciada pelo ambiente. Os primeiros marcadores genéticos, utilizados foram características morfológicas. Entretanto, os marcadores morfológicos frequentemente são controlados por genes dominantes, não permitindo distinguir plantas heterozigotas (ALFENAS, 2006).

A análise de AFLP representa uma tecnologia mais recente para a obtenção de um grande número de marcadores moleculares distribuídos em genomas de procariotos e eucariotos. Esta técnica combina a especificidade, resolução e poder de amostragem da digestão com enzimas de restrição com a velocidade e praticidade de detecção dos polimorfismos via PCR (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Uma característica das marcas RAPD e AFLP, diferente dos marcadores isoenzimáticos, RFLPs e microssatélites (quando revelados por PCR) é sua dominância. Alelos de um mesmo loco são revelados pela presença ou ausência de uma banda que, por sua vez, resulta da amplificação de um fragmento de determinado tamanho no gel. No entanto, não é possível saber se o loco amplificado está em homozigose ou heterozigose. Sendo assim, marcadores dominantes, ao contrario dos codominantes, não permitem a distinção entre genótipos homozigóticos e heterozigóticos os quais constituem apenas uma classe, isto é, a que apresenta o alelo amplificado. Os indivíduos nos quais o alelo não é amplificado constituem a outra classe, considerada homozigota para ausência da banda, qualquer que seja o motivo pelo qual o fragmento não foi amplificado (LOPES et al., 2002).

1.8 Vantagens dos Marcadores AFLP

Segundo Ferreira & Grattapaglia (1998), a principal vantagem da técnica AFLP, é o grande número de fragmentos gerados e resolvidos em um único gel. O índice de “*multiplex*” do ensaio AFLP, ou seja, o número de marcadores simultaneamente analisados em um único gel, é o mais alto entre as tecnologias de marcadores hoje disponíveis. O’NEIL et al., (1997) destacaram a rapidez da técnica, custo razoável, poder de reprodutibilidade, alta frequência de polimorfismo, e uso de pequenas quantidades de DNA.

A detecção de variabilidade genética é outra grande vantagem da técnica de AFLP. Ela explica simultaneamente o polimorfismo de presença e ausência de sítios de restrição, tal como no ensaio RFLP, e a ocorrência ou não de amplificação a partir de seqüências arbitrárias, tal como no ensaio RAPD. Consegue-se, assim, uma flexibilidade significativa na obtenção de marcadores polimorficos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

1.9 Limitações dos Marcadores AFLP

A principal limitação dos marcadores AFLP é o baixo conteúdo de informação genética por “locus”, pois apenas um alelo é detectado (amplificação do fragmento). As demais variações alélicas são classificadas conjuntamente como um alelo nulo.

Marcadores AFLP são, portanto, “dominantes”, e tem natureza binária. Genótipos heterozigotos não podem ser diretamente discriminados dos homozigotos.

Além disso, a análise de marcadores AFLP envolve um maior número de etapas do que a análise RAPD. Maior quantidade de reagentes (enzima de restrição, adaptadores e “primers” específicos), é necessária, juntamente com maior número de equipamentos de biologia molecular. O DNA necessário deve ser mais puro, o que demanda protocolos de extração mais elaborados. São necessárias etapas de digestão enzimáticas e ligação de adaptadores etapas de digestão enzimáticas e ligação de adaptadores (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

A eletroforese é realizada em géis de poliacrilamida nas dimensões utilizadas para seqüenciamento. Todos esses fatores tornam a tecnologia AFLP certamente menos acessível do que a tecnologia de marcadores RAPD. A qualidade do DNA é um fator essencial para o sucesso da técnica AFLP. DNA de alto nível de pureza é necessário para garantir a digestão completa, pelas enzimas de restrição, em todas as amostras. A digestão parcial ou a baixa qualidade do DNA pode levar, facilmente, a interpretações equivocadas do polimorfismo (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

2. PRODUÇÃO DE ÁCIDO JASMÔNICO E SEUS DERIVADOS POR LINHAGENS DO FUNGO *Botryosphaeria rhodina* ISOLADOS DE PLANTAS TROPICAIS

RESUMO

Jasmonatos são micromoléculas sinalizadoras de vias da biossíntese de metabólitos secundários em plantas, com bioatividades diversas, inclusive a modulação do crescimento vegetal. Entre esses jasmonatos, o ácido (-)-jasmônico e o ácido(+)-7-isojasmônico são frequentemente encontrados nos vegetais. Por outro lado, o fungo *Botryosphaeria rhodina* tem despertado interesse científico crescente devido à sua capacidade de produção de ácido jasmônico e de outros jasmonatos. Devido à inúmeras aplicações industriais conhecidas para esses metabólitos, uma abordagem envolvendo a sua produção por microrganismos torna-se especialmente interessante. Os microrganismos produzem substâncias químicas como resultado do metabolismo primário e secundário. No metabolismo secundário estão envolvidas vias metabólicas para a síntese de produtos naturais que não são essenciais para o crescimento do organismo produtor, contudo o rendimento desses produtos pode ser aprimorado para finalidades biotecnológicas. Nesta abordagem, trinta e seis linhagens de *Botryosphaeria rhodina* isoladas como patógenos de plantas tropicais, tais como: citros, manga, mogno africano, mamão, cupuaçu e madeira cortada foram analisadas para verificar a capacidade de produção de jasmonatos. Após cultivo das linhagens em meios líquidos, e extração seletiva dos filtrados livres de massa micelial, procedeu-se à avaliação do perfil químico. Os derivados produzidos foram inicialmente avaliados por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC). Linhagens com perfil químico de interesse biotecnológico foram submetidas à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para estimativa quantitativa da produção de jasmonatos.

Palavras chaves: 1. Ácido Jasmônico, 2. *Botryosphaeria rhodina*

PRODUCTION OF ÁCIDO JASMÔNICO AND YOURS FLOWED BY MUSHROOMS *Botryosphaeria rhodina* ISOLATED OF TROPICAL PLANTS.

ABSTRACT

The microorganism produce chemical substances as resulted of the primary and secondary metabolism. In the secondary metabolism they are involved metabolic ways for the synthesis of natural products that are not essential for the growth of the producing organism. Fungy *Botryosphaeria, rhodina* has despertado an increasing interest due to one production serie of acid greasy ciclopentanos, of the jasmônico acid type (AJ), with regulating properties of the growth of superior plants. Usually the acid jasmônico (AJ) is a regulator of endogenous vegetal growth, synthecized in natural way for a great variety of plants, belongs to the regulators of vegetal growth (RCV) called jasmonatos, being the most representative acid (-)-jasmônico (-)-AJ and the ácido(+)-7-isojasmônico [(+)-7-isoAJ] which if finds distributed widely in the plants. AJ has innumerable known applications such as the use of the AJ in the manufacture of perfumes; in the production of the black tea; in the reduction of the consumption of estimulador of growth; in the production of malte in beer industries; in the increase of the production of taxol; in the production of nourishing flavorizantes, among others. Thirty and six isolated ancestries of *Botryosphaeria rhodina* as patógenos of tropical plants, such as: citros, sleeve, African mahogany, papaya, cupuaçu and cut wood had been analyzed to verify the capacity of AJ production being used itself it methodology of Miersch et al., 1989. The assays for production of AJ and its derivatives had been carried through in half Miersch (M1) and Modified Miersch (M2) e, evaluated in plates of Chromatography in comparative thin layer (CCDC) and quantified by means of liquid Chromatography of high efficiency (CLAE).

Words Keys: Acid Jasmonic, *Botryosphaeria rhodina*

2.1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia consiste no uso de sistemas celulares para o desenvolvimento de processos e produtos de interesse econômico ou social. Entre os sistemas celulares, os fungos são de grande interesse biotecnológico. Talvez sejam eles, dentre os seres vivos, os que mais têm contribuído com produtos e processos de importância fundamental para o bem-estar da população.

Os fungos possuem algumas características em comum que os distinguem dos outros seres vivos. Em geral, eles apresentam filamentos, (hifas), com paredes rijas, ricas em quitina, o mesmo material que reveste insetos como besouros; têm características heterotróficas, isto é, não possuem clorofila e, portanto, necessitam de material orgânico para viver, sendo sua nutrição feita por absorção de nutrientes graças à presença de enzimas que são por eles produzidas e que degradam produtos como, por exemplo, celulose e amido. Por outro lado os fungos são eucarióticos; reproduzem-se por via sexual ou assexual e assim possuem divisões celulares do tipo mitose e meiose, tendo sempre como produto final os esporos que são órgãos de reprodução, resistência e disseminação (ARAÚJO, 2002).

Outro aspecto interessante é a expressiva diversidade genética característica desses organismos associada à funções únicas e cruciais que desempenham na manutenção de ecossistemas como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos.

Alguns microrganismos são encontrados na natureza como degradadores de matéria orgânica e possuem um importante papel na reciclagem de nutrientes para o meio ambiente. Estes microrganismos possuem enzimas específicas que os capacitam para degradar os componentes básicos da parede celular vegetal.

Botryosphaeria rhodina, causa podridão negra dos frutos, também chamada de podridão interna dos frutos. Geralmente, *B. rhodina* aproveita ferimentos externos na casca

dos frutos, provocados por insetos, problemas fisiológicos ou danos mecânicos, para penetrar nos frutos e provocar o apodrecimento da polpa, a qual fica enegrecida ou por vezes, amarelada e liquefeita (SILVEIRA, 2001).

O ácido jasmônico (AJ) é um regulador, de crescimento vegetal endógeno, sintetizado de maneira natural por uma grande variedade de plantas (MEYER et al., 1984).

Aldridge et al., (1971), estudaram a produção de AJ a partir do sobrenadante de cultivo do fungo *Lasiodiplodia theobromae* (anamorfo *B. rhodina*).

O conhecimento sobre a produção de AJ a partir de microrganismos está ainda limitado. Várias são as espécies que se apresentam como produtoras desse composto, as mais representativas são as linhagens de *Botryodiplodia theobromae* e *Gibberella fugikuroi* (MIERSCH et al., 1989).

O termo jasmonatos é utilizado conceitualmente para os derivados lipídicos da via dos octadecanóides (ou via Vick-Zimmermann), cujos representantes são o ácido jasmônico (AJ), seu éster metil-jasmonato (MeAJ), seus isômeros e alguns dos seus precursores e metabólitos (VICK et al., 1987).

Os jasmonatos (ácido jasmônico e seu éster metílico) são lipídeos oxigenados (BOSTOCK, 1999), estando presentes em diversas plantas. Esses compostos são produzidos nas plantas após injúrias ou tratamentos com estimuladores (ATHAYDE SOBRINHO et al., 2005), apresentando funções hormonais e de defesa contra fitopatógenos e insetos. A ação de defesa está ligada à capacidade de induzir a síntese ou acúmulo de proteínas inativadoras de ribossomos, fenilalanina amônia-liase, síntese da chalcona, proteínas ricas em prolina, inibidores de proteínas e outros fatores como polifenoloxidasas e lipoxigenases (KOZLOWISKI et al., 1999).

Os AJs estão envolvidos em vários processos fisiológicos. Eles atuam, por exemplo, no florescimento, na senescência, na resposta ao toque e nas respostas aos estresses bióticos e abióticos (CREELMAN & MULLET, 1997).

Quimicamente os jasmonatos são derivados de compostos baseados em ciclopentanona. Sua biossíntese começa com a liberação do ácido linolênico das membranas dos cloroplastos, pela ação de fosfolipases (DHONDT et al., 2000; WANG et al., 2000; ISHIGURO et al., 2001). No primeiro passo da via, o ácido linolênico é convertido em ácido 1,3 – hidroperoxilinolênico, uma reação catalisada pela enzima 1,3-LOX (1,3 lipoxygenase). A seguir, as enzimas AOS (Óxido de Aleno Sintetase) e AOC (Óxido de Aleno Ciclase) produzem ácido 1,2 – oxo-fitodienólico. Após a ação da enzima OPR (1,2 – oxo-fitodienólico redutase) e três passos de β -oxidação, o AJ é formado. Finalmente, a enzima JAMT (Ácido Metil Jasmonico Transferase) faz a conversão para Ester Metil Jasmonato (CREELMAN; MULLET, 1997), (Figura 03).

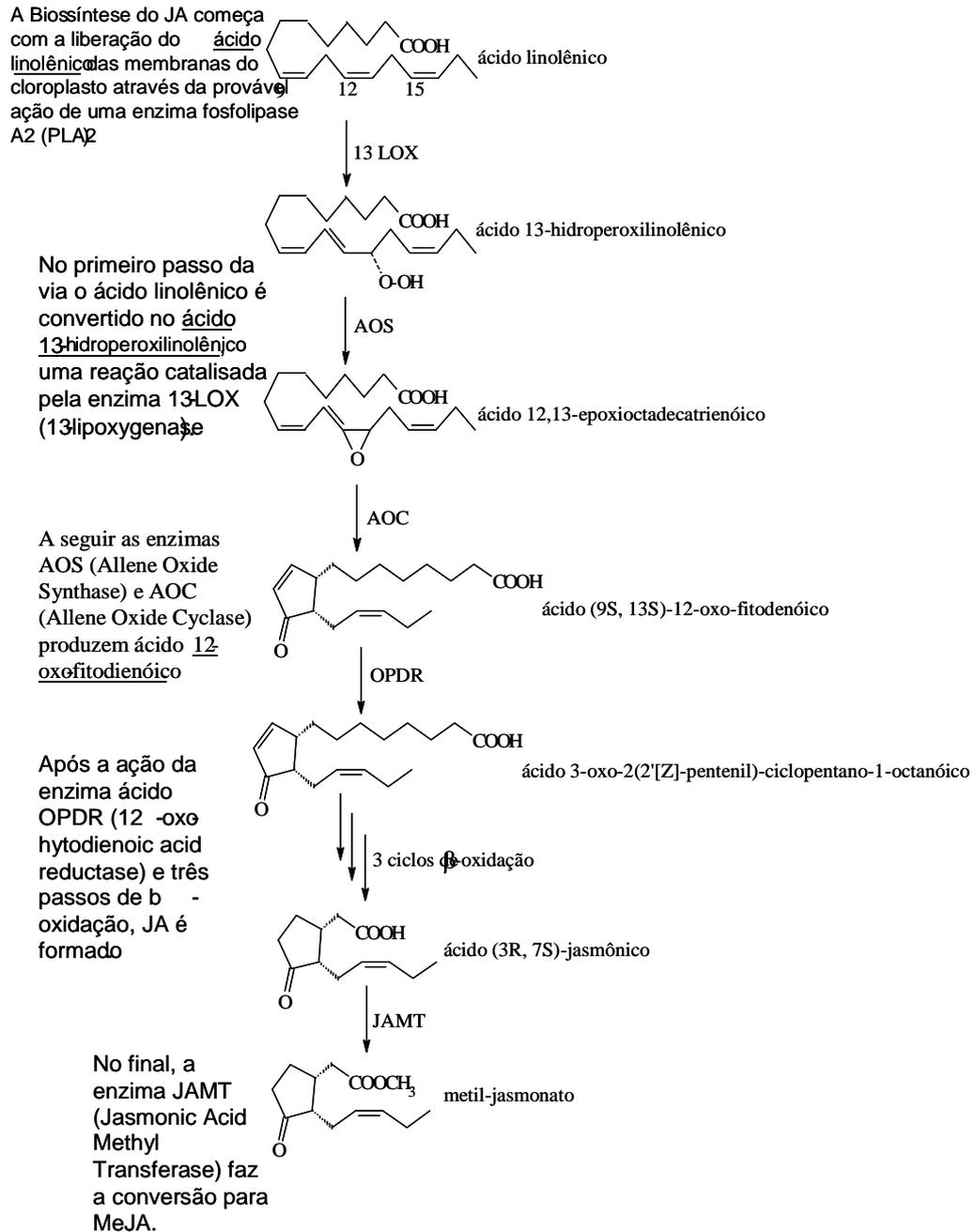


Figura 03 – Esquema da Biossíntese do Ácido Jasmônico, seu éster metil jasmonatos (MeAJ) e seus derivados (jasmonatos), sintetizados a partir do ácido linolênico e linoléico através da via dos octadecanóicos.

Botryodiplodia possui uma grande capacidade para utilizar os carboidratos como única fonte de carbono e energia, pois cresce rapidamente na presença de altas concentrações de amido e sacarose. O seu grande poder de penetração em tecidos vegetais explica a rapidez com que é capaz de multiplicação nos frutos e nas plantas (WARDLAW, 1932). Este fungo cresce em um meio de pH 4-10 mostrando uma grande adaptabilidade em condições adversas para seu crescimento (GABR et al., 1990).

Este estudo teve como meta identificar fungos do gênero *Botryosphaeria* isolados de espécies tropicais, capazes de produzir jasmonatos.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Material Biológico

Foram utilizadas para esta etapa do trabalho 36 (trinta e seis) linhagens patogênicas brasileiras de *B. rhodina*, obtidas de diferentes hospedeiros de diferentes regiões geográficas e 2 (duas) linhagens cubanas. Desse total 23 (vinte e três) foram isoladas para o desenvolvimento dessa pesquisa sendo 22 (vinte e duas) de mangueira (*Mangifera indica*) e 1 (uma) do fruto do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). As demais 13 (trezes) linhagens foram gentilmente cedidas por outros centros de pesquisa. Da UFPE – PE utilizou-se 1 (uma) linhagem de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e 1 (uma) linhagem de mamão (*Carica papaya*); do CEPLAC/Bahia, foram utilizados 6 (seis) linhagens de mogno africano (*Khaya ivorensis*); do INPA foram utilizados 4 (quatro) linhagens de madeira cortada e 1 (uma) linhagem de madeira cortada de Peruíbe/SP e, integraram ainda às amostras dessa pesquisa 2 (duas) linhagens de ICIDCA (Havana – Cuba) obtidos de plantas de laranjeiras. A identificação dos isolados se encontra na tabela 1.

As linhagens brasileiras foram comparadas com as linhagens cubanas 2334 e 1517 de *B. rhodina* obtidas da coleção de microrganismos do Instituto Nacional de Investigaciones

Fundamentales de la Agricultura Tropical (INIFAT), em Havana, Cuba e que teriam demonstrado ser boas produtoras de jasmonatos (Tabela 1).

Estes isolados foram mantidos em meio sólido inclinado de BDA (batata-dextrose-ágar) à temperatura ambiente (25°C), tendo sido repicados trimestralmente. O método de Castellani foi usado para manutenção permanente dos isolados fúngicos (CASTELLANI, 1967).

Tabela 1 – Linhagens de *Botryosphaeria rhodina* utilizados nos ensaios da produção de jasmonatos; Local de coleta e hospedeiros/parte da planta (folha, frutos e madeira).

Linhagens	Local de Coleta	Hospedeiros / Parte da Planta
Mg 01	Manaus/UFAM	Mangueira/Folha
Mg 03	Manaus/UFAM	Mangueira/Folha
Mg 06	Manaus/UFAM	Mangueira/Folha
Mg 08	Manaus/UFAM	Mangueira/Folha
Mg 09	Manaus/UFAM	Mangueira/Folha
Mg 10	Manaus/UFAM	Mangueira/Folha
Mg 12	Manaus/UFAM	Mangueira/Folha
Mg 14	Manaus/UFAM	Mangueira/Folha
Mg 16	Manaus/UFAM	Mangueira/Folha
Mg 17	Manaus/UFAM	Mangueira/Folha
Mg 18	Manaus/UFAM	Mangueira/Folha
Mg 19	Manaus/UFAM	Mangueira/Folha
Mg 20	Manaus/UFAM	Mangueira/Folha
Mg 21	Manaus/UFAM	Mangueira/Folha
Mg 22	Manaus/UFAM	Mangueira/Folha
Mg 23	Manaus/UFAM	Mangueira/Folha
Mg 24	Manaus/UFAM	Mangueira/Folha
Mg 25	Manaus/UFAM	Mangueira/Folha
Mg 26	Manaus/UFAM	Mangueira/Folha
Mg 27	Manaus/UFAM	Mangueira/Folha
Mg 28	Manaus/UFAM	Mangueira/Folha
Mg 29	Manaus/UFAM	Mangueira/Folha
IRO 2	Manaus/UFAM	Cupuaçuzeiro/Fruto
C 81	Manaus/INPA	Madeira Cortada
C 83	Manaus/INPA	Madeira Cortada
C905	Manaus/INPA	Madeira Cortada
C3966	Peruíbe/SP	Madeira Cortada
Kifn 1.2	CEPLAC/BA	Mogno Africano/Madeira
Kifn 1.3	CEPLAC/BA	Mogno Africano/Madeira
Kifn 2.2	CEPLAC/BA	Mogno Africano/Madeira
Kifn 2.3	CEPLAC/BA	Mogno Africano/Madeira
Kifn 3.1	CEPLAC/BA	Mogno Africano/Madeira
Kifv 2.2	CEPLAC/BA	Mogno Africano/Madeira
C 3.4.7.9	Recife/PE	Cupuaçuzeiro/Fruto
C 3.1.8.4	Recife/PE	Mamoeiro/Fruto
C 1517	Cuba/Havana	Laranja/Fruto
C 2334	Cuba/Havana	Laranja/Fruto

2.2.2 Amostras

Foram coletadas amostras foliares, frutos e de madeira cortada de vários hospedeiros que apresentavam sintomas ou lesões.

2.2.3 Meio de Cultura

Os meios de cultura utilizados foram: BDA (extrato 200g de batata, 15 g de dextrose, 15 g de ágar e água até completar 1000 mL), Extrato de Malte-Agar (15g de extrato de malte e 15 g de ágar e água até completar 1000 mL); BD (200 g de extrato de batata, 15 g de dextrose, e água até completar 1000 mL); M1 (MIERCH - 50 g de sacarose, 3 g de KNO₃, 0,2 g de KH₂PO₄, 0,2 g MgSO₄7H₂O, 0,2 g de KCl, 0,010 g de FeSO₄7H₂O, 0,010 g de ZnSO₄7H₂O, 0,010 g de MnSO₄, 0,010 g de Na₂MoO₄ 2H₂O, 0,010 g de CuSO₄7H₂O), para o meio sólido foi acrescentado 15g de ágar (M1 sólido); M2 (MIERCH Modificado - 50 g de sacarose, 7,5 g de KNO₃, 0,2 g de KH₂PO₄, 0,6 g MgSO₄7H₂O, 0,3 g de KCl, 0,6 g de FeSO₄7H₂O, 0,030 g de ZnSO₄7H₂O, 0,030 g de MnSO₄, 0,030 g de Na₂MoO₄2H₂O, 0,030 g de CuSO₄7H₂O e 1 g de extrato de levedura). Após o preparo o pH dos meios foi ajustado para 5,5 utilizando NaOH 1M, e então autoclavados a 121°C por 15 minutos e vertidos assepticamente em placas de Petri ou em Erlenmeyers de 250 mL.

Inicialmente os isolados utilizados foram testados quanto a produção de AJ nos meios M1 e M2, mas posteriormente para a produção de AJ foi utilizado o meio Miersch modificado (M2) seguindo procedimento do Instituto Cubano de Pesquisa dos Derivados da Cana-de-Açúcar (ICIDCA).

2.2.4 Soluções para Isolamento de Microrganismos

As soluções para o isolamento dos isolados de *B. rhodina* foram: solução Tween 80 (0,1 mL de Tween 80 e 100 mL de água destilada)– esta solução foi utilizada para a separação de conídios. A solução de Tween após preparada foi distribuída em tubos de ensaio

com 2,5 mL da solução e autoclavada a 15 minutos a 1 atm), solução salina (9,0 g de NaCl e 1000 mL água destilada. A solução de NaCl de 0,9% (p/v) foi utilizada para a diluição de conídios, de forma a se obter colônias isoladas. Esta solução foi distribuída em frascos com 9 mL de solução e autoclavada por 15 minutos a 1 atm); Hipoclorito de Sódio 2% (250 mL de solução concentrada 12% e 750 mL de água destilada), antibiótico (Terramicina *pfizer* 500 mg) solução estoque – 500 mg de terramicina, 5 mL de água destilada e 5 mL de álcool 70%), álcool 70% (750 mL de álcool 93% e 250 mL de água destilada).

2.2.5 Soluções para Extração e Identificação de Ácido Jasmônico

As soluções utilizadas para a extração e identificação de ácido jasmônico nos fermentados de linhagens de *B. rhodina* foram: Ácido Clorídrico (HCl) 4N (61,80 mL de HCl e 438,20 mL de água destilada), Fase Móvel: 40 mL de Clorofórmio, 10 mL de Acetato de Etila, 2,5 mL de Acetona e 0,5 mL de Ácido Acético), Vanilina Sulfúrica: (Solução 1: 0,5 g de Vanilina e 50 mL de Etanol; Solução 2: 50 mL de Etanol, 2,5 mL de Ácido Sulfúrico (PA). Adicionar lentamente o ácido sulfúrico ao álcool e misturar com a solução 1.

2.2.6 Isolamento de fungos

Isolados de *B. rhodina* foram obtidos de (folhas, frutos e madeira), de acordo com a metodologia descrita por PETRINI (1986).

Após a assepsia, os fragmentos das plantas foram inoculados em ordem seriada, para placa de petri contendo o meio de cultivo Batata Dextrose Ágar (BDA), acrescido de Terramicina (500 mg/mL). Foram inoculados seis fragmentos de cada planta (folhas, frutos ou madeira) em cada placa de petri contendo meio BDA. Todas as placas foram incubadas a 28°C, em ausência de luz.

2.2.7 Identificação dos Fungos Isolados

A identificação dos isolados foi realizada pela análise de suas estruturas de reprodução assexual e sexual (ELLIS, 1971; BARNETT & HUNTER, 1972; ARX, 1974; PETRINI, 1986; ROSSMAN et al., 1987; DUARTE, 1999). Essas estruturas foram fixadas com azul de lactofenol de acordo com as técnicas de coloração (ARX, 1974; PUNITHALINGAM, 1974; SIVANESAM, 1984; VAN DER A. A. 1973) e observados em microscópio óptico. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas (ICB/UFAM) e no Laboratório de BIOMICRO do Departamento de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP).

Após o isolamento das culturas foram obtidas culturas monospóricas por meio de diluição seriada.

Em câmara de fluxo laminar, as estruturas reprodutivas dos fungos foram raspadas com auxílio de uma alça de platina flambada. Preparou-se uma suspensão de conídios em tubos de ensaio contendo 2,5 mL de solução Tween-80 0,1%. Os tubos foram submetidos à agitação, por um minuto, em agitador Vortex e 1 mL da suspensão em Tween-80 foi transferida para tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina 0,9%. A nova suspensão foi agitada, por alguns segundos, em agitador Vortex. Foram realizadas quatro diluições seriadas (1:10; 1:100; 1:1000 e 1: 10000).

Foram distribuídos 100 µL, em duplicata, de cada uma das duas últimas diluições em placas de Petri contendo meio BDA. Após a germinação dos esporos, foi transferido, de cada placa, um fragmento do meio BDA contendo uma ponta de hifa produzida a partir da germinação de um único esporo. O fragmento foi transferido para uma nova placa de Petri com meio BDA a qual foi mantida no escuro a temperatura de 28°C, pelo tempo necessário para o crescimento da colônia.

2.2.8 Seleção de Linhagens e Produção de Jasmonatos

Estudos anteriores, relacionados à produção de AJ por via microbiana, relatam que *B. rhodina* é o microrganismo com maior capacidade para produzir este metabólito (Miersch et al., 1987; 1993). Inicialmente foram utilizadas sete linhagens de *B. rhodina* isoladas de fontes naturais em regiões brasileiras (C 81, C 83, C 3479, C 318.4, C 905) e duas linhagens cubanas produtoras de jasmonatos (C 2334 e C 1517), as quais foram testadas quanto a velocidade de crescimento em meios diferentes e quanto a produção de jasmonatos.

No decorrer do desenvolvimento do trabalho as vinte e sete linhagens isoladas de *B. rhodina* foram também testadas quanto à produção de jasmonatos.

2.2.8.1 Determinação da velocidade de crescimento das linhagens

As linhagens de *B. rhodina* foram cultivadas em meio BDA após esse período, um disco de meio contendo micélio foi retirado da periferia da colônia e transferido para o centro de novas placas de Peti de 9cm de diâmetro contendo o meio a ser testado. Os fungos foram cultivados em meio Malte-Agar (MA) e Meio Miersch (M1) em câmara com temperatura de 28°C, no escuro. Durante um período de 5 dias, foram feitas avaliações da taxa de crescimento dos isolados, a intervalos de 12 horas.

2.2.8.2 Avaliação da Produção de Ácido Jasmônico pelos isolados de *Botryosphaeria rhodina*

O cultivo das linhagens em meio líquido, bem como a composição do meio foi realizada segundo a metodologia descrita por Eng, Guitiérrez-Rojas et al., (1998). Elenmeyers contendo 50 mL de meio de cultura (M1 ou M2) foram inoculados com 1/8 de placa micelial das linhagens de *B. rhodina* testadas. As fermentações foram mantidas por 13 dias, no escuro, a 28°C sob condições estáticas. Após o término do período os fermentados foram filtrados em funil de Büchner.

2.2.8.3 Extração, detecção e quantificação de AJ nos fermentados

A extração de ácido jasmônico foi realizada no Laboratório BIOMICRO do Departamento de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP) e no Laboratório de Pesquisa de Química da Universidade Federal do Amazonas.

A extração e verificação da presença de jasmonatos nas amostras de filtrados das linhagens atendeu o seguinte procedimento:

1. Após a filtração do meio de cultura em funil de Büchner utilizando papel de filtro Whatman nº 4, sob bomba a vácuo, descartou-se a massa micelial e adicionou ao sobrenadante ácido clorídrico (HCl) 4M para acidificar todas as amostras até pH 3,0;
2. Em balão de separação foi colocado 20 mL do meio de cultura com pH 3,0 e adicionou-se 20 mL de acetato de etila, agitando de forma a permitir a mistura entre os solventes;
3. Após a separação das fases foi coletada a fase orgânica (acetato superior);
4. A fase aquosa foi colocada novamente no balão de separação e repetiu-se o mesmo procedimento mais duas vezes, juntando sempre as fases orgânicas coletadas;
5. Adicionou-se à fase orgânica pequena quantidade de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) (com espátula) e transferiu-se a fase orgânica para balões sendo as amostras então rotaevaporadas;
6. Após a evaporação do acetato de etila, as amostras foram dissolvidas em metanol e para a visualização da presença de AJ foi utilizada a técnica de cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) utilizando placas cromatográficas com sílica gel G60 F254. A fase móvel utilizada foi clorofórmio: acetato de etila: acetona: ácido acético (40:10:5:1);
7. Após a eluição das amostras na placa de sílica a mesma foi borrifada com vanilina sulfúrica e então aquecida a 120°C por cerca de 5-7 minutos para permitir a visualização;

A técnica de Cromatografia (CCDC) empregada neste trabalho foi segundo DELGANI et al., 1998.

Após a detecção da presença de AJ nas amostras fermentadas em Meio M1 e meio M2, as mesmas foram ressuspensas em 1 mL de metanol (grau HPLC), filtradas em membranas de acetato de celulose 0,45 µm e então injetadas no CLAE (Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência).

A quantificação de AJ nos extratos foi realizada utilizando-se um cromatógrafo SHIMADZU (LC-10AD vp) acoplado a um detector de arranjo de diodo. Utilizou-se uma coluna Supelcosil C18 (25 cm x 4,6 mm id, 5mm) e um sistema solvente composto de MeOH: ácido acético 0,1% (60:40). O fluxo de solvente foi de 0,85 mL/min sendo a análise monitorada a 210 nm.

Para a quantificação fez-se uso do método do padrão externo, através do traçado de uma curva de calibração utilizando-se uma solução de um padrão autêntico de AJ (Sigma) em concentrações variando entre 0,1 – 1,0 mg/mL.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Caracterização morfológica de *Botryosphaeria rhodina*

As trinta e seis linhagens de *B. rhodina* utilizadas neste trabalho apresentaram variabilidade morfológica na coloração das colônias, cultivadas em diferentes meios (Tabela 2).

Apresentaram crescimento distinto, com aparência mais branca quando cultivadas em malte-ágar e mais escuras em meio Miersch para a maioria das linhagens (Figura 4).

Tabela 2 - Diferença morfológica entre algumas linhagens de *B. rhodina* cultivadas em meio MA: malte-ágar e em M1: meio Miersch.

Linhagens	Observações
C 81	MA – Micélio cinza com pontos negros M1 – Micélio pouco aéreo, totalmente negro
C83	MA – Micélio cinza mais desenvolvido com ligeiros pontos negros, pouco aéreo M1 – Micélio menos desenvolvido, cinza e ligeiramente vermelho, aéreo
C 3184	MA – Micélio muito desenvolvido, aéreo e cinza M1 – Micélio menos espesso, negro e não aéreo
C 3479	MA – Micélio pouco, desenvolvido, branco M1 – Micélio branco, negro e vermelho, mais desenvolvido
C 905	MA – Micélio escasso, branco, negro e ligeiramente esverdeado M1 – Micélio escasso, branco, negro e ligeiramente esverdeado
C 1517	MA – Micélio muito desenvolvido, aéreo e branco M1 – Micélio menos desenvolvido, branco e negro, não aéreo
C 2334	MA – Micélio muito desenvolvido, aéreo e branco M1 – Micélio menos desenvolvido, branco e negro, não aéreo

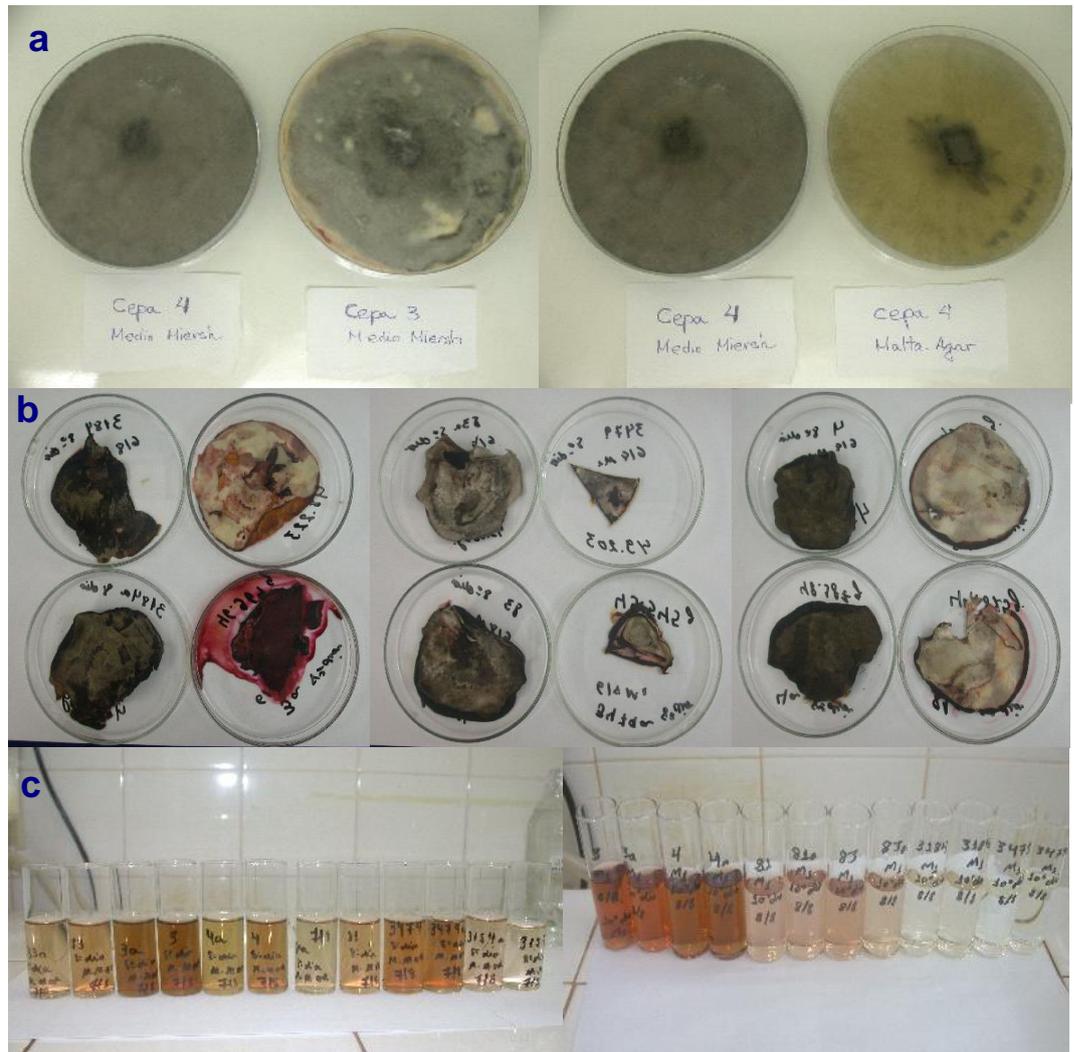


Figura 4– Linhagens de *B. rhodina*, em diferentes meios de cultura: A) Sólido; B) Massa Micelial após a filtração e C) Meio Líquido filtrado, para iniciar a extração do AJ.

2.3 2 Determinação da Velocidade de Crescimento em Malte-agar e Meio Miersch

2.3.2.1. Observações fisiológicas do crescimento

Foi determinado o diâmetro do halo de crescimento da colônia de *B. rhodina* no período de 5 (cinco) dias. Nas Tabelas 3 e 4 estão mostrados resultados de culturas em Malte Agar (MA) e Miersch (M1). (Figura 5 e 6).

Tabela 3 - Velocidade de crescimento de *B. rhodina* em meio Malte- Agar.

Tempo (H)	Linhagens			Halo (mm)			
	C 81	C 83	C 905	C 3184	C 3479	C 1517	C 2334
0	9,0	9,0	9,0	9,0	9,0	9,0	9,0
15	16,0	15,0	22,3	23,3	21,0	25,0	24,3
22	25,0	19,3	34,0	36,0	25,7	37,3	31,3
36	51,3	41,9	66,3	66,7	46,7	66,3	54,3
46	65,7	57,0	80,7	78,7	55,0	84,3	62,7
60	81,7	85,0	85,0	85,0	72,3	85,0	78,7
110	85,0	85,0	85,0	85,0	85,0	85,0	85,0

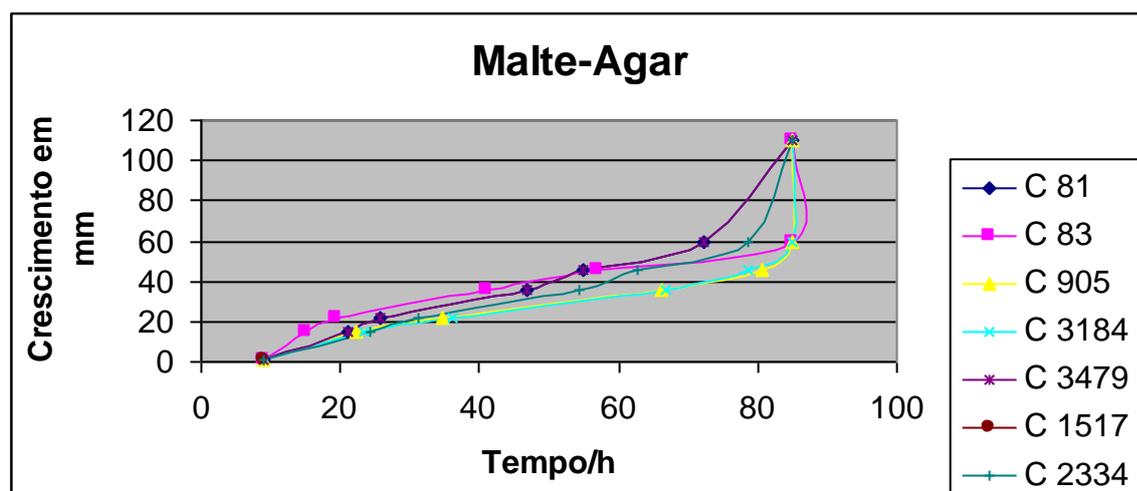
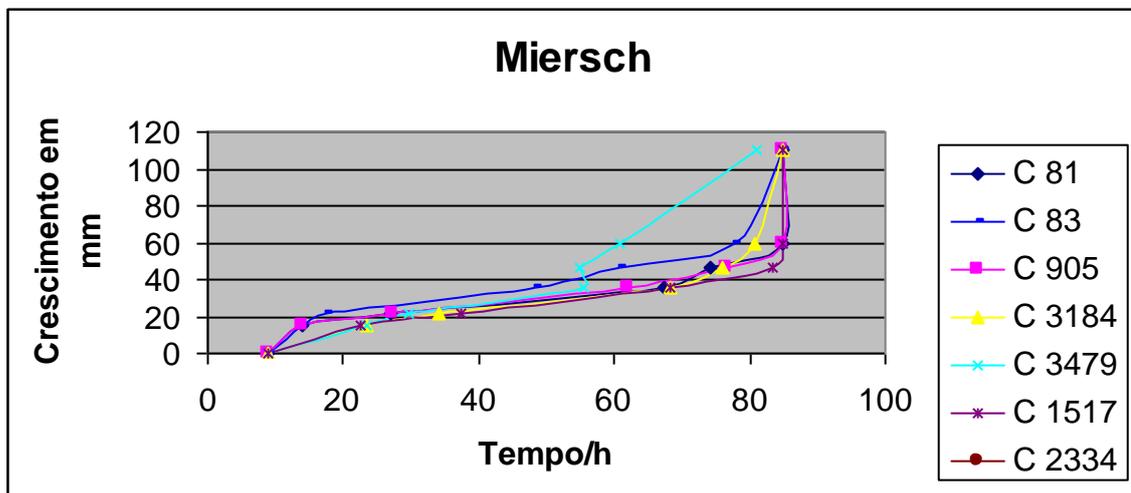


Figura 5 – Curva de Crescimento de 7 linhagens de *B. rhodina* utilizando-se meio Malte-Agar sólido.

Tabela 4 - Velocidade de crescimento de *B. rhodina* em meio Miersch.

Tempo (H)	Linhagens						
	C 81	C 83	C 905	C 3184	C 3479	C 1517	C 2334
0	9,0	9,0	9,0	9,0	9,0	9,0	9,0
15	14,0	14,0	14,0	23,3	23,3	23,3	24,3
22	27,0	17,6	27,3	34,0	29,7	37,3	35,3
36	67,3	48,3	62,0	68,3	55,6	68,3	53,7
46	74,3	60,8	76,7	76,0	55,0	83,3	64,3
60	85,0	77,7	85,0	80,6	60,7	85,0	74,7
110	85,0	85,0	85,0	85,0	81,0	85,0	85,0

**Figura 6** – Curva de Crescimento de 7 linhagens de *B. rhodina* em meio Miersch sólido.

A figura 7 mostra o comportamento quanto ao crescimento de cada linhagem nos meios testados observando-se que em geral não houve diferenças significativas com relação ao crescimento frente à composição do meio. Entretanto foram observadas diferenças morfológicas significativas com relação à coloração descrita na tabela 02. Também foi observado que as linhagens brasileiras C 81, C 83, C 1517 e C 3184 crescem bem em ambos os meios, mas a linhagem C 3.4.7.9 teve crescimento retardado e a linhagem C 905 mostrou baixo crescimento.

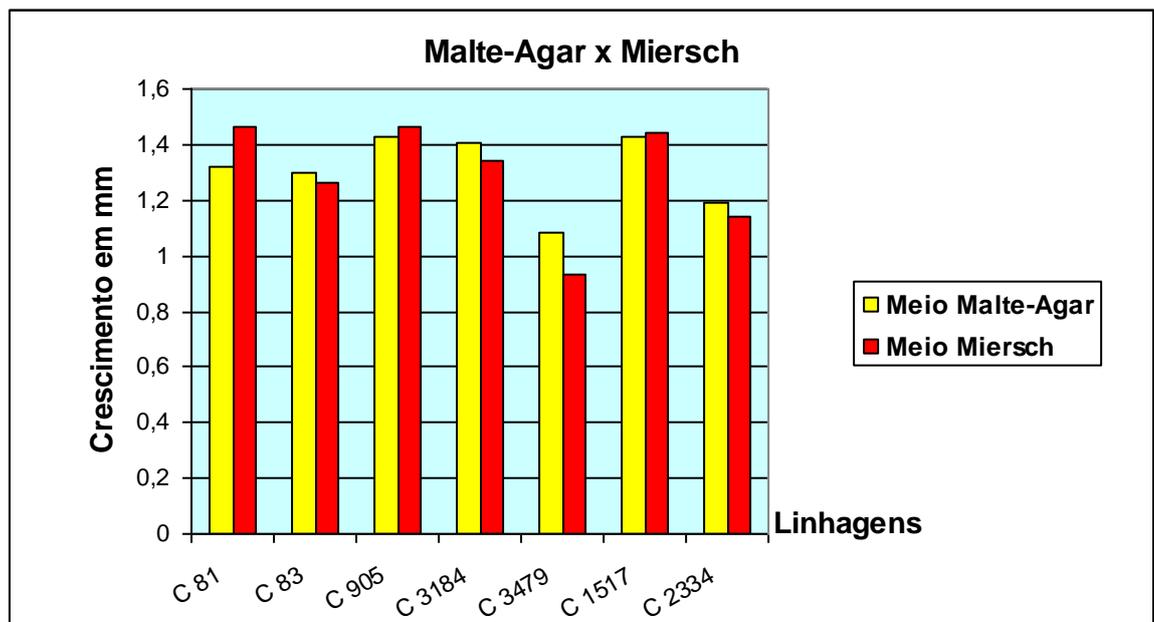


Figura 7 – Crescimento das linhagens de *B. rhodina* nos meios Malte-Ágar (MA) e Meio Miersch (M1) após 5 dias.

2.3.3 Detecção de Jasmonatos produzidos por *Botryosphaeria rhodina* por meio de Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)

Inicialmente foram realizadas análises por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) para detecção da presença de jasmonatos nos meios M1 e M2 utilizando apenas algumas linhagens. A presença de AJ foi observada em quase todas as amostras analisadas. As linhagens Kifn 2.2, Kifn 3.1, C 2.3.3.4. apresentaram uma intensidade de mancha maior que as demais linhagens brasileiras, evidenciando assim uma maior produção de AJ pelas mesmas. A figuras 06 a seguir apresenta os resultados dos ensaios com as linhagens C 83, Kifn 3.1 e padrão de AJ, em Meio Miersch (M1). (Figura 08).

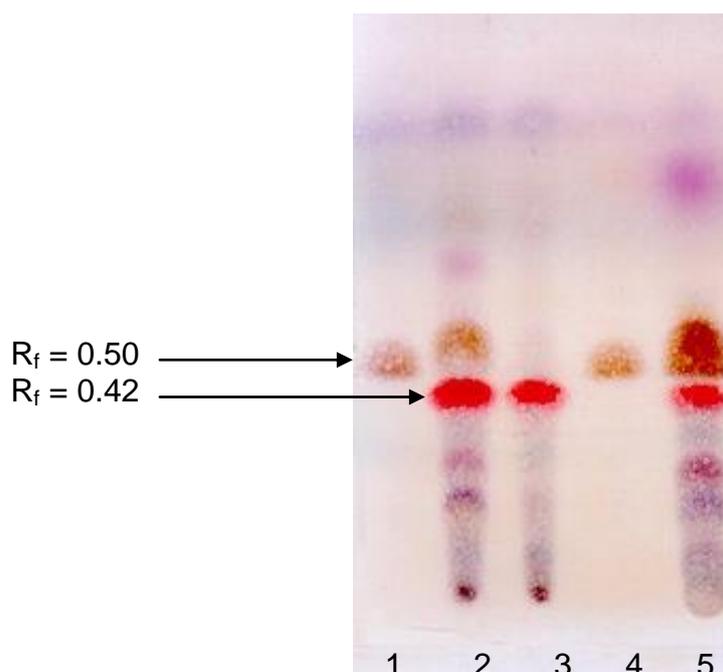


Figura 8- CCDC das amostras no 13º dia de fermentação no meio M1: **1** – Padrão de AJ; **2** – Linhagem C 83; **3** - Linhagem C 3.4.7.9; **4** – Padrão de AJ; **5** – Linhagem Kijn 3.1.

Na figura 09 apresenta-se o perfil cromatográfico das amostras, das linhagens de *B. rhodina*, no 13º dia de fermentação. Através da cromatoplaça verifica-se a presença de AJ em apenas algumas das amostras. CCDC é uma técnica qualitativa e de pouca sensibilidade, assim se a substância em questão estiver presente em baixas concentrações pode ficar difícil sua visualização. Portanto todas as amostras foram então injetadas no CLAE para a devida quantificação de AJ presente.

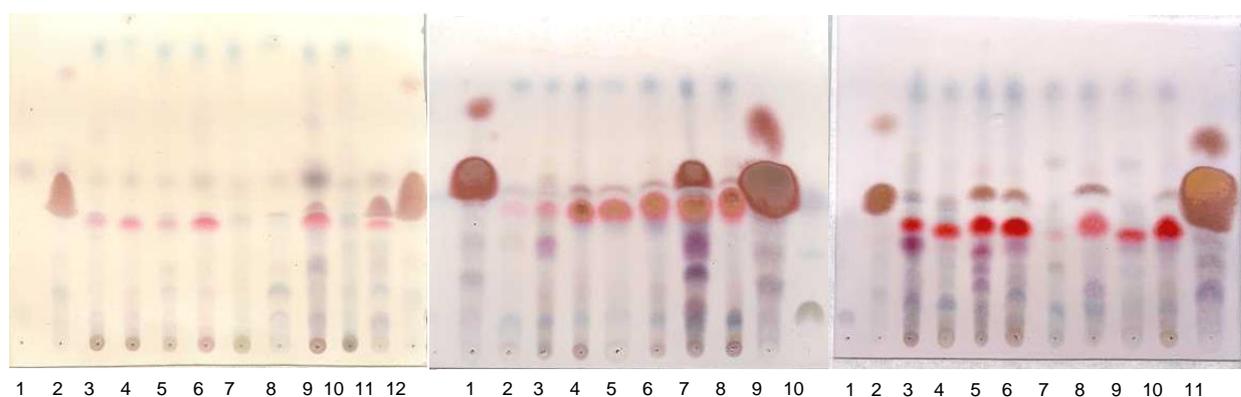


Figura (a)		Figura (b)		Figura (c)	
Número	Amostras	Número	Amostras	Número	Amostras
1	Padrão AG	1	Padrão AJ	1	Padrão AG
2	Padrão AJ	2	Mg 06	2	Padrão AJ
3	C 83	3	Mg 08	3	Mg 14
4	Mg 01	4	Mg 09	4	Mg 15
5	Mg 03	5	Mg 10	5	Mg 16
6	Mg 06	6	Mg 11	6	Mg 17
7	Mg 08	7	Mg 12	7	Mg 18
8	Mg 09	8	Mg 13	8	Mg 19
9	Mg 10	9	Padrão AJ	9	Mg 20
10	Mg 11	10	Padrão ag	10	Mg 21
11	Mg 12			11	Padrão AJ
12	C 81				

Figura 9 — Perfil Cromatográfico das amostras de fermentação no meio MIERSCH Modificado (M2) em CCDC em linhagens de *B. rhodina*: (C 83, C 81, Mg 1, Mg 03, Mg 06, Mg 08, Mg 09, Mg 10, Mg 11, Mg 12, Mg 13, Mg 14, Mg 15, Mg 16, Mg 17, Mg 18, Mg 19, Mg 20, Mg 21. Padrão de AG e Ácido Jasmônico (AJ).

2.3.4 Detecção de Jasmonatos produzidos por *Botryosphaeria rhodina* por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os estudos de caracterização por CLAE mostram que mesmo não havendo uma produção considerável de ácido jasmônico em relação às linhagens cubanas (em torno de 700mg/L, as linhagens brasileiras produziram em meio Miersch modificado (M2) em torno de 280 mg/L (Kifn 3.1).

A detecção do AJ e seus derivados através de Cromatografia Líquida de Alta Resolução (CLAE) nos tempos de retenção correspondentes aos anteriores relatados (UEDA, 1994) com tempos de retenção de 9,8 a 12 minutos.

Na tabela 05, é mostrada a quantificação de ácido Jasmônico pelas linhagens de *Botryosphaeria rhodina* em fermentação submersa por 13 dias, utilizando meio de cultivo Miersch Modificado (M2) pelo método de CLAE.

Tabela 5- Quantificação de AJ produzido pelas linhagens de *Botryosphaeria rhodina* em fermentação submersa por 13 dias, utilizando meio de cultivo Miesch Modificado (M2).

Linhagens	Quantidade de Jasmonatos (mg/)
Mg 01	99,0
Mg 03	123,6
Mg 06	21,8
Mg 08	4,7
Mg 09	4,2f
Mg 10	4,4
Mg 12	58,15
Mg 14	8,3
Mg 16	6,20
Mg 17	1,75
Mg 18	Não produziu
Mg 19	2,38
Mg 20	3,43
Mg 21	20,1
Mg 22	2,0
Mg 23	3,0
Mg 24	2,43
Mg 25	1,93
Mg 26	4,4
Mg 27	4,2
Mg 28	1,65
Mg 29	1,2
IRO 2	Não produziu
Kifn 1.2	20
Kifn 1.3	50
Kifn 2.2	50
Kifn 2.3	0,085
Kifn 3.1	283,2
Kifv 2.2	Não produziu
C 905	Não produziu
C 81	Não produziu
C 83	Não produziu
C 3.4.7.9	Não produziu
C 3.1.8.4	Não produziu
C 1517	400
C 2334	450

A linhagem Kifn 3.1 foi à linhagem brasileira que produziu maior quantidade de ácido jasmônico ($R_f = 0,50$). Na figura 10 é mostrado o perfil cromatográfico da linhagem Kifn 3.1 de *B. rhodina* por CLAE.

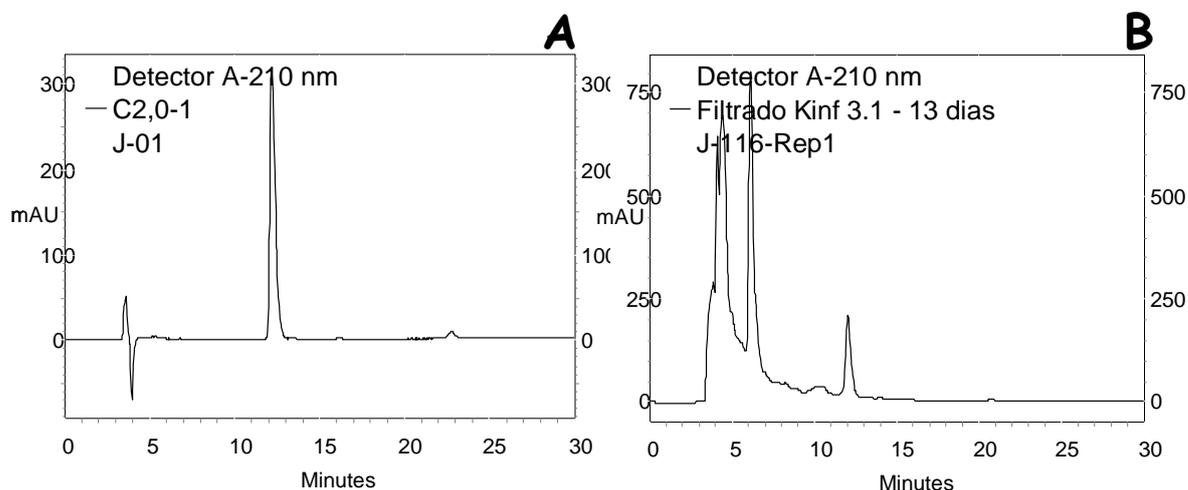


Figura 10 – Perfil cromatográfico do composto Fr6 ($R_t = 12.23$ produzido pela linhagem Kifn 3.1).

A produção de jasmonatos a partir de microrganismos é bem limitada, alguns relatos demonstram ser esta a via mais vantajosa economicamente (MIERSCH, 1989).

Miersch et al., (1998), estudaram a ocorrência de jasmonatos e seus derivados em filtrados de *Fusarium oxysporum f. sp. matthiolae*. Foram identificados vinte e dois compostos sendo que dentre estes dez já haviam sido identificados como produzidos por plantas. Todas as ciclopentanonas apresentaram cadeias nas formas cis ou trans. O ácido 1,2 oxo-fitodienóico não foi detectado nesta cultura.

Mediante diversos estudos têm-se verificado a importância dos jasmonatos na resposta de defesa das plantas contra fitopatógenos (BOSTOCK, 1999). O efeito pode estar ligado diretamente a sua atividade inibitória sobre a formação de apressórios ou na indução do acúmulo de compostos, com efeito, antimicrobiano.

Altuna et al., (2000) relata que, uma vez constatada a importância da via microbiana de produção de ácido jasmônico, estudos com relação a seleção de isolados,

otimização de condições e meios de cultivo podem contribuir muito para a diminuição do custo destes produtos no mercado.

De acordo com Altuna et al., (2000) os melhores resultados em relação à produção de jasmonatos foram alcançados utilizando a sacarose como fonte de carbono e alguns sais inorgânicos, ao passo que ao substituir a sacarose pela glicose a produção caiu consideravelmente.

Gunther et al., (1990) relataram que sais inorgânicos como sódio, potássio ou nitrato de cálcio foram as melhores fontes para a produção de jasmonatos com *B. theobromae* (linhagem D 7/2), permitindo uma concentração final de jasmonatos de até 800 mg/L com sacarose ou glicose como fontes de carbono.

Silva (2003), relata que os isolados de fungos micotoxigênicos de uma mesma espécie de *Penicillium* sp, apresentaram produções diferenciadas de toxinas como aflotoxina e ocratoxina nas mesmas condições de cultivo.

Silva et al., (2004), identificaram *Botryodiplodia* sp como o provável causador da doença observada em de *Khaya ivorensis* (mogno africano), em um plantio modelo da CEPLAC/Bahia, devido este ser encontrado na literatura como um dos maiores causadores de doenças nas regiões tropicais e subtropicais, além de causar ainda podridão do caule e dos ramos de algumas espécies de plantas.

Silva et al., (2007), estudaram o perfil químico de *Botryosphaeria rhodina* isolado de *Khaya ivorensis* (mogno africano). Do estudo químico realizado foi isolado e identificado dois derivados da Lasiodiplodina (R), Metilasiiodiplodina; (S) des –Ometillasiodiplodina e dois derivados de ácido jasmônico o (11S) Hidroxijasmônico e (11R) Hidroxijasmônico sendo estes isolados em mistura. As substancias foram identificadas por ressonância magnética nuclear de 1D e 2D.

Rosa Jr. et al., (2005), investigaram as mudanças na expressão gênica em folhas de cana-de-açúcar expostas ao MeJA usando arranjos de cDNA. O RNA total isolado a 0, 0,5, 1, 3, 6 e 12 horas após o tratamento com MeAJ foi utilizado para a síntese de sondas contendo α -33P-dCTP, as quais foram, posteriormente, hibridizadas em membranas de náilon contendo 1.536 clones de cDNA. Um aumento significativo na expressão gênica em resposta ao MeJA foi detectado em genes que respondem a estresses e também em genes com função desconhecida, enquanto os genes que participam da fotossíntese e da assimilação de carboidratos foram reprimidos. A expressão do mRNA revelaram possíveis proteínas novas relacionadas a estresses induzidas por MeAJ e os tecidos onde os genes regulados por MeJA são preferivelmente expressos.

Neste trabalho foi possível observar as diferentes respostas de linhagens da mesma espécie submetidas às mesmas condições de cultivo.

O fato de microrganismos de uma mesma espécie, mas, de linhagens diferentes, apresentarem produção de metabólitos secundários diferenciada provavelmente ocorre através de mecanismos de indução e repressão catabólica a nível gênico este fato confirma-se nos trabalhos de Eng et al., (1998) onde citam que a produção de jasmonatos ocorre em linhagens dependentes.

2.4. CONCLUSÃO

As linhagens de *B. rhodina* estudadas mostraram diferenças em relação a sua morfologia, ao crescimento micelial de acordo com o meio de cultura utilizado, além de apresentarem coloração diferenciada nos meios de culturas testadas.

As linhagens brasileiras utilizadas no presente estudo tiveram maior crescimento micelial do que as linhagens cubanas.

A produção de AJ foi detectada em quase todas as linhagens brasileiras sendo que as linhagens Mg 03 e Kifn 3.1 foram as mais produtoras, obtendo concentrações de 123,6 mg/L e 283,2 mg/L respectivamente.

3. IDENTIFICAÇÃO DE HAPLÓTIPOS GERADOS A PARTIR DE REGIÕES ITS DO rDNA DE LINHAGENS DE *Botryosphaeria rhodina* PRODUTORAS DE JASMONATOS.

RESUMO

Isolados do fungo filamentososo *Botryosphaeria* representam um grupo com ampla distribuição mundial, podendo causar danos em diversas madeiras comerciais, árvores frutíferas e ornamentais. Neste trabalho, trinta e três linhagens brasileiras duas linhagens cubanas de *B. rhodina*, produtoras de jasmonatos, foram submetidas à análise molecular de regiões ITS do rDNA para avaliação da diversidade genética. A extração do DNA foi realizada por métodos clássicos, seguido da amplificação das regiões conservadas ITS do rDNA por meio da técnica de PCR, onde foram utilizados os oligonucleotídeos ITS1 (5` - TCC GTA GGT CCT GCG G - 3`) e ITS4 (5` - TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3`). Os produtos da PCR foram purificados por meio do Kit de Purificação GFX (*Amersham Bioscience*) e os fragmentos de DNA ribossomal amplificados foram identificados por sequenciamento de DNA em sequenciador “MegaBACE” 1000 – DNA analysis System (*Amersham Biosciences – Pharmacia*). As seqüências de DNA das linhagens foram comparadas com as seqüências disponíveis nos bancos de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), com auxílio da ferramenta computacional BLAST. O alinhamento das seqüências foi realizado por meio do programa ClustalW do pacote computacional BioEdit. Os alinhamentos foram convertidos em distâncias genéticas pelo método de Kimura dois-parâmetros e a construção da árvore filogenética foi feita pelo método *Neighbor-Joining* utilizando-se o programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA). A distância genética entre as trinta e três linhagens variou de 0 a 1,6%. A taxa de transição/transversão foi de 1,2. Os alinhamentos foram submetidos ainda ao Programa TCS, resultando na identificação de nove haplótipos e 10 sítios polimórficos. A matriz de distância genética assim como a árvore filogenética resultante mostrou pouca divergência genética nas regiões de DNA analisadas.

Palavra-chave: 1. *Botryosphaeria rhodina*, 2. Jasmonatos, 3 rDNA

3. GENETIC DIVERSITY OF ISOLATED OF PRODUCING BOTRYOSPHAERIA RHODINA OF JASMONATOS.

ABSTRACT

The filamentous fungus, especially the isolated ones of *Botryosphaeria*, represent a group with ample world-wide distribution, being able to cause fruitful and ornamental damages in diverse commercial wood, trees. Thirty and three Brazilian ancestries of *rhodina* B. and two Cuban ancestries had been evaluated how much to the production of jasmonates, after to have been cultivated in Half Mierch and how much to the molecular analysis. The extration of the DNA was carried through according to Raeder and Broda. The amplification of the region conserved ITS of rDNA was carried through by means of the PCR technique, where oligonucleotídeos ITS1 (5` - TCC GTA GGT CCT GCG G -3`) and ITS4 had been used (5` - TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3`). The product of the PCR was purificado through the Kit of Purificação GFX (Amersham Bioscience). The fragmentos of ribossomal DNA PCR had been submitted to the reading in seqüenciador "MegaBACE" 1000 - analysis DNA System (Amersham Biosciences - Pharmacia). The sequences of the ancestries had been submitted the comparison with the sequences previously deposited in the data base of the National Center will be Biotecnology Information (NCBI), with assist of computational tool BLAST. The criterion used for the identification was analysis of score gotten by the alignment of the sequence deposited in the data base and the gotten sequences of the thirty and three ancestries. The alignment of the sequences was carried through through the program Clustal W of the computational package BioEdit for the accomplishment of the alignment. The alignments had been converted into genetic distances for the method of Kimura two-parameters and the construction of the filogenética tree was made as job of the Neighbor-Joining method using itself the program Molecular Evolutionary Genetics Analisis (MEGA). In the distance genetic between the thirty and three ancestries it varied of 0 the 1,6%. The transição/transversão tax was of 1,2 and the ratio of bases was: 23,2% of adenine, 24,3% of timina, 24,1% of guanina and 28,3% of citosina. The alignments had been submitted still to Program TCS, resulting in the identification of nine haplótipos and 10 polimórficos small farms. The matrix of genetic distance as well as the construction of the filogenética tree had shown little genetic divergence between the ancestries. The filamentous fungus, especially the isolated ones of *Botryosphaeria*, represent a group with ample world-wide distribution, being able to cause fruitful and ornamental damages in diverse commercial wood, trees. Thirty and three Brazilian ancestries of *rhodina* B. and two Cuban ancestries had been evaluated how much to the production of jasmonates, after to have been cultivated in Half Mierch and how much to the molecular analysis. The extration of the DNA was carried through according to Raeder and Broda. The amplification of the region conserved ITS of rDNA was carried through by means of the PCR technique, where oligonucleotídeos ITS1 (5` - TCC GTA GGT CCT GCG G -3`) and ITS4 had been used (5` - TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3`). The product of the PCR was purificado through the Kit of Purificação GFX (Amersham Bioscience). The fragmentos of ribossomal DNA PCR had been submitted to the reading in seqüenciador "MegaBACE" 1000 - analysis DNA System (Amersham Biosciences - Pharmacia). The sequences of the ancestries had been submitted the comparison with the sequences previously deposited in the data base of the National Center will be Biotecnology

Information (NCBI), with assist of computational tool BLAST. The criterion used for the identification was analysis of score gotten by the alignment of the sequence deposited in the data base and the gotten sequences of the thirty and three ancestries. The alignment of the sequences was carried through through the program Clustal W of the computational package BioEdit for the accomplishment of the alignment. The alignments had been converted into genetic distances for the method of Kimura two-parameters and the construction of the filogenética tree was made as job of the Neighbor-Joining method using itself the program Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA). In the distance genetic between the thirty and three ancestries it varied of 0 the 1,6%. The transição/transversão tax was of 1,2 and the ratio of bases was: 23,2% of adenine, 24.3% of timina, 24.1% of guanina and 28.3% of citosina. The alignments had been submitted still to Program TCS, resulting in the identification of nine haplótipos and 10 polimórficos small farms. The matrix of genetic distance as well as the construction of the filogenética tree had shown little genetic divergence between the ancestries.

Words Keys: 1. *Botryosphaeria rhodina* 2. Jasmonate 3. rDNA

3.1 INTRODUÇÃO

O diagnóstico precoce de doenças em plantas é uma etapa crucial no sistema de controle e proteção da agricultura. Quando o diagnóstico é baseado somente em sintomatologia pode, muitas vezes, não ser preciso.

Devido aos avanços da Biologia Molecular a detecção precoce dos patógenos tem conseguido um enorme progresso, oferecendo instrumentos para confirmação precisa do agente causal, com rapidez, especificidade e sem necessidade de isolar o agressor. Esses métodos, baseados principalmente no uso de DNA, tem suplantado, em muitos aspectos, o uso das técnicas imunológicas ou sorológicas, ainda bastante utilizadas. Diante disso, optou-se por analisar, ao nível de DNA, isolados fitopatógenos de *Botryosphaeria*.

Segundo Masilamini & Muthumary (1996), estes microrganismos são patógenos facultativos que infectam diferentes partes da planta como caule, folhas e frutos, em diferentes estágios do desenvolvimento. Tanto o cancro, como o apodrecimento dos galhos ou das raízes tem sido as observações mais comuns relatadas e constituem graves problemas para a agricultura e horticultura, comprometendo também a estocagem de frutas cascas e tubérculos.

O cancro caracteriza-se por lesões necróticas nos tecidos, manifestando-se pelo escurecimento da casca e do lenho, sendo visualizado pela gomose na área lesionada. Devido à sua presença, ocorre a morte progressiva do ápice das árvores, comumente denominado *dieback*, detectado através das folhas esbranquiçadas e galhos secos. A quebra dos galhos pode ocorrer por ação do vento, na altura da região lesionada. Nos frutos, inicialmente surgem lesões circulares de coloração marrom e halo avermelhado, evoluindo para lesões profundas e conseqüente apodrecimento (SILVEIRA et al., 2001).

A utilização das técnicas moleculares é interessante quando se deseja identificar o grau de similaridade ente os isolados em estudo. Portanto, é nesse sentido que se insere o objetivo principal deste trabalho, ou seja, caracterizar geneticamente por meio de

sequenciamento do DNA ribossomal os isolados de *B. rhodina* obtidos de diferentes hospedeiros, diferentes locais geográficos e com diferentes perfis de produção de ácido jasmônico.

3.2 MATERIAL DE MÉTODOS

3.2.1 Material Biológico

Foram utilizadas trinta e uma linhagens patogênicas brasileiras de *B. rhodina*, obtidas de diferentes hospedeiros de diferentes regiões geográficas. Desse total vinte e dois foram isolados para o desenvolvimento dessa pesquisa sendo vinte de mangueira (*Mangifera indica*) e duas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). Os demais onze isolados foram gentilmente cedidos por outros centros de pesquisa. Da UFPE – PE utilizou-se 1(um) isolado de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e um isolado de mamão (*Carica papaya*); da UFSCar foram utilizados 5 (cinco) isolados de mogno (*Swietenia macrophylla*); do INPA foram utilizados 2 (dois) isolados de madeira cortada e, integraram ainda as amostras dessa pesquisa 2 (dois) isolados de ICIDE (Havana – Cuba) obtidos de plantas de laranjeiras. A identificação dos isolados se encontra na tabela 1.

Estas linhagens foram mantidas em meio sólido inclinado de BDA (batata-dextrose-ágar) á temperatura ambiente (25°C), tendo sido repicados trimestralmente. O método de Castellani foi usado para manutenção permanente das linhagens fúngicas (CASTELLANI, 1967).

3.2.2 Amostras

Todas as amostras de plantas (folhas, frutos e madeira cortada) utilizadas para o isolamento dos fitopatógenos apresentavam sintomas de lesões.

3.2.3 Preparação dos Inóculos

As linhagens de *B. rhodina* foram inoculadas em meio Batata-Dextrose- BD (2% dextrose; q.sp. 100 mL de caldo de batata) durante 5 dias em cultura estática e submersa, em estufa BOD a 28°C. Após este período, o micélio foi separado do meio de cultura por filtração.

3.2.4 Extração de Ácidos Nucléicos

Os ácidos nucleicos foram extraídos segundo Raeder & Broda, (1985), com modificações descritas a seguir. A massa micelial obtida foi triturada em cadinho de porcelana com nitrogênio líquido e o pó obtido, foi transferido para tubos de microcentrífuga de 2 mL. Foi adicionado 900 µL de tampão de extração (Tris HCl 1M pH 8,0; EDTA 0,5M pH 8,0; SDS 10%; NaCl 5M água ultrapura) para cada grama de micélio. Após a homogeneização, os tubos de microcentrífuga foram incubados por 1 hora a 65°C. A seguir foi adicionado um volume da solução de fenol hidratado pH 8,0, misturando suavemente as fases e centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos. A fase aquosa foi recuperada e transferida para um novo tubo de microcentrífuga e a esta foi adicionado igual volume de clorofane (fenol-clorofil) (1:1) e agitado por suaves inversões por cerca de 5 minutos. Esse material foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos e foi transferida a fase aquosa para outro tubo; Adicionou igual volume de clorofil (clorofórmio + álcool isoamílico 24:1) e agitou por suaves inversões por cerca de 5 minutos. Novamente a solução foi homogeneizada e centrifugada na mesma condição anterior, onde o sobrenadante foi recuperado e transferido para um outro tubo de microcentrífuga. A este tubos foi acrescentado NaCl 3M para uma concentração final de 0,3 M. A seguir, foram adicionados dois volumes de etanol resfriado a -20°C. Nesta fase foi possível visualizar o DNA precipitado. As amostras novamente foram submetidas a centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi

descartado e o precipitado obtido foi lavado com etanol 70%. Em seguida deixou-se o pellet secando por duas horas. O pellet foi ressuscitado em tampão TE pH 8,0.

3.2.5 Quantificação do DNA

A concentração de DNA foi estimada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%, juntamente com um marcador conhecido (High DNA Mass Ladder – Invitrogen). Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio, e observado sobre transluminador de ultravioleta e fotodocumentador.

3.2.6 Amplificação das Regiões ITS do rDNA

Os fragmentos de DNA ribossomal (rDNA) (regiões ITS1 -5,8S rDNA - ITS2) foram amplificados por PCR, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (5` - TCC GTA GGT CCT GCG G -3`) e ITS4 (5` - TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3`) (WHITE et al., 1990). As reações de amplificação foram preparadas em um volume final 25 µL para cada reação. Os reagentes contidos na reação de 25µL, foram: 2,5 µL de tampão; 2,5 µL de dNTP (25mM); 1,0 µL de oligonucleotídeos ITS1 20mM; 1,0 µL de oligonucleotídeos ITS4 20mM; 3,0 µL de MgCl (25mM); 0,3 µL de Taq Polimerase (Invitrogen Life Technologies, USA – 5U/ µL; 3µL de DNA genômico e 11,7 µL de Água Mili Q. A reação de PCR foi realizada em termociclador Mastercycler gradient da Eppendorf previamente programado para realizar uma desnaturação inicial de 2 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos, sendo que cada ciclo consiste de uma etapa de desnaturação (1minuto a 94°C), uma etapa de pareamento (1 minuto a 50°C) e uma etapa de alongamento (2 minutos a 72°C e por fim uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Este programa de amplificação teve duração de aproximadamente três horas.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,0% por cerca de uma hora e meia, corados com brometo de etídio (1µg/mL), (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). O DNA evidenciado foi fotografado sob luz UV em

transluminador. Foi utilizado 100 Base-Pair Ladder (GE Healthcare) como marcador molecular de peso de bandas. O tamanho do fragmento amplificado foi comparado com marcador para determinar se correspondia ao esperado.

3.2.7 Purificação do produto amplificado

Para eliminação dos produtos não incorporados na reação de amplificação foi utilizado o Kit GFX (*Amersham Bioscience*) e a purificação do produto amplificado foi realizado de acordo com as especificações do fabricante.

O resultado da purificação foi observado a partir de 3 μ L do DNA amplificado e purificado, mais 2 μ L do tampão da amostra (5X) em gel de agarose 1,0% e também 5 μ L do marcador molecular DNA Ladder 1 Kb para se estimar sua concentração e qualidade.

3.2.8 Sequenciamento das Regiões ITS + 5,8S + ITS2 do rDNA

Os fragmentos de DNA ribossomal amplificados na PCR foram sequenciados, segundo o método de Sanger, Nicklen & Coulson (1977), utilizando-se o oligonucleotídeo ITS4 20mM. As reações de sequenciamento foram realizadas em volume final de 10 μ L (Kit da DYEnamic – Amersham Biosciences – Pharmacia), contendo 3,0 μ L de água Milli-Q; 2,0 μ L de DNA purificado; 1,0 μ L do iniciador ITS4; 4,0 μ L da solução de sequenciamento (pré-mix). A reação foi submetida a um termociclador Mastercycler gradient da Eppendorf, previamente programado. A etapa inicial de desnaturação será de 95°C por 25 segundos; 30 ciclos, sendo 95°C por 15 segundos para desnaturação das fitas complementares, 50°C por 20 segundos para haver anelamento do iniciador e 60°C por 1 minuto para ocorrer a extensão da região a ser sequenciada. Este programa de amplificação totalizará cerca de 90 minutos. Após o termino da reação de PCR foi realizada a reação de precipitação.

A eletroforese capilar em gel de poliacrilamida foi realizada com base na metodologia padrão do fabricante. Para condições de injeção: 3 KV por 80 segundos;

condições de corrida: 6 KV por 200 minutos; sob uma temperatura de 44°C. A incorporação de cada dideoxynucleotídeo marcado com um cromóforo na reação de sequenciamento cíclico será lido no sequenciador automático pela captação da fosforilação.

Todas as etapas do sequenciamento do DNA foram realizadas no Laboratório de Tecnologia do DNA do Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) da Universidade Federal do Amazonas.

3.2.9 Análise das Sequências Nucleotídicas das Regiões ITS

Após o término do sequenciamento das amostras, foi realizada a conferência e edição visual entre as sequências por comparação com o padrão apresentado no cromatograma de cada reação. As amostras analisadas foram alinhadas no Programa CLUSTALX (THOMPSON *et. al.*, 1997), do programa BioEdit (HALL, 1999) e comparadas com as sequências previamente depositadas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (2005) com o auxílio da ferramenta computacional BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para uma busca de sequência armazenada (ALTSCHUL *et al.*, 1990). O critério utilizado para a identificação foi à análise do *score* obtido pelo alinhamento da sequência com as depositadas no banco de dados e a sequência que apresentou melhor match no alinhamento.

Os alinhamentos foram convertidos em distâncias genéticas pelo método de Kimura (KIMURA, 1980) dois-parâmetros e a construção da árvore filogenética foi feita através do método *Neighbor-Joining* (NJ), (SAITOU *et al.*, 1987), através do pacote computacional *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA). O formato de entrada dos dados utilizado para o MEGA foi o NEXUS (MADDISON, *et al.*, 1997). O grau de confiabilidade da árvore filogenética utilizado foi o *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985), com 1000 repetições.

Os alinhamentos foram submetidos ainda ao Programa TCS, resultando na identificação de haplótipos.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Análise molecular

Ao utilizar os oligonucleotídeos ITS1 e ITS4, para a amplificação dos fragmentos da região ITS1 - 5,8S rDNA - ITS2 de cada um dos 33 isolados de *B. rhodina* o produto amplificado correspondeu a 454 pares de bases (pb).

O critério utilizado para a identificação de cada linhagem foi à análise do *score* obtido pelo alinhamento das sequências com as depositadas no banco de dados do GenBank e a sequência que apresentou melhor *match* no alinhamento.

Após a confrontação das sequências obtidas com as depositadas no GenBank, verificou-se que todas as trinta e três linhagens apresentaram similaridade genética que variou de 99% a 100% com a sequência depositada do fungo *B. rhodina*.

A ferramenta Blast fornece uma lista de organismos cujas sequências mais se assemelham àquela sequência confrontada, apresenta a porcentagem de bases semelhantes entre os dois organismos e o quão confiável é a correlação entre as linhagens confrontadas e aquela semelhante, depositada no banco de dados (ALTSCHUL et al., 1997). Os resultados da comparação com os acessos do GenBank, (NCBI), confirmaram a amplificação de parte das sequências do gene RNA ribossomal 18S, ITS1, 5,8S, sequência completa da região ITS2 e parte do 28 S (Tabela 6).

Tabela 06 – Linhagens de *Botryosphaeria rhodina*, Hospedeiros, Local de Coleta, e Sequência Correspondente no GenBank.

Isolados	Hospedeiros	Local Da Coleta	Fungos	Sequência correspondente no Genbank
Mg 01	Mangueira	Manaus/UFAM	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	EF 641303.1
Mg 03	Mangueira	Manaus/UFAM	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	DQ 233597.1
Mg 06	Mangueira	Manaus/UFAM	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	EF 622017.1
Mg 08	Mangueira	Manaus/UFAM	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	EF 622017.1
Mg 09	Mangueira	Manaus/UFAM	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	EF 622017.1
Mg 10	Mangueira	Manaus/UFAM	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	EF 622017.1
Mg 12	Mangueira	Manaus/UFAM	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	EF 622017.1
Mg 14	Mangueira	Manaus/UFAM	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	DQ 233597.1
Mg 16	Mangueira	Manaus/UFAM	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	DQ 233597.1
Mg 17	Mangueira	Manaus/UFAM	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	EF 622017.1
Mg 18	Mangueira	Manaus/UFAM	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	EF 622017.1
Mg 20	Mangueira	Manaus/UFAM	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	EF 622017.1
Mg 21	Mangueira	Manaus/UFAM	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	EF 622017.1
Mg22	Mangueira	Manaus/UFAM	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	EF 622017.1
Mg 23	Mangueira	Manaus/UFAM	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	EF 622017.1
Mg 24	Mangueira	Manaus/UFAM	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	EF 641303.1
Mg25	Mangueira	Manaus/UFAM	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	EF 641303.1
Mg 26	Mangueira	Manaus/UFAM	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	EF 622017.1
Mg 27	Mangueira	Manaus/UFAM	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	EF 622017.1
Mg 28	Mangueira	Manaus/UFAM	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	EF 622017.1
Mg 29	Mangueira	Manaus/UFAM	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	EF 622017.1
IRO 02	Cupuaçureiro	Manaus/UFAM	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	EF 622017.1
Kifn 1.2	Mogno	São Carlos/SP	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	EF 641303.1
Kifn 1.3	Mogno	São Carlos/SP	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	EF 641303.1
Kifn 2.2	Mogno	São Carlos/SP	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	EF 641303.1
Kifv 2.2	Mogno	São Carlos/SP	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	EF 622017.1
Kifn 3.1	Mogno	São Carlos/SP	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	EF 641303.1
C81	Madeira	Manaus/INPA	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	EF 622017.1
C83	Madeira	Manaus/INPA	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	EF 622017.1
C 3.4.7.9	Cupuaçureiro	Recife/PE	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	EF 641303.1
C 3.1.8.4	Mamoeiro	Recife/PE	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	EF 622017.1
C 1517	Laranjeira	Cuba/Havana	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	EF 622017.1
C 2334	Laranjeira	Cuba/Havana	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	EF 622017.1

Após o sequenciamento e alinhamento dos fragmentos de DNA, foi observado que há pouca diferença entre as trinta e três linhagens. Apesar da baixa variabilidade genética encontrada entre as linhagens, com auxílio do programa TCS (CLEMENT et al., 2000), onde foram encontrados 9 (nove) haplótipos os quais podem ser observados na figura 11.

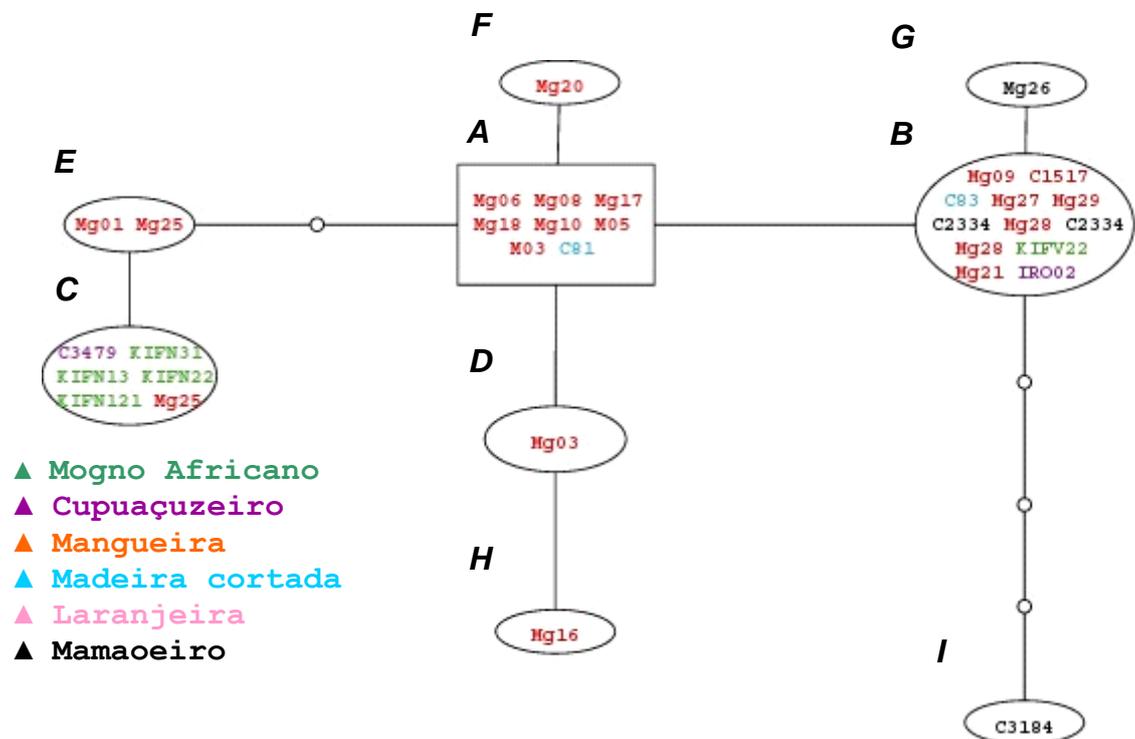


Figura 11 – Haplótipos identificados com o Programa TCS. Foram obtidos nove haplótipos de *Botryosphaeria rhodina*. O haplótipo com maior probabilidade de ser o ancestral está representado no quadrado. Os valores identificados na figura significam em quais sítios ocorreram as mutações e os círculos *o* significam haplótipos não amostrados.

O Haplótipo **A** foi composto com oito isolados: Mg 06, Mg 08, Mg 17, Mg 18, Mg 10, M 03, M 05, C81, e possivelmente tenha sido o ancestral comum entre as outras linhagens. Juntamente com o haplótipo **A**, os haplótipos **B** (Mg 09, C 1517, C 83, Mg 27, Mg 29, C 2334, Mg 28, Kifv 2.2, Mg 21, IRO 02) e o haplótipo **C** (C 3.4.7.9, Kifn 3.1, Kifn 1.3, Kifn 2.2, Kifn 1.2, Mg 25) foram considerados os mais freqüentes. Os haplótipos **D** (Mg 03, Mg 12, Mg 14) e **E** (Mg 01 e Mg 24), foram considerados os menos freqüentes. Os haplótipos **F** (Mg 20), **G** (Mg 26), **H** (Mg 16) e **I** (C 3.1.84) são considerados haplótipos raros (singleton), sendo constituídos de apenas uma linhagem (únicos).

Comparando os haplótipos com as plantas hospedeiras observou-se que não houve especificidade entre hospedeiro e as linhagens.

Saldanha, 2006, analisando oito isolados Brasileiros de *Botryosphaeria* (anamorfos e teleomorfos) e uma linhagem Australiana de *Botryosphaeria rhodina* (isolado MAMB-5), estudaram as sequências de ITS1/5,8S/ITS2 entre os isolados de *Botryosphaeria rhodina*, *Lasiodiplodia theobromae* e *Botryosphaeria ribis* onde observaram uma alta similaridade genética entre as linhagens de *B. rhodina* e *L. theobromae* em comparação com o isolado identificado como *B. ribis*. Observaram um índice de variação intra-específica (entre *B. rhodina* e *L. theobromae*) na ordem de 1,2%, sendo as variações concentradas principalmente nas regiões 18S e ITS1. A maioria das alterações (83,33%) foram observadas nos isolados coletados de mangueira e apenas uma substituição em relação aos demais isolados foi observada no isolado de berinjela. As trocas nucleotídicas intra-específicas observadas foram quatro transições sendo uma no fragmento sequenciado do gene 18S e três na região do ITS1 e duas transversões, (no fragmento do gene 18S e na região ITS1 respectivamente)

3.3.2 Análise filogenética

A análise filogenética das sequências das regiões ITS das linhagens patogênicas de *B. rhodina*, obtidas de diferentes hospedeiros, produtoras de jasmonatos, foi realizada por comparação com sequências disponíveis no Banco Mundial de Sequências (National Center for Biotechnology Information – NCBI).

Constatou-se que todas as trinta e três (33) linhagens, estudadas, apresentaram de 99% a 100% de similaridade genética com *B. rhodina*. Foi verificada ainda, a presença de 10 sítios polimórficos na região ITS (Tabela7). A taxa de transição/transversão foi estimada em torno de 1,2.

A proporção de bases nucleotídicas que compõem o DNA sequenciado foi de 23,2% de adenina, 24,3 de timina, 24,1 de guanina e 28,3 de citosina (Figura 12).

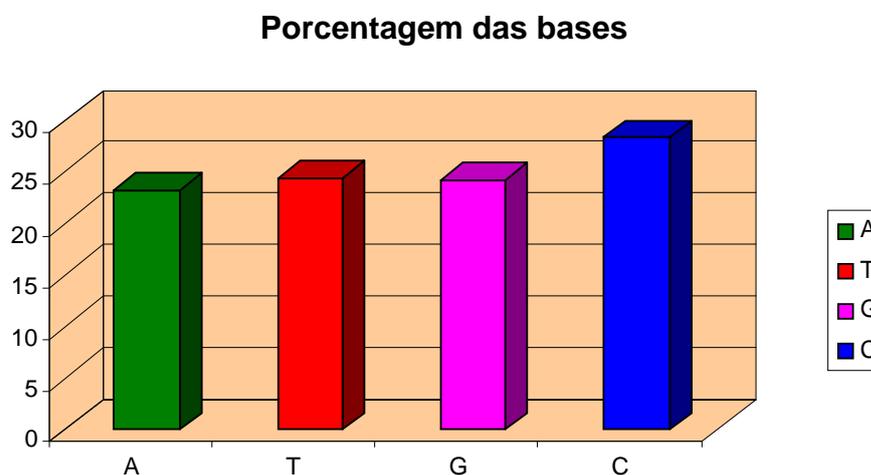


Figura 12 – Porcentagem de bases 23,2% de adenina, 24,2% de timina, 24,1% de guanina e 28,2% de citocina.

Saldanha, (2006), ao analisar as variações inter-específica observada entre *B. rhodina* e *L. theobromae* contra *B. ribis* foi da ordem de 16,63% , apresentando 19 transversões, 16 transições, 2 deleções de 2 nucleotídeos nas posições 376 e 415 da região do ITS2. Essas deleções foram altamente conservadas em todas as linhagens de *B. rodhina* e *L. theobromae* depositadas no GenBank, não tendo sido descrita em nenhuma outra espécie do gênero *Botryosphaeria*. Essas deleções podem ser consideradas como uma importante característica na discriminação entre *B. rhodina* e as outras espécies do gênero.

A distância genética entre as trinta e três linhagens de *B. rhodina* variaram de 0 a 1,6%. A matriz de distancia genética (Tabela 8), assim como a construção da árvore filogenética (Figura 13), mostraram pouca divergência genética entre as linhagens.

As relações filogenéticas entre as linhagens de *B. rhodina* foram analisadas pelo método *Neighbor-Joining* por meio do pacote computacional *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA). Uma análise de *bootstrap* foi feita com 1000 repetições.

A análise filogenética obtida pelo método de *Neighbor-Joining* demonstrou pouca diferença entre as linhagens corroborando com o método TCS (formação dos haplótipos).

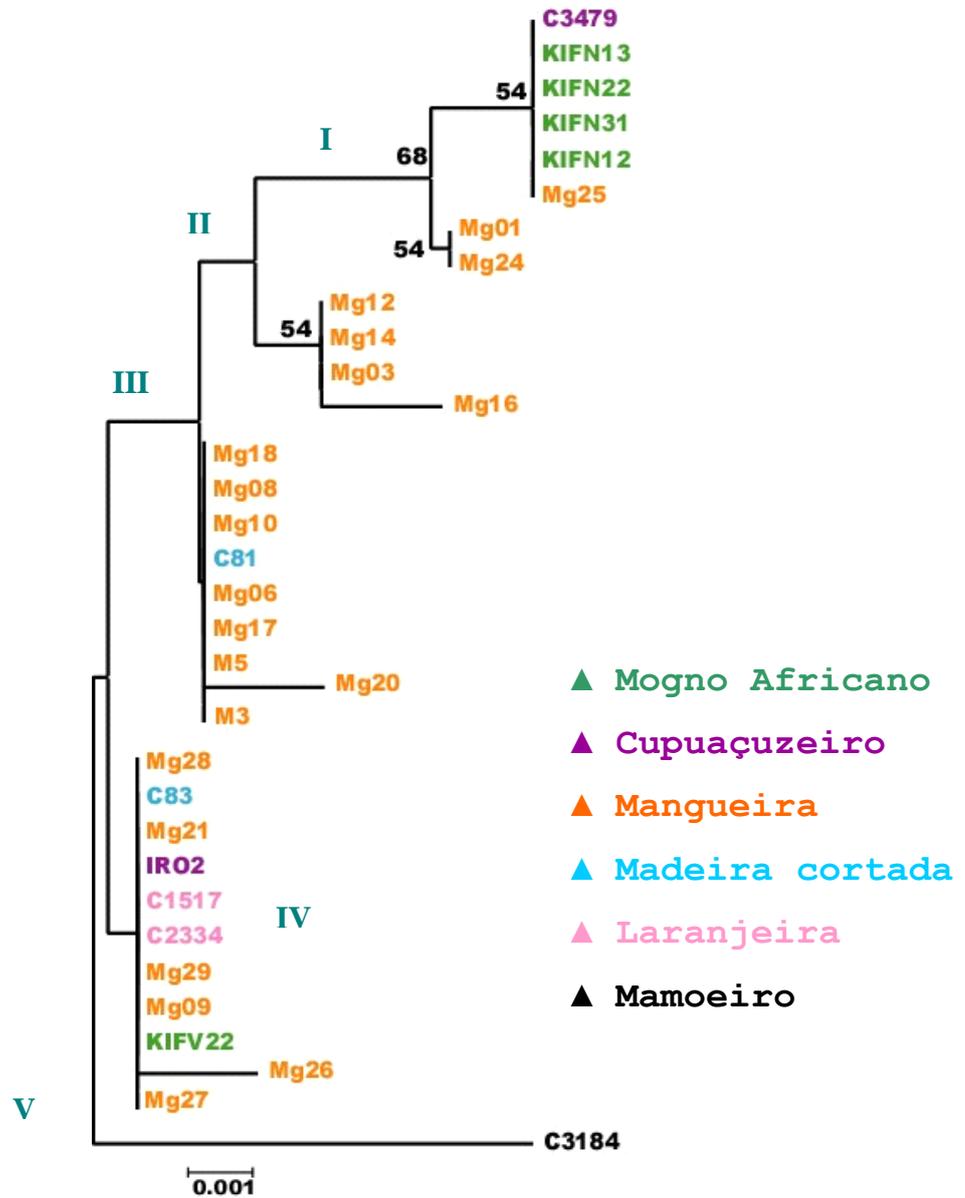


Figura 13 – Árvore filogenética da distância genética entre os trinta e três isolados de *Botryosphaeria rhodina* baseado nas sequências das regiões ITS. A árvore foi construída, utilizando o método de *neighbor-joining*/Programa Mega. Uma análise de *bootstrap* foi feita com 1000 repetições.

No cladograma obtido pela análise filogenética (figura 13), observa-se à formação de cinco grupos, muitos próximos.

No grupo I, ficaram os isolados C 3.4.7.9, Kifn 3.1, Kifn 1.3, Kifn 2.2, Kifn 1.2, Mg 25 e um subgrupo com as linhagens Mg 01 e Mg 24. No grupo II ficaram as linhagens Mg 03, Mg 12, Mg 14 e um subgrupo Mg 16. No grupo III, ficaram as linhagens Mg 06, Mg 08, Mg 17, Mg 18, Mg 10, M 03, M 05, C81, e um subgrupo com apenas uma linhagem (Mg 20). No grupo IV, ficaram as linhagens Mg 09, C 1517, C 83, Mg 27, Mg 29, C 2334, Mg 28, Kifv 2.2, Mg 21, IRO 02, e um subgrupo com uma linhagem (Ind 5.1). No grupo V ficou apenas uma única linhagem C 3.1.8.4.

A maior distância genética entre as 33 linhagens foi entre os isolados C 3. 4. 7. 9 e Mg 14 em torno de 1,6%.

Rosa et al., (2003), analisaram as seqüências das regiões ITS-5,8S rDNA dos isolados de *Phytophthora capsici*, obtidos de plantas de pimentão (*Capsicum annum*). Na análise da região ITS1, constatou-se que os 10 isolados de *P. capsici*, obtidos no Estado de São Paulo, apresentaram de 98,4% a 100% de similaridade genética com o isolado de *P. capsici* (gi/8927493), sendo que para 6 isolados a similaridade foi de 100%.

Garcia et al., (2004), identificaram o *Botryosphaeria* sp. (MAMB-5) descrito por BARBOSA et al., (1995), em nível de espécie, como *B. rhodina*, por meio de sequenciamento da região ITS1 - 5,8S rDNA - ITS2 do DNA ribossomal (rDNA).

Alves et al., (2005), sequenciaram regiões ITS do DNA ribossomal que vem sendo utilizados na identificação criteriosa de *Botryosphaeria*. A amplificação do fragmento do rDNA de aproximadamente 1200pb, incluindo as regiões ITS1, 5,8S e ITS2, gerou um total de 56 fragmentos de restrição, utilizando as enzimas *AluI*, *AsuI*, *HaeIII*, *MboI*, *NciI* e *TaqI*. Polimorfismo intraespecífico foi detectado apenas em *Botryosphaeria parva* e *Botryosphaeria dothidea*. Anamorfos de *Fusicoccum* foram divididos em *clusters* diferentes, sendo que o

primeiro corresponde aos isolados de *B. dothidea* e o outro corresponde às espécie *B. lútea*, *B. ribis* e *B. parva* com aproximadamente 90% de similaridade. Neste último agrupamento as espécies *B. lútea* e *B. ribis* formaram um sub-agrupamento com aproximadamente 94% de similaridade, diferenciadas pelas endonucleases *HaeIII* e *AsuI*. Já as espécies com anamorfos *Diplodia* formaram um *cluster* contendo os isolados de *B. stevensii* e *B. obtusa* (~ 82% de similaridade), que foram separados do *B. cortícola*. As duas espécies de anamorfos *Dothiorella* (*B. sarmentorum* e *B. ibérica*) tiveram 96% de similaridade, sendo separadas pela endonuclease *AsuI*. A última espécie que formou separadamente das demais espécies foi a *B. rhodina* (anamorfo *Lasiodiplodia theobromae*).

Magnani et al., (2005), relataram o uso de sequenciamento dos espaços internos transcritos (ITS1, 5,8S e ITS2) do DNA ribossomal (rDNA), para a identificação inter-específica de 108 isolados de *Aspergillus* spp, que contaminaram o interior de grãos de café, em 16 propriedades produtoras do norte do estado do Paraná. Os resultados detectaram a presença de espécies potencialmente ocratoxigênicas em 82% das regiões paranaenses analisadas, sendo dentre esta, *Aspergillus niger* a espécie mais frequentemente detectada, seguida por *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus carbonarius*.

Martins, (2005), avaliou a variabilidade genética e forma de interação dos isolados patogênicos e não patogênicos de *Fusarium* spp. obtidos de diferentes hospedeiros. Desta forma 83 isolados de *Fusarium* spp. foram avaliados por meio das técnicas de ARDRA, (Amplified Ribossomal DNA Restriction Analysis), sequenciamento do rDNA e RAPD. A análise por meio de ARDRA permitiu a distinção dos 83 isolados de *Fusarium* spp. em 19 haplótipos apresentando uma grande diversidade dentro de cada haplótipo, mas de forma geral os isolados patogênicos e não patogênicos de *Fusarium* spp não puderam ser discriminados. Nas análises de sequenciamento da região ITS do rDNA, foi observado que isolados de *Fusarium* se agruparam independentemente da espécie.

Rubini et al., (2005), estudou a diversidade da comunidade endofítica de cacau, avaliando o potencial dessa comunidade para o controle biológico de *Crinipellis pernicioso*, o agente causal da vassoura de bruxa e outros fitopatógenos e a interação endófito-patógeno e endófito-hospedeiro. A Diversidade genética foi avaliada por análise de rDNA (regiões ITS1, ITS2 e 5,8S) (ARDRA e sequenciamento). A análise de ARDRA gerou 64 haplótipos, os quais incluíram no mínimo, 16 espécies.

No presente estudo constatou-se que a região ITS1-5,8S rDNA –ITS2 apresenta-se como uma boa ferramenta para estudos filogenéticos e de taxonomia, como já indicado na literatura. As pequenas variações entre indivíduos de regiões distintas geograficamente e a boa discriminação entre espécies colocaram a análise de similaridade da sequência dessa região como importante método auxiliar da taxonomia de *B. rhodina*.

Não foi observada nenhuma correlação entre o hospedeiro do qual os isolados foram obtidos, a produção de jasmonatos e a similaridade genética dos isolados. Essa observação foi relatada por Zhou e Stanosz (2001), onde *B. rhodina* e *L. theobromae* foram agrupados no mesmo *cluster*, dentro da seção denominada *Brunnea*.

3.4 CONCLUSÃO

◆ A análise das sequências das regiões ITS1 – 5,8S rDNA gene – ITS2, demonstrou uma alta conservação entre as 33 linhagens de *Botryosphaeria rhodina*.

◆ Entre as 33 linhagens de *B. rhodina*, analisadas, foram encontrados nove haplótipos.

◆ A distância genética entre as 33 linhagens de *B. rhodina* variou entre 0 a 1,6%. A árvore filogenética formou 5 grupos muito próximos apresentando 4 subgrupos.

◆ A linhagem 3.1.8.4 (grupo V) foi a que teve maior distância genética em relação as linhagens do grupo I.

◆ As linhagens de *B. rhodina* não mostraram especificidade em relação a seus hospedeiros.

◆ Não houve correlação entre a produção de jasmonatos e a diversidade genética entre as linhagens de *Botryosphaeria rhodina*.

4. DIVERSIDADE GENÉTICA DETECTADA POR AFLP EM LINHAGENS DE *Botryosphaeria rhodina* PRODUTORAS DE JASMONATOS

RESUMO

A utilização de marcadores moleculares para caracterizar de modo rápido e seguro linhagens de fungos, produtoras de metabólitos secundários de interesse biotecnológico, é uma estratégia amplamente utilizada na pesquisa com microrganismos. Polimorfismos obtidos por meio da técnica de AFLP levam em consideração diferenças entre genótipos quanto à distribuição dos sítios de enzimas de restrição e a amplificação diferencial de fragmentos de DNA. Desse modo, tais análises permitem de modo preciso a detecção de variabilidade genética ao nível de DNA. Entre as vantagens do uso de marcadores AFLP, destacam-se o alto grau de polimorfismo que pode ser encontrado e o grande número de marcadores moleculares que podem ser detectados. Algumas espécies de *Botryosphaeria* são reconhecidas por sua capacidade de produzir jasmonatos utilizando diversas fontes de carboidratos. Nesta pesquisa, a diversidade genética de trinta e três linhagens de *Botryosphaeria rhodina* produtoras de jasmonatos, obtidas de hospedeiros tropicais brasileiros e duas linhagens de origem cubana foram analisadas por meio de marcadores moleculares AFLP. Para a obtenção dos resultados foram utilizadas quatro combinações de iniciadores nas reações AFLP, possibilitando a geração de 300 marcadores polimórficos. O número médio de bandas obtidas por iniciador foi de 79% e a porcentagem de bandas polimórficas foi de 95%. A distância genética entre as linhagens de *B. rhodina* foi de 29,19%, e a porcentagem de loci polimórfico foi de 0,95%. Todas as linhagens investigadas foram agrupadas em quatro grupos e foram obtidos indicadores de alta variabilidade genética entre todos os isolados.

Palavras Chaves: Marcadores AFLP; *B. rhodina*; *Jasmonatos*

GENETIC DIVERSITY OF ISOLATED OF BOTRYOSPHAERIA RHODINA PRODUCING OF JASMONATES

ABSTRACT

The filamentous fungus, especially the isolated ones of *Botryosphaeria*, represent a group with ample world-wide distribution, being able to cause fruitful and ornamental damages in diverse commercial wood, trees. Thirty and three Brazilian ancestries of *B. rhodina* and two Cuban ancestries had been evaluated how much to the production of jasmonates, after to have been cultivated in Half Miersch and how much to the molecular analysis. The extraction of the DNA was carried through according to Raeder and Broda. The amplification of the region conserved ITS of rDNA was carried through by means of the PCR technique, where oligonucleotídeos ITS1 (5' - TCC GTA GGT CCT GCG G -3') and ITS4 had been used (5' - TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3'). The product of the PCR was purified through the Kit of Purificação GFX (Amersham Bioscience). The fragments of ribosomal DNA PCR had been submitted to the reading in sequenciador "MegaBACE" 1000 - analysis DNA System (Amersham Biosciences - Pharmacia). The sequences of the ancestries had been submitted the comparison with the sequences previously deposited in the data base of the National Center will be Biotechnology Information (NCBI), with assist of computational tool BLAST. The criterion used for the identification was analysis of score gotten by the alignment of the sequence deposited in the data base and the gotten sequences of the thirty and three ancestries. The alignment of the sequences was carried through through the program Clustal W of the computational package BioEdit for the accomplishment of the alignment. The alignments had been converted into genetic distances for the method of Kimura two-parameters and the construction of the filogenética tree was made as job of the Neighbor-Joining method using itself the program Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA). In the distance genetic between the thirty and three ancestries it varied of 0 the 1,6%. The transição/transversão tax was of 1,2 and the ratio of bases was: 23,2% of adenine, 24,3% of timina, 24,1% of guanina and 28,3% of citosina. The alignments had been submitted still to Program TCS, resulting in the identification of nine haplótipos and 10 polimórficos small farms. The matrix of genetic distance as well as the construction of the filogenetic tree had shown little genetic divergence between the ancestries.

Word-key: *Botryosphaeria rhodina*, Jasmonatos, rDNA

4.1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos do gênero *Botryosphaeria* são ascomicetos, fitopatogênicos, com ampla distribuição mundial, causadores de doenças em diversas plantas de importância econômica (BARR, 1987).

Botryosphaeria rhodina possui grande capacidade para utilizar os carboidratos em altas concentrações de amido e sacarose como única fonte de carbono e energia crescendo rapidamente nessas condições. Usualmente, esse fungo é eficaz na penetração em tecidos vegetais colonizando frutos e diversas partes das plantas hospedeiras. Outra característica importante do gênero é a capacidade de produzir aromas como resultados de seu metabolismo secundário (WANDLAW, 1993).

No gênero *Botryosphaeria* encontramos linhagens saprófitas, parasitas e endofíticas (SMITH et al., 1996; DENMAN et al., 2000), porém a maior parte dos registros de literatura destacam sua atividade fitopatogênica (von Arx 1987).

A detecção e caracterização de microrganismos por meio de técnicas envolvendo marcadores moleculares, em especial DNA tem sido adequadas, específicas, sensíveis e relativamente rápidas. Tais técnicas usadas sozinhas ou em combinação com outras, são de grande utilidade na diagnose de doenças já que permitem detecção direta do agente causal (SALDANHA, 2007).

Marcadores moleculares revelam polimorfismos de DNA entre indivíduos geneticamente relacionado. Um loco molecular que apresenta segregação mendeliana é considerado um *marcador genético*. Por isso, os marcadores de DNA se prestam para estudos de genética de populações, mapeamento e análises de similaridade e distância genética (LOPES et al., 2003).

Marcadores moleculares de DNA têm sido utilizados com sucesso para identificar espécies de fungos ou linhagens intraespecíficas e formação de raças (METZEMBERG,

1991). As técnicas baseadas nestes marcadores representam diretamente a variação genética, não estando sujeitas às influências do ambiente, nem sofrendo variações em função do estágio de desenvolvimento do organismo ou do tipo de tecido utilizado (PUTERKA, 1993).

As técnicas que se baseiam em biologia molecular, especialmente a reação de polimerização em cadeia (PCR) vem causando enorme impacto na Ciência, sendo um dos métodos de maior aplicação nas diferentes áreas da medicina e da agricultura.

Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado (AFLP) é uma técnica desenvolvida recentemente, com a finalidade da obtenção de um grande número de marcadores moleculares distribuídos em genomas de procariotos e eucariotos. O ensaio de AFLP combina a especificidade, resolução e poder de amostragem da digestão com enzimas de restrição com a velocidade e praticidade de detecção dos polimorfismos via PCR (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

A técnica de AFLP tem por base a seletiva amplificação por PCR de fragmentos de restrição após digestão total de DNA genômico. A técnica envolve 3 etapas: (i) restrição do DNA e ligação de oligonucleotídeos adaptadores, (ii) amplificação seletiva dos grupos de fragmentos de restrição, e (iii) análise em gel de fragmentos amplificados (VOS et al., 1995).

Marcadores AFLP, são caracterizados pela capacidade de: a) analisar simultaneamente varias regiões diferentes do genoma (MUELLER & WOLFENBARGER, 1999); b) sua alta reprodutibilidade (BLEARS et al., 1998);

Jones et al., (1997) ensaiaram a repetibilidade do marcador AFLP em oito laboratórios diferentes e detectaram diferença de apenas uma banda AFLP em um total de 172 bandas analisadas.

A técnica apresenta maior repetibilidade e confiabilidade que as técnicas RFLP e RAPD, nas quais se baseia. A obtenção dos marcadores AFLP não depende de hibridização e digestão parcial, que geram a não-reprodutibilidade do RFLP. Além disso, a possibilidade de

se empregarem condições mais estritas para o anelamento dos primers nas reações de PCR resulta em maior repetibilidade e robustez do AFLP quando comparado com RAPD (SAVELKOUL et al., 1999).

Objetivou-se, com este trabalho, determinar a distância genética entre trinta e três linhagens de *Botryosphaeria rhodina* produtoras de jasmonatos, provenientes de diferentes hospedeiros e locais de coleta, utilizando a técnica de polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP).

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material Biológico

As linhagens de *Botryosphaeria rhodina*, isoladas de diferentes hospedeiros vegetais dentre eles: *Carica papaya* (Mamão), *Theobroma grandiflorum* (Cupuaçu), *Swietenia macrophylla* (Mogno), *Citrus australis* (laranja) e *Mangifera indica* (manga) e de diversas localidades geográficas (Manaus, Ilhéus, Recife e Cuba), foram utilizadas para a determinação da variabilidade genética utilizando-se a técnica de polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP).

4.2.2 Extração de Ácidos Nucléicos

Os isolados patogênicos de *Botryosphaeria rhodina* foram crescidos em meio Batata-Dextrose – BD (2%), q.s.p. 100 mL de caldo de batata) durante 5 dias, em cultura estática e submersa, em estufa BOD a 28°C. Após esse período, o micélio foi separado do meio de cultura por filtração. A massa micelial foi triturada em nitrogênio líquido e o pó obtido, foi transferido para microtubos de 2 mL. Em seguida foi feita a extração de DNA por meio do protocolo descrito por Raeder & Broda (1985).

A concentração de DNA foi estimada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%, juntamente com um marcador conhecido (High DNA Mass Ladder – Invitrogen). Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio, e observado sobre transiluminador de ultravioleta e fotodocumentador.

4.2.3 Análise de Polimorfismo por meio de Marcadores Moleculares AFLP

Para amplificação do marcador AFLP utilizou-se o protocolo de VOS et al., (1995) adaptado por LOPES (2003). A combinação das enzimas *EcoRI/MseI* foi empregada na digestão do DNA genômico. As reações de digestão foram realizadas utilizando 200 ng de

DNA genômico, 5,0 uL do tampão “*One Phor All*” (OP Amersham), albumina de soro bovino (BSA) (10 ug/uL), 0,5 uL da enzima *MseI* (10 unidades/uL, New England Biolabs) e 0,5 uL da enzima *EcoRI* (10 unidades/uL, (GIBCO) em volume final completado para 50 uL com água ultrapura autoclavada. As reações foram realizadas a 37°C durante 3 horas sendo cuidadosamente agitadas a intervalos de uma hora. Após a digestão, as enzimas foram inativadas a 7°C durante 15 minutos.

Os adaptadores foram preparados em quantidade suficiente para ligações de 120 amostras. Para o preparo do adaptador *EcoRI* foram utilizados 3,4 µL (1µg/µL) de adaptador “*EcoRI* oligo” (5’CTCGTAGACTGCGTACC3’), 3,0 µL (1 µg/µL) de adaptador “*EcoRI* oligo 2” (5’ATTTGGTACGCAGTCTAC 3’), 6,0 µL do tampão OPA 10X (“*One Phor All*”, Amersham) e 107,6 µL de água ultrapura. No preparo do adaptador *MseI* foram utilizados 32,0 µL (1,0 µg/ µL) de adaptador “*MseI* oligo1” (5’GACGATGAGTCCTGAG 3’), 28,0 µL (1,0 µg/ µL) de adaptador “*MseI* oligo2” (5’TACTCAGGACTCAT 3’), 7,0 µL do tampão OPA (“*One Phor All*”, Amersham) e 53,0 µL de água ultrapura.

Os adaptadores foram ligados aos fragmentos de DNA em uma reação contendo 2,0 µL de tampão da enzima *T4* DNA Ligase (3 U/MI) (Invitrogen), 1,0 µL dos adaptadores da enzima *EcoRI*, 1,0 µL do adaptador da enzima *MseI*, 1,0 µL de *T4* DNA ligase (1 unidade/µL, Invitrogen), 5,0 µL de água ultrapura autoclavada e 40 µL da reação de digestão descrita acima. As reações de ligação foram realizadas a 20°C durante 3 horas, sendo cuidadosamente agitadas a intervalos de uma hora. As amostras foram armazenadas a -20° C.

Os fragmentos de DNA foram amplificados em duas reações. Na primeira, denominada de pré-amplificação, foram utilizados os oligonucleotídeos E+A e M+C, ao passo que na segunda, denominada de amplificação seletiva, foram utilizados oligonucleotídeos *EcoRI* com dois nucleotídeos adicionais em seu terminal 3` (E+AG, E+AT,

E+AA e E+AC) em combinação com os oligonucleotídeos M+C (Tabela 1). Ambas as reações foram efetuadas em termociclador Mastercycler Gradient (*Eppendorf*).

Tabela 09 - Combinação de oligonucleotídeos (Gibco BRL) utilizados no estudo sobre variabilidade de linhagens de *Botryosphaeria rhodina* produtoras de jasmonatos.

Pré Amplificação	Combinação dos Oligonucleotídeos	
	<u><i>EcoRI</i></u>	<u><i>MseI</i></u>
E+A/M+C	E+AG	M+C
E+A/M+C	E+AT	M+C
E+T/M+C	E+TA	M+C
E+T/M+C	E+TC	M+C

As reações de pré-amplificação foram compostas por 3,0 µL da amostra de DNA digerido e ligado aos adaptadores conforme descrito acima, 0,5 µL dos oligonucleotídeos da enzima de corte raro (E+A) 50 ng/ µL dos oligonucleotídeos da enzima de corte frequente (M+C) 50 ng/ µL, 4,0 µL de dNTP 2,5 mM (Gibco), 2,0 µL do tampão “Mg Free Buffer” 10X (Promega), 1,2 µL MgCl₂ 25 mM, 0,6 µL de Taq DNA polimerase (5,0 unidades/ µL) e 8,2 µL de água ultrapura autoclavada. O programa de pré-amplificação foi composto de 26 ciclos de amplificação após desnaturação inicial a 94°C por 2 min. Cada ciclo foi constituído de 1 min a 94°C (desnaturação), 1 min a 56°C (hibridização) e 1 min a 72°C (extensão). O ciclo final foi seguido de 5 min a 72°C. Os produtos da pré-amplificação foram diluídos acrescentando 80µL de água ultrapura autoclavada e armazenados a -20°C.

As sequências dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação seletiva foram (E+AN e M+C). Nas reações de amplificação foram utilizados 1,5 µL do produto da pré-amplificação diluído, 0,5 µL dos oligonucleotídeos das enzimas de corte raro (E+NA) (50 ng/µL), 0,6 µL dos oligonucleotídeos M+C (50 ng/ µL), 1,6 µL de dNTP 2,5 mM (Gibco), 2,0 µL do tampão da Taq polimerase 10X (Promega), 1,2 µL de MgCl₂ 25 mM, 0,32 µL de Taq

polimerase (5U/ μ L, Promega) e 12,28 μ L de água ultrapura autoclavada. O programa de amplificação seletiva foi de desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos, 12 ciclos compostos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C (-7°C/Ciclo) e 1 min a 72°C seguidos de 23 ciclos compostos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C e 1 minuto a 72°C. O ciclo final de extensão foi seguido de 2 min a 72°C.

Após a amplificação seletiva, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida [acrilamida/bisacrilamida (19:1) 6%, uréia 7,5 M, tampão 1X TEB] DE 0,5 mm de espessura. Foi utilizado o sistema eletroforético “Sequi-Gen GT” (Biorad) de 38 x 50 cm.

Às amostras foram adicionadas de 10 μ L de tampão formamida (formamida 98%, EDTA, 10 mM pH 8,0, azul de bromofenol 0,002% (p/v) e xileno cianol 0,002% p/v) e desnaturadas a 95°C por 5 minutos. O gel foi submetido a uma eletroforese inicial (“pré-corrida”) sob potência constante de 80 W por uma hora. Na parte superior da cuba foi utilizado TEB 1X e, na parte inferior, TEB 1X/acetato de sódio 0,375M. Os produtos das amplificações foram carreados por 2 horas e 45 minutos.

Para revelação dos géis foi utilizado o método de coloração com nitrato de prata (CHALHOUB et al., 1997), seguindo o protocolo proposto por CRESTE et al., (2001). As imagens foram capturadas utilizando um “*scanner*” HP.Deskjet F 380 All-in-One.

4.2.4 Análise de Similaridade Genética por Meio de AFLPs

Para a análise dos dados, foram consideradas a presença e ausência de fragmentos de AFLP, os quais foram transferidos para uma matriz onde a ausência de uma dada banda foi denominada por 0 e a presença por 1.

A quantidade de polimorfismo expressa em termos numéricos pelo número de locos polimórficos é uma medida de variação que depende do tamanho da amostra, pois se

baseia na frequência alélica. Um loco é considerado polimórfico, quando a frequência do seu alelo mais comum é menor ou igual a 0,99 (MORTON et al., 1966). Outro critério estabelece que a frequência do alelo mais frequente não seja superior a 0,95% (AYALA, 1982).

Para a análise do Polimorfismo, foi utilizado esse critério, onde o polimorfismo é usado em termos de proporção média de locos polimórficos por população (%), e é dada por:

$$P = \frac{\text{n. de locos polimórficos}}{\text{n. total de locos}}$$

Neste trabalho foi utilizado o *Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs* (NTSYS-PC 2.10) ROHLF (2000) desenvolvido para auxiliar pesquisas em taxonomia numérica. A consistência das ramificações do dendrograma foi verificada por meio da técnica de amostragem repetitiva de dados (*Bootstrapping*) para análise hierárquica, o programa dispõe de oito métodos, 16 coeficientes de similaridade para atributos qualitativos e nove para atributos quantitativos (FUNGARO, 1994).

A similaridade entre os genótipos analisados foi calculada com o Coeficiente de Jaccard (JAIN e SINGH, 1979). Os isolados foram agrupados usando a análise de agrupamento UPGMA (Unweighted pair -group method with arithmetical a average) (RHOLF, 2000).

O bootstrap (FELSENSTEIN,1985), com 1000 repetições foi elaborado no programa Free Tree (PAVLICEK et al., 1999).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.3.1. Análise de Marcadores AFLP

Quatro combinações de oligonucleótidos: *EcoRI+AG/MseI+C*, *EcoRI+AT/MseI+C*, *EcoRI+TA/MseI+C*, *EcoRI+TC/MseI+C* foram analisadas em trinta e três linhagens de *B. rhodina* isoladas de hospedeiros tropicais e produtoras de jasmonatos.

O número total de bandas observadas variou de 56 (E+TA/ M+C) a 89 (E+TC/M+C), com uma média de 79 bandas por combinação de oligonucleótidos. Das 315 bandas analisadas 300 (95%) revelaram polimorfismo e foram utilizadas como marcadores para análise da diversidade genética dessas linhagens.

As combinações de oligonucleótidos AFLP que apresentaram maior número de bandas polimórficas foram E+AT/M+C (98%), seguida da combinação E+TC/M+C (95%). A menor porcentagem de bandas polimórficas foi obtida com a combinação E+TA/M+C (93%) (Tabela 10).

Tabela 10 - Combinações de Iniciadores nas reações AFLP e respectivos números médios de bandas, a porcentagem de bandas polimórficas das Linhagens de *B. rhodina*.

Combinação de Iniciadores	Número Total de Bandas	Bandas Polimórficas	
		Quantidade	%
EAGC + MC	83	78	94%
EATC + MC	87	85	98%
ETAC + MC	56	52	93%
ETCC + MC	89	85	95%
Total	315	300	----
Médias	79	75	95%

Polimorfismo = 0,95% (número de loco polimórfico / número total de locos.
A frequência do alelo mais frequente não ultrapassa 0,95%.

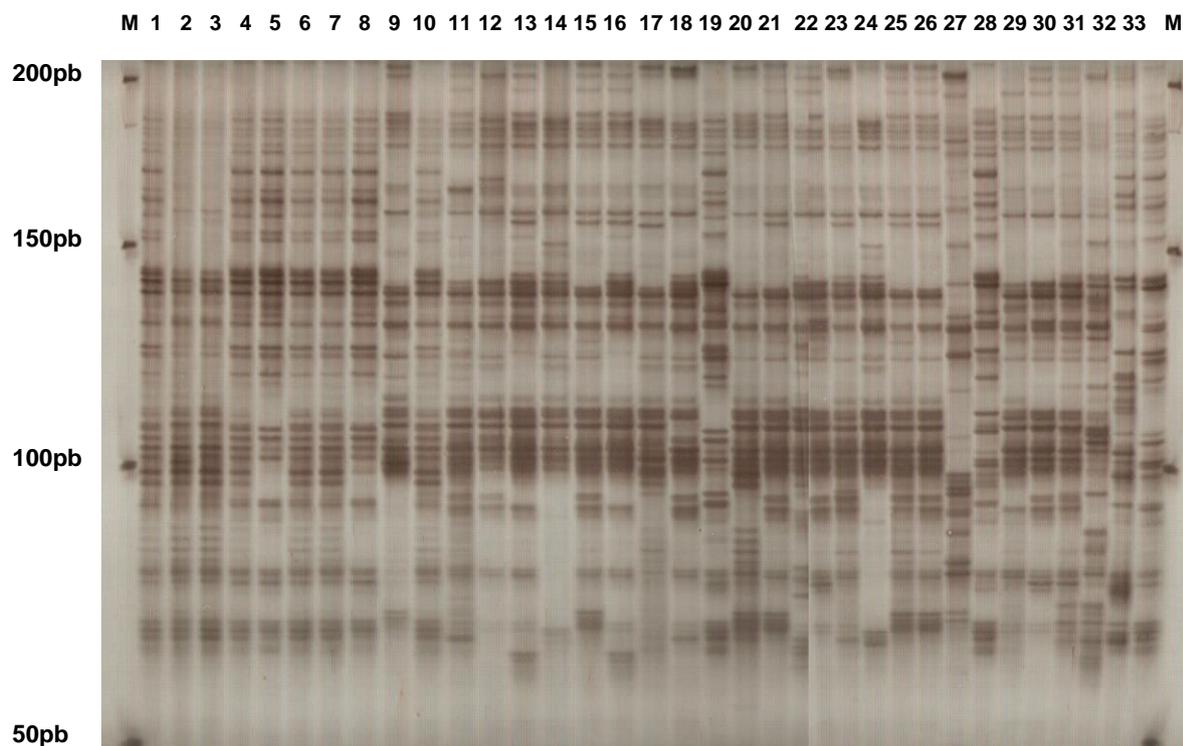


Figura 14 – Padrão de DNA genômico de *B. rhodina* amplificado pela técnica de AFLP, utilizando-se duas combinações de primers (EcoR1+AT/MseI+C). M = Marcador de peso molecular (50pb); Linhagens = 1 -33.

4.3.2. Variabilidade Genética das Linhagens de *B. rhodina*

Nas trinta e três linhagens analisadas por marcadores AFLP, foi encontrado coeficientes de similaridades de 45,30% a 97,90% com a média de 70,81%, conforme a matriz de similaridade (Tabela 11).

A distância genética média (1- coeficiente de similaridade) foi de 29,19% entre as linhagens de *B. rhodina*. Os menores índices de distanciamento genético são mostrados na tabela 12

Dentre as trinta e três linhagens analisadas por meio da formação do dendrograma obtido pelo programa NTSYS, observou-se que o maior índice de distanciamento genético ocorreu entre as linhagens Mg 03 e Mg 14 de 54,7%. As linhagens Mg 03 e Mg 14 são da

mesma procedência, característica micelial (coloração), e produção de jasmonatos distintas. A linhagem Mg 03 foi melhor produtora de jasmonatos do que a linhagem Mg 14.

Diversidade Genética de isolados de Botryosphaeria rhodina produtores de jasmonatos

Tabela 11 – Matriz de similaridade genética entre 33 linhagens de *B. rhodina*, obtidos de diferentes hospedeiros tropicais, comparações par par utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard.

	Mg01	Mg03	Mg06	Mg08	Mg09	Mg10	Mg12	Mg14	Mg16	Mg17	Mg18	Mg20	Mg21	Mg22	Mg23	C81	C1517	C2334	IRO2	Mg27	Mg28	Mg29	Mg25	Mg26	Mg24	Kifn13	C83	Kifn31	Kifv22	C3479	Kifn12	Kifn22			
Mg01																																			
Mg03	0,722																																		
Mg06	0,600	0,595																																	
Mg08	0,623	0,566	0,694																																
Mg09	0,618	0,536	0,677	0,939																															
Mg10	0,588	0,559	0,665	0,837	0,860																														
Mg12	0,714	0,671	0,600	0,626	0,622	0,605																													
Mg14	0,481	0,453	0,525	0,520	0,524	0,509	0,527																												
Mg16	0,582	0,589	0,634	0,783	0,799	0,794	0,605	0,511																											
Mg17	0,595	0,597	0,642	0,775	0,791	0,786	0,606	0,522	0,977																										
Mg18	0,609	0,569	0,680	0,771	0,781	0,765	0,613	0,517	0,805	0,808																									
Mg20	0,605	0,578	0,681	0,802	0,802	0,775	0,630	0,549	0,847	0,844	0,841																								
Mg21	0,622	0,559	0,645	0,871	0,895	0,808	0,626	0,531	0,854	0,845	0,824	0,832																							
Mg22	0,611	0,618	0,657	0,743	0,742	0,743	0,640	0,560	0,808	0,811	0,769	0,777	0,794																						
Mg23	0,602	0,573	0,630	0,773	0,795	0,790	0,601	0,526	0,938	0,939	0,778	0,827	0,851	0,811																					
C81	0,585	0,562	0,656	0,748	0,763	0,770	0,609	0,580	0,799	0,803	0,852	0,791	0,796	0,781	0,807																				
C1517	0,714	0,654	0,600	0,654	0,656	0,616	0,795	0,501	0,571	0,578	0,596	0,625	0,643	0,635	0,584	0,568																			
C2334	0,631	0,599	0,679	0,784	0,783	0,772	0,629	0,547	0,811	0,814	0,849	0,861	0,813	0,780	0,802	0,812	0,634																		
IRO2	0,543	0,531	0,649	0,762	0,772	0,743	0,596	0,559	0,813	0,817	0,842	0,827	0,780	0,772	0,798	0,855	0,584	0,853																	
Mg27	0,609	0,575	0,649	0,794	0,799	0,806	0,619	0,563	0,857	0,854	0,822	0,829	0,836	0,808	0,836	0,823	0,608	0,866	0,848																
Mg28	0,585	0,563	0,654	0,791	0,813	0,791	0,595	0,550	0,923	0,929	0,790	0,814	0,843	0,820	0,919	0,802	0,590	0,823	0,833	0,869															
Mg29	0,596	0,563	0,714	0,751	0,755	0,750	0,606	0,550	0,773	0,776	0,921	0,798	0,775	0,772	0,769	0,855	0,601	0,840	0,821	0,818	0,787														
Mg25	0,595	0,555	0,659	0,793	0,792	0,781	0,600	0,546	0,833	0,830	0,832	0,834	0,817	0,785	0,824	0,828	0,577	0,832	0,818	0,925	0,846	0,846													
Mg26	0,581	0,564	0,638	0,788	0,781	0,764	0,608	0,532	0,815	0,818	0,838	0,861	0,811	0,795	0,818	0,816	0,608	0,864	0,835	0,832	0,834	0,834	0,837												
Mg24	0,609	0,582	0,678	0,807	0,813	0,809	0,612	0,550	0,874	0,875	0,806	0,829	0,836	0,813	0,871	0,780	0,617	0,827	0,809	0,839	0,900	0,808	0,839	0,854											
Kifn13	0,730	0,666	0,620	0,687	0,679	0,668	0,761	0,550	0,635	0,640	0,675	0,679	0,677	0,656	0,648	0,689	0,793	0,683	0,636	0,664	0,645	0,667	0,634	0,674	0,649										
C83	0,640	0,589	0,652	0,750	0,754	0,737	0,632	0,580	0,736	0,758	0,731	0,775	0,751	0,732	0,768	0,836	0,621	0,750	0,756	0,783	0,757	0,763	0,787	0,799	0,758	0,736									
Kifn31	0,743	0,668	0,604	0,662	0,653	0,636	0,768	0,545	0,603	0,609	0,643	0,649	0,651	0,616	0,621	0,646	0,821	0,658	0,599	0,643	0,609	0,653	0,625	0,633	0,619	0,945	0,695								
Kifv22	0,728	0,665	0,612	0,675	0,666	0,655	0,780	0,536	0,611	0,616	0,657	0,656	0,658	0,639	0,629	0,665	0,817	0,665	0,618	0,651	0,627	0,660	0,627	0,651	0,632	0,966	0,702	0,974							
C3479	0,731	0,677	0,607	0,671	0,656	0,651	0,788	0,523	0,612	0,617	0,647	0,658	0,654	0,640	0,625	0,649	0,815	0,656	0,608	0,636	0,607	0,640	0,612	0,636	0,628	0,950	0,687	0,958	0,979						
Kifn12	0,725	0,678	0,608	0,655	0,640	0,640	0,777	0,531	0,601	0,607	0,636	0,647	0,638	0,620	0,614	0,633	0,819	0,651	0,597	0,636	0,602	0,640	0,623	0,631	0,628	0,932	0,676	0,966	0,961	0,976					
Kifn22	0,721	0,657	0,605	0,695	0,681	0,670	0,767	0,547	0,642	0,642	0,671	0,681	0,684	0,653	0,655	0,669	0,815	0,679	0,633	0,677	0,642	0,664	0,653	0,671	0,661	0,932	0,678	0,940	0,951	0,940	0,938				
C3184	0,633	0,588	0,645	0,736	0,734	0,700	0,630	0,521	0,763	0,772	0,718	0,771	0,748	0,714	0,759	0,733	0,647	0,736	0,707	0,740	0,777	0,732	0,762	0,756	0,793	0,733	0,792	0,708	0,715	0,723	0,717	0,681			

Tabela 12 – Menores índices de distanciamento genético entre as linhagens de *B. rhodina*.

Linhagens	Menores Índices de Distanciamento Genético
Mg 16 e Mg 17	2,3% de distância genética
Kifn 1.2 e C 3479	2,4% de distância genética
Mg 27 e Mg 25	7,5% de distância genética
Mg 18 e Mg 29	7,9% de distância genética
C 81 e IRO 2	14,4% de distância genética
C 83 e C 3184	20,8 % de distância genética
Kifv 2.2 e C 3479	33,5% de distância genética

Distância genética = 1 – Coeficiente de Similaridade

Analisando a figura 15, observamos a formação de 4 grupos distintos. O primeiro grupo denominado de Grupo I, inclui as linhagens: Manga/Manaus (Mg 01, Mg 12); Mogno Africano/Ilheus (Kifn 1.3, Kifn 3.1, Kifv 2.2, Kifn 1.2, Kifn 2.2); Cupuaçu/Recife (C 3.4.7.9); Laranja/Cuba (C 1517) com 57% de similaridade genética. O segundo grupo denominado de Grupo II, inclui as linhagens: Manga/Manaus (Mg 08, Mg 09, Mg 21, Mg 10) com 73% de similaridade genética, sendo este grupo o mais próximo. O terceiro grupo denominado de Grupo III, inclui as linhagens: Manga/Manaus (Mg 16, Mg 17, Mg 23, Mg 28, Mg 24, Mg 27, Mg 25, Mg 20, Mg 26, Mg 18, Mg 29, Mg 22); LaranjaCuba (C 2334); Madeira Cortada/Manaus (C 81); Cupuaçu/Manaus (IRO 02) com 69% de similaridade genética. O quarto grupo denominado de Grupo IV inclui as linhagens: Madeira Cortada/Manaus (C 83); Mamão/Recife (C 3.184) com 66% de similaridade genética.

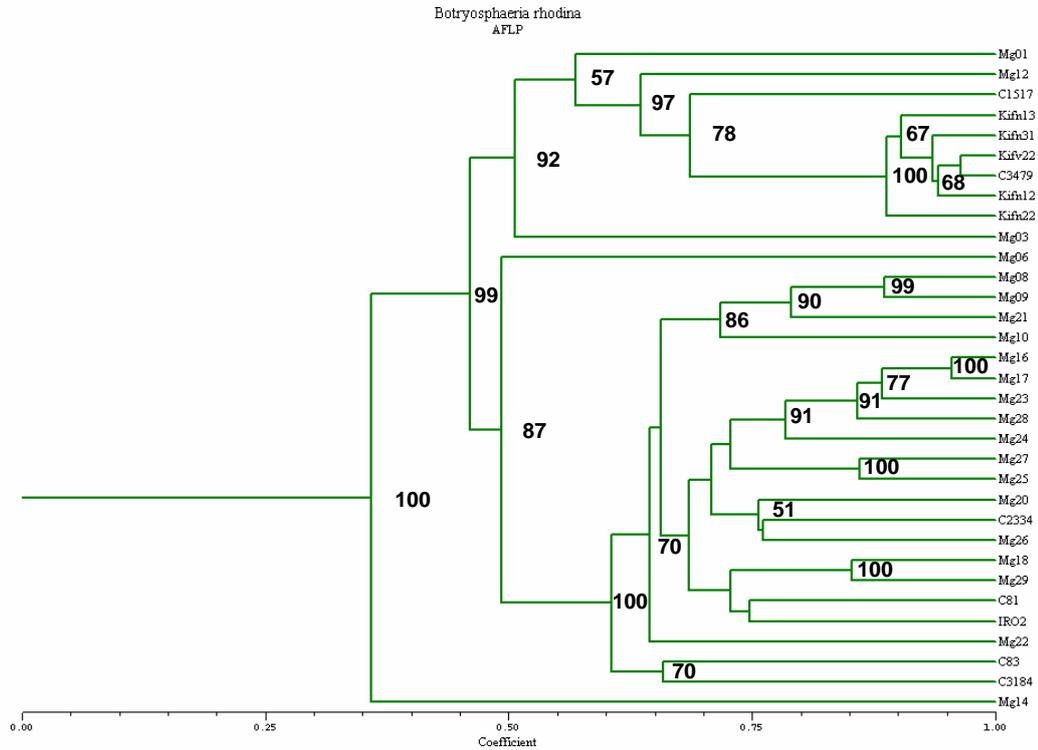


Figura 15 – Dendrograma de similaridade genética entre linhagens de *B. rhodina* baseado em análise de agrupamento UPGMA usando coeficientes de similaridade de Jaccard para o perfil obtido por meio dos primers de AFLP EcoRI+AG/MseI+C, EcoRI+AT/MseI+C EcoRI+TA/MseI+C e EcoRI+TC/MseI+C, com bootstrap de 1000 repetições.

Comparando-se a produção da AJ e seus derivados das 33 linhagens estudadas com relação ao perfil genético por meio de AFLP observou-se que as linhagens do Grupo I foram os melhores produtores de AJ, variando de 20 a 400 mg/L. As linhagens dos Grupos II, III e IV produziram entre 0 a 90mg/L com exceção da linhagem de Laranja/Cuba C 2334 com 450 mg/L, sendo a maior produtora de AJ dentre as todas as linhagens testadas.

Analisando as linhagens em relação a seus hospedeiros/procedência e a similaridade genética, verificamos que não foi observada nenhuma correlação, com exceção das linhagens de Mogno Africano/Ilhéus, que se agruparam no Grupo I (melhores produtoras de AJ).

Zhou e Stanouz (2001), descreveram que o gênero *Botryosphaeria* não apresenta nenhuma correlação entre seus hospedeiro e a similaridade genética.

De maneira geral foi possível verificar que poucas linhagens de *B. rhodina* comportaram-se igualmente, quando crescidas em meio Malte-Agar e Miersch. As linhagens estudadas apresentaram características distintas principalmente quando submetidas à temperatura, umidade e estress.

A caracterização morfológica é tradicionalmente empregada para a identificação de fungos fitopatogênicos, e envolve análise de pigmentação das colônias, textura, forma marginal e velocidade de crescimento micelial, processo de formação, forma e tamanho de esporos (BURGESS et al., 1995), além de patogenicidade (VALIM-LABRES et al., 1997). Entretanto, essa caracterização, embora útil, é bastante limitada por causa do baixo número de caracteres passíveis de serem analisados (FUNGARO, 2000), da alta instabilidade e dependência da composição do meio utilizado, das condições de incubação e das variações intrínsecas ao patógeno.

Diante destas considerações, as técnicas moleculares de detecção de microrganismos, principalmente aquelas envolvendo a tecnologia de DNA, têm-se

apresentado muito mais específicas, sensíveis e extremamente rápidas. Atualmente, essas técnicas têm sido usadas sozinhas ou em combinação com outras, proporcionando grande utilidade na diagnose de doenças por meio de detecção direta do agente causal.

A delimitação de espécies de *Colletotrichum*, segundo Sutton (1980), é baseada em métodos tradicionais, como tamanho e forma de conídios, características das colônias, presença de escleródios, morfologia do apressório e especificidade do hospedeiro. Em trabalhos posteriores, Sutton (1992) ressalta que nenhum progresso nas relações genéticas, para a identificação de fungos fitopatogênicos, tem sido alcançado, baseando-se somente em caracteres morfológicos. Dessa forma a análise molecular do genoma desses microrganismos é pertinente, uma vez que algumas características podem ser dependentes de fatores como meio de cultura, conforme sugerido por TeBeest et al., (1989).

Peres, et al., 2003 estudaram a variabilidade morfocultural e genética de fungos associados à podridão peduncular do mamão (*Carica papaya* L.). A variabilidade genética foi verificada por meio de análises de AFLP, de oito isolados de cada uma das três espécies mais incidentes (*Colletotrichum gloesporioides*, *Phoma caricae-papayae* e *Fusarium solani*). A análise de AFLP gerou um total de 339 bandas polimórficas, indicando uma alta variabilidade genética entre os isolados de cada espécie fúngica, com alguns desses microrganismos formando grupos divergentes dos demais. Não foi encontrada correlação entre características morfológicas e análises de AFLP.

Neste trabalho por meio de marcadores moleculares do tipo AFLP as linhagens de *B. rhodina* apresentaram uma alta variabilidade genética. A comparação dos dados obtidos por AFLP com aqueles obtidos da análise da região ITS (Cap. 2), demonstra que todas essas linhagens possuem uma base genética comum, apresentando pouca variação em regiões conservadas no genoma, em detrimento da alta variabilidade em regiões teoricamente não conservadas no genoma.

Schmidt, et al., 2004, aplicaram a técnica de AFLP para comparar 100 isolados de três espécies de *Fusarium* (*F. poae*, *F. sporotrichioides* e *F. langsethiae*). A comparação entre essas espécies revelou vários marcadores específicos para cada grupo de isolados. As análises dos clusters mostraram uma separação de *F. poae* de *F. sporotrichioides* e *F. langsethiae*. Isolados de *F. langsethiae* formaram um grupo bastante homogêneo separando do grupo de *F. sporotrichioides*.

As linhagens de *B. rhodina* isoladas de Mogno africano/Ilhéus, formaram um grupo homogêneo quando analisadas por meio marcadores AFLP e pela região ITS, formando um grupo constituído pela sua grande maioria dessas linhagens.

A técnica de marcadores AFLP vem sendo utilizada com sucesso para analisar o genoma de várias espécies de fungos, entre as quais *Cyphomyrmex minutus*, um fungo micorrizico; *Fusarium*, spp.; *Phytophthora infestans*; fungos de relevância médica como *Aspergillus fumigatus* e *Cândida* spp. (SAVELKOUL et al., 1999) *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (SILVA-MANN et al., 2002).

Reyes-Franco et al., 2006, analisaram a variabilidade genética e patogênica de 96 isolados de *Macrophomina phaseolina* do México e de outros países. A análise de agrupamentos mostrou dois grupos contrastantes de isolados separando os patogênicos dos não patogênicos. No primeiro grupo ficaram incluídos os isolados mais agressivos tanto do México como da Colômbia. A análise de AFLP produziram 418 produtos amplificados e 92% foram polimórficos. A análise de agrupamento mostrou uma clara associação entre genótipos de AFLP e origem geográfica. Isolados do México mostraram-se diferenciados dos isolados de outros países.

As duas linhagens de *B. rhodina* isoladas de Laranja provenientes de Cuba, e grandes produtoras de jasmonatos, quando analisadas por meio de AFLP, apresentaram uma similaridade genética de 63,4%. A análise de agrupamento mostrou uma separação entre as

duas linhagens. A linhagem C1517, se agrupou com o Grupo I e C 2334, se agrupou com o Grupo II.

Devi, et al., 2007, estudaram a correlação de polimorfismo e recombinação do fungo entomopatogênico *Nomuraea rileyi*. A diversidade genética em amostras de uma população de epizoótica do sul da Índia foram estudadas por AFLP. Os dados de AFLP foram á submetidos para análise de variância (AMOVA) e análise dos agrupamentos revelando grande variação genética na população inclusive entre isolados de um único inseto.

4.4 CONCLUSÃO

♦ A análise genética das trinta e três linhagens de *B. rhodina* geradas por marcadores AFLP mostrou a formação de quatro grupos distintos.

♦ Do ponto de vista genético, as maiores produtoras de jasmonatos brasileiras estão geneticamente mais próximas de uma linhagem cubana mais produtora de jasmonatos, pois as linhagens brasileiras que produziram mais jasmonatos foram: Mg 03 (isolada de Manga e Kifn 3.1 (Grupo I isolada de mogno) estão muito próximas da Linhagem C 1517 cubana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDRIDGE, D. C. ; GALT, S. ; GILES, D. ; TURNER, W. B. Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. **Journal. Chem. Soc. Chem. Commun.** 1623-1625p, 1971.
- ALFENAS, A. C. Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos. 2ª edição. Viçosa Ed. UFV, 627p, il.; 2006.
- ALTSCHUL, S. F. ; GISH, W. ; MILLER, W. ; MYERS, E. W. ; LIPMAN, D. L. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology.** London, v. 215, n. 3, p. 403-410, Oct. 1990.
- ALTSCHUL, S. F. ; MADDEN, T. L. ; SCHÄFFER, A. A. ; ZHANG, J. ; ZHANG, Z. ; MILLER, W. & LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research.**, n 25, p. 3389-3402, 1997.
- ALTUNA, B. ; ENG., F. ; ALMEIDA, G. ; KILIBANSKY, M. ; GONZÁLEZ, L.; SÁENZ, T. Manual dos Derivados da Cana-de-açúcar: diversificação, matérias-primas, derivados do bagaço, derivados do melaço, outros derivados, resíduos , energia, **ICIDCA**, p. 367-370, 1999.
- ALTUNA, B. ; MICHELENA, G. ; ENG., F; ALMEIDA, G. ; KILIBANSKY, G. Otención de Ácido Jasmônico a partir de *Bhotryodiplodia theobromae* por cultivo submergido. Efecto en la Agricultura. **Anales Científicos de la XX RELAR.** 269p. 2000.
- ALVES, A.; PHILLIPS, A. J. L.; HENRIQUES, I.; CORREIA, A. Evaluation of amplifiel ribosomal DNA restriction analysis as a method for the identification of *Botryosphaeria* species, **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 245, n. 2, p 221-229, Apr. 2005.
- ANDERSON, J. B. ; STASOVSKI, E. Molecular phylogeny of Northern hemisphere *Armillaria* species. **Mycologia.** 84:505-516. 1992.
- APEL, D. M. ; GORDON, T. R. Intraspecific variation within populations of *Fusarium oxysporum* base don RFLP analysis of the intergenic spacer region of the r DNA. Experimental. **Mycology**, v. 19, p. 120-128, 1995.
- ARAÚJO, W. L. Genética e Melhoramento de Fungos na Biotecnologia. Matrícula: 38717. Disponível em: < [http:// www.ufv.br/dbg/trab2002/MELHOR/MHR004.htm](http://www.ufv.br/dbg/trab2002/MELHOR/MHR004.htm). 2002.
- ARX, J. A. VON. The Genera of fungisporulating in pure culture. 2a. ed. Vaduz **J. Cramer**, 351p.1974.
- ATHAYDE SOBRINHO, C. ; FERREIRA, P. T. de CAVALCANTI, L. S. Indutores Abióticos. In: CAVALCANTI, L. S. ; DI PIERO, R. M. ; CIA, P. ; PASCHOLATI, S. F. ; VILELA DE RESENDE, M. L. ; ROMEIRO, R. S. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos, Piracicaba: **FEALQ**, v. 13, p. 51-80, 2005.
- AYALA, F.J. Population and Evolutionary Genetics. A Primer. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Menlo Parc, California. 268p.1982.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI, W. JR; ARAÚJO & W. L.; PEREIRA, J. O. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais In: **Biociencia: avanços na agricultura**. SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M. & AZEVEDO, J. L. (ed. EDUCS, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, - 68). . 233p., 2002.

BARR, M. E. *Prodomus to the class Loculoascomycetes*. Published by the author, Amherst, MA. 1987.

BAURA, G. ; SZARO, T. M. ; BRUNS, T. D. *Gastrosuillus laricinus* is a recent derivative of *Suillus grevillei*: molecular evidence. **Mycologia** 84: 592-597. 1992.

BARNERTT, H. C. & HUNTER, B. B. *Illustrated Genera of Fungi*. Third edition, Mineapolis, Burgess Publishing Company, 241p.1972.

BERBEE, M. L. ; TAYLOR, J. W. Fungal molecular evolution gene trees and geologic time. In: McLaughlin, D. J. , McLaughlin, E. G., Lemke, P. A. (Eds), **The Mycota VII: Part B**. Springer- Verlag, Berlin, pp. 229-245, 1993 2001.

BLEARS, M. J. ; GRANDIS, S. A. de; LEE, H. ; TREVORS, J. T. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** (United Kingdom) 21:99-114, 1998.

BOOKS, F. E. ; FERRIN, D. M. Branch dieback of Southern California chaparral vegetation caused by *Botryosphaeria dothidea*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 84, n. 1, p. 78-83, Jan. 1994.

BORÉM, A. ; CAIXETA, E. T. **Marcadores Moleculares**. Viçosa, MG, 374p. : il. 2006.

BOSTOCK, R. M. Signal conflicts and synergies in induced resistance to multiple attackers. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, p. 99-109, 1999.

BROADBENT, D.; HEMMING, H.G.; TURNER, W.B. GB Patent 1386266 C07C61/36. **Imperial Chemical Industries. Great Britain**. Preparation of Jasmonic Acid. 1968.

BROWN, E. A. ; BRITTON, K. O. *Botryosphaeria* diseases of apple and peach in the southeastern United States. **Plant Disease** 70, 480-484. 1986.

BURDON, J.J. & ROELFS, A. P. Isozyme and virulence variation in asexually reproducing populations of *Puccinia graminis* and *P. recondita* on wheat. **Phytopathology** 75:907-913. 1985.

BURGESS, T. ; MALAJCZUK, N. ; DELL, B. Variation in *Pisolithus* and basidiospore morphology, culture characteristics and analysis of polipeptides using ID SDS-PAGE. **Mycological Research**, Edinburg, v. 99, n. 1, p. 1-13, Jan. 1995.

BUTIN, H. Morphological adaptation and spore pleomorphism in the form-complex *Dichomera-Camarasporium* and *Fusicoccum-Dothiorella Sydowia*. **Ann. Mycol.**, 45 (2), 161 – 166, 1993.

CARDOSO, J. E. ; MAIA, C. B. ; PESSOA, M. N. G. Ocorrência de *Pestalotiopsis psidii* e *Lasiodiplodia theobromae* causando podridão no caule da goiabeira no Ceará, **Fitopatologia Brasileira**, Brasília , v. 27, n. 3 n. 3, p. 320, maio/jun. 2002.

CASTELANI, A. Viability of mold culture of fungi in destied water. **J. Trop. Med. Hyg.** v. 42, p - 225. 1939.

CHALHOUB, B. A. ; THIBAUT, S. ; LAUCOU, V. ; RAMEAU, C. ; HOFTE, H. ; COUSIN, R. Silver staining and recovery of AFLP™ amplification products on large denaturing polyacrylamide gels. **BioTechniques** 22:216-220, 1997.

CLEMENT, M. ; POSADA, D. & CRANDALL, K. A. TCS: a computer program to estimative gene genealogies. **Molecular Ecology**, v.9, no. 10, p. 1657-60. 2000.

CREELMAN, R. A. ; MULLET, J. E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.48, 355-381, 1997.

CRESTES, S. ; TULMANN NETO, A. ; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology, Reporter**, 19: 299-306. 2001.

CROUS, P. W. ; PALM, M. E. Reassessment of the anamorph genera *Botryodiplodia*, *Dothiorella* and *Fusicoccum*. **Sydowia**, Horn, v. 51, n. 2, p. 167-175, Dec. 1999.

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

CORTÊS, H. P. Introdução aos Hormônios Vegetais. **EMBRAPA**. 131-157. 2000.

DEGANI, A. L. G., Cass, Q. B. Cromatografia um breve ensaio. **Química nova na escola cromatografia**. (7):1-5. 1998.

DENMAN, S. ; CROUS, P. W. ; WINGFIELD, M. J. A taxonomic reassessment, of *Phyllachora proteae*, a leaf pathogen of *Proteaceae*. **Mycologia**, 91:510-516, 2000.

DEVI, U. K. ; REINEKE, A. ; RAO, U. C. M. ; REDDY, N. R. N. ; KHAN, A. P. A. AFLP and single –strand conformation polymorphism studies of recombination in the entomopathogenic fungus *Nomurea rileyi*. **ELSEVIER Mycological Research III** 716-725, 2007.

DHONDT, S. ; GEOFFROY, P. ; STELMACH, B. A. ; LEGRAND, M. ; HEITZ, T. Soluble phospholipase A (2) activity is induced before oxylipin accumulation in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves and is contributed by patatin-like enzyme. **Plant Journal**, v. 23, 431-440, 2000.

DUARTE, M. L. R. ; ALBUQUERQUE, F. C. ; CORREA, M. P . F. Variações morfológicas e fisiológicas de isolamento de *Colletotrichum guaranicola*. **Fitopatologia Brasileira**. 20 : 141-144,1995.

ELLIS, M. B. Dematiaceous - Hypomycetes. **England:** CMI, 59-61: il.1971.

ENCINAS, O. ; DANIEL, G. Depletion of non-structural compounds during attack of pine and birch wood by the blue stain fungus *Lasiodiplodia theobromae*. **Journal of Tropical Forest Products**, Kuala Lumpur, v. 5, n. 2, p. 184-196, Dec. 1999.

ENG, F. ; GUTIÉRREZ-ROJAS ; TORRES, E. F. Culture Conditions for Jasmonic Acid and Biomass Production by *Botryodiplodia theobromae* in submerged Fermentation. **Process Biochemistry**. 33(7): 715-720.1998.

ESPOSITO, E. ; AZEVEDO, J. L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia/Orgs. Caxias do Sul: **Educs**, 510p.: il.; 21 cm (Coleção Biotecnologia). 2004.

FARNER, E.E.; RYAN, C.A. Interplant Communication; Aisborne Methyljasmonate Induces Synthesis of Proteinase Inhibitors in Plant Leaves. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 87: 7713-7716. 1990.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution** 39: 783/791, 1985.

FERREIRA, M. E. ; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2. ed. Brasília: **EMBRAPA-CENARGEN**, 220p, 1998.

FUNGARO. M. H. P. Uso de RAPD na Taxonomia. In: Anais IX Encontro de geneticista do Rio Grande do Sul, Caxias do Sul. 78p. 1994.

FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia. **Biotecnologia** – Ciência & Desenvolvimento , Uberlândia, v. 3, n. 14, p. 12-16, maio/jun, 2000.

GABR, M. R. ; SALEH, O. I. ; NOUR, A. H. ; SHEHATA, Z. A. *Botryodiplodia* Fruit Rot of Pear Fruits, Some Physiological and Pathological Studies. **Annis. Agric. Sci.** 35: 427-443. 1990.

GAIOTTO, F. A. ;BRAMUCCI, M. ; GRATTAPAGLIA, D. Estimation of outcrossing rate in breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics** 95:842-849, 1997.

GARCIA, J. E. ; VILAS-BOAS, L. A. ; DEKKER, R. F. H.; FUNGARO, M. H. P. ; BARBOSA, A. M. Molecular identification of a species of *Botryosphaeria* sp.; *Botryosphaeria rhodina*. **GenBank**. No prelo Accession Number: AY612337, 2004.

GUARRO, J. ; GENÉ, J. ; STCHIGEL, A. M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 3, p. 454-500, Jul. 1999.

GUNTHER, T. ; MIERSCH, O. ; FRISTCHE, W. ; SEMBDNER, G. Nahmermedium zur Herstellung von 7-iso-jasmons. Patentschrift DD 2722869 A1 **Akademic de Wissenschaften, Deutsche** Demokratische Republik. 1990.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium** Series 41: 95-98. 1999.

HAMBERG, M. ; GARDNER, P. Oxylin Pathways to Jasmonates: Biochemistry and Biological significance. *Biochimica et Biophysica ACTA*. 1165: 1-8, 1992.

HANLIN, R. T. Gêneros ilustrados de ascomicetos/Recife: **Imprensa da Universidade Federal Rural de Pernambuco**, 274p. : il. 1996.

HILLIS, D M. ; DIXON, M. T. Ribossomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. Quarterly **Review of Biology**, v. 66, p. 441-453, 1991.

ISHIGURO, S. ; KAWAI-ODA, A.; UEDA, J. ; NISHIDA, I. ; OKADA, K. The Delective in Anther Dehiscence1 Gene Encodes A Novel Phospholipase A1 Catalyzing the Initial Step of Jasmonic Acid Biosynthesis, Which Synchronizes Pollen Maturation, Anther Dehiscence, and Flower Opening in Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 13, 2191-2209, 2001.

JAIN, S. K. & SINGH, R. S. Population biology of avena. VII. Allozyme variation in relation to the genome analysis. **Botanical Gazette**. 140: 356-62, 1979.

JONES, C. J. ; EDWARDS, K. J. ; CASTAGLIONE, S. ; WINFIELD, M. O. ; SALA, F. ; WIEL, C. van de ; BREDEMEIJER, G. ; VOSMAN, B. ; MATTHES, M. ; DALY, A. ; BRETTSCHEIDER, R. ; BETTINI, P. ; BUIATTI, M. ; MAESTRI, E. ; MALCEVSKI, A. ; MARMIROLI, N. ; AERT, R. ; VOLCKAERT, G. ; RUEDA, J. ; LINACERO, R. ; VAZQUEZ, A. ; KARP, A. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. **Molecular Breeding** 3:381-390, 1997.

KIM, K. W. ; PARK, E. W. ; KIM, Y. H. ; AHN, K. K. ; KIM, P. G. ; KI, K. S. Latency-and defense-related ultrastructural characteristics of apple fruit tissues infected with *Botryosphaeria dothidea*. **Phytopathology**. St. Paul, v. 91, n. 2. 165-172, Feb. 2001.

KIMATI, H. ; AMORIN, L. ; BENJAMIM FILHO, A. ; CAMARGO, L. E. A. ; REZENDE, J. A. M. Manual de Fitopatologia. Doenças de plantas cultivadas **Editora Agrônômica Ceres Ltda**. v. 2. 3a. edição. São Paulo - SP. 774p.1997.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution** 16: 111-120, 1980.

KODA, Y. The Role Jasmonic Acid and Related Compounds in the Regulation of Plants Development. *Int. Rev. Cytol*, 135: 155-159, 1992.

KOZLOWISKI, G. ; BUCHALA, A. ; METRAUX, J. P. Methyl jasmonate protects Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) seedling against *Pythium ultimum* Trow. Physiological and Molecular **Plant Pathology**, London, v. 55, p 53-58, 1999.

LEMUS, E. E. P. ; HIPOJOSA, G. F. ; CORTÊS, H. P. ; MASUMOTO, K. & CID, L. P. B. Introdução aos hormônios vegetais. Brasília: **EMBRAPA. Recursos Genéticos e Biotecnologia**. 180p. il. 2000.

LI, H. Y. ; CAO, R. B. ; MU, Y. T. In vitro inhibition of *Botryosphaeria dothidea* and *Lasiodiplodia theobromae*, and chemical control of gummosis disease of Japanese apricot and

peach-trees in Zhejiang Province, China . **Crop Protection**, Amsterdam, v. 14, n. 3, p. 187-191, May, 1995.

LOPES, M. S. ; LOPES, M. T. G. ; FIGUEIRA, A. ; CAMARGO, L. E. A. ; FUNGARO, M. H. P. ; CARNEIRO, M. S. ; VIEIRA, M. L. C. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia , v. 5, n. 29, p. 56-60, 2002.

LOPES, M. T. G. Mapeamento de genes de resistência à mancha de Phaseosphaeria. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo. p 96 2003.

MADDISON, D. R. ; SWOFFORD, D. L. & MADDISON, W. P. Nexus – an extensible file format for systematic information. **Systematic Biology** 46: 590-621.1997.

MAGNANI, M.; FERNANDES, T.; PRETE, C. E.C.; HOMECHIM, M.; ONO, E. Y. S.; VILAS-BOAS, L. A.; SARTORI, D.; FURLANETO, M. C.; FUNGARO, M. H. P. Molecular Identification of *Aspergillus* spp. isolated from coffee beans. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 62, n. 1, p. 45-49, Jan/Feb. 2005.

MAJER, D. ; MITHEN, R. ; LEWIS, B. G. ; VOS, P. ; OLIVER, R. P. The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. **Mycological Research**, v.100, p. 1107-1111, 1996.

MARTINS, M. K. **Variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp. e estudo da interação com a planta hospedeira.** 2005. 110p. Tese (Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

MASILAMINI, S. ; MUTHUMARY, J. Development of conidiomata in *Botryodiplodia theobromae*. **Mycological Research**, Kidlington, v. 100, pt 11, p. 1383-1387, Nov. 1996.

MASON, H. S. ; MULLET, J. E. Expresion of Two Soy Beans Vegetative Storage Protein Genes During Development and in a Response to Water deficit, Wounding, and Jasmonic Acid. **Plant Cell**. 2: 599-579, 1990.

MATIOLI, S. R. Biologia Molecular e Evolução. Ribeirão Preto: **Holos, Editora**. 202p. 2001.

MEDEIROS, R. B. de Mecanismos de Agressão e Defesa nas Interações Plantas-Patógenos. Brasília : **Editora Universidade de Brasília**. 290p. 2003.

MELO I. S. de; VALADARIS-INGLIS, M. C. NASS, L. L. VALOIS, A. C. C. Recursos Genéticos e Melhoramento – Microrganismos. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente. 743p. 2002.

METZEMBERG, R. L. Benefactor s lecture the impact of molecular biology on mycology. **Mycological Research**. v. 95, 9-13, 1991.

MEYER, A.; MIERCH, O. ; BUTTNER, C.; DATHE, W. Y.; SEMBDINER, G. Ocurrence of the plant growth regulators jasmonic acid in plants. **J. Plant Growth Regul**, V. 3, p. 1-8, 1984.

MIERSCH, O. ; GUNTHER, T. ; FRITSCH, W. ; SEMBDNER, G. Jasmonates from Different Fungal Species. **Natural Product Letters**.. 2: 293-299. 1993.

MIERSCH, O. ; PREISS, A. ; SEMBDNER, G. ; SCHREIBER, K. (+)- Isojasmonic acid and related compounds from *Botryodiplodia theobromae*. **Phytochemistry**. 26: 1037-1039.1987.

MIERSCH, O. ; SEMBDNER, G. ; SCHREIBER, K. ; RICHTER, K. ; KOCHMANN, W. ; FRISTHE, W. Patentschrift DD 216734 A1 **Alkademie de Wissenschaften**, Deutsche Demokratische Republik. Verfahren zur Herstillung von Jasmons, 1989.

MIERSCH, O. ; BOHLMANN, H. ; WASTERNACK, C. Jasmonates and related compounds from *Fusarium oxysporum*. **Phytochemistry** 50: 517-523, 1998.

MILLER, R. N. ; QUEZADO-SOARES, A. M. ; LOPES, C. A. Molecular comparison of *Fusarium* population causing eumartii wilt and dry rot of potato in Brasil **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, p. 149-155, 1999.

MORTON, N. E. ; KRIEGER, H. ; MI, M. P. Natural selection of polymorfism in Northeast Brazil. **Am. J. Hum. Genet.** 28: 153-172. 1966.

MOYNA, P. ; DELLACASSA, E. ; MENENDEZ, P. Técnicas analíticas aplicadas aos óleos essenciais. In: SERAFINI, L. A. *et al.*, Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria. Caxias do Sul. **EDUCS**.. 6: 165 - 191. 2002.

MUELLER, U. G. ; WOLFENBARGER, L. L. AFLP genotyping and fingerprinting. Trends in **Ecology and Evolution** 14:389-394, 1999.

O'NELL, N. R. ; van BERKUM, P. ; LIN, J. J. ; KUO, J. ; UDE, G. N. ; KENWORTHY, W. SAUDERS, J. A. Application of amplified restriction fragment lenght polymorphism for genetic characterization of *Colletotrichum* pathogens of alfalfa. **Phytopathology**, 87(7): 745-750, 1997.

PAGLIA, G. ; MORGANTE, M. PCR-based multiplex DNA fingerprinting tecniques for the analysis of conifer genomes. **Molecular Breeding** 4:173-177, 1998.

PATHIER, B. Jasmonates: Hormonal regulators or stress factors in leaf senescence? **Journal Plant Growth Regul.** Dordrecht, v. 9, n. 1, p-1-7, 1990.

PAVLICEK, A. ; HRDÁ, S. & FLEGR, J. (1999). Free Tree – Freeware program for construction of phylogenetic tree on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. **Folia Biol (Prague)** 45, 97-99, 1999.

PERES, A. P. ; MANN, R. S. ; VIEIRA, M. DAS G. G. C.; MACHADO, J. DA C. Variabilidade Morfocultural e Genética de Fungos Associados à Podridão Peduncular do Mamão. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v.27, n. 5, p. 1053-1062, set/out., 2003.

PETRINI, O. ; Ecological and physiological aspects of host-specificity in endophytic fungi. In: REDLIN, S. C. ; CARRIS, L. M. Endophitic fungi in grasses and woody plants: systematics, ecology and evolution. St. Paul-Minnescola-USA: St. Paul-Minnesota- USA: **APS PRESS**, cap. 4f, 87-100p, 1986.

- PUNITHALINGAM, E. Studies on Shaeropsidales in culture. II **Mycological Papers**. 136: 1-9, 1974.
- PUTERKA, G. J. ; BLACK, W. C. ; STEINEER, W. M. ; BURTON, R. L. Genetic Variation and phylogenic relationships among worldwide collections of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Morkvilko). inferred from allozyme and RAPD-PCR markers. *Heredity*, London, **70**: 604-618, 1993.
- RAMOS, L. J. ; DAVENPORT, T. L. ; MCMILLAN, R. T. ; LARA, R. P. The resistance of mango (*Mangifera indica*) cultivars to tip dieback disease in Florida. **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, n. 5, p. 509-514, May 1997.
- RAKWAL, R. AGRAWAL, G. K. ; YONEKURA, M. ; KODAMA, O. Naringenin 7-O-methyltransferase involved in the biosynthesis of the flavanone phytoalexin sakuranetin from rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Science**, v. 155, 213-221, 2000.
- RAYACHHETRY, M. B. ; ELLIOT, M. L. Evaluation of fungus-chemical compatibility for melaleuca (*Melaleuca quinquenervia*) control. **Weed Technology**, Lawrence, v. 11, n. 1. p. 64-69, Jan/Mar. 1997.
- READER, U. ; BRODA, P. Rapid preparation od DNA from filamentous fungi . **Letters in Applied Microbiology** , Oxford. v. 1, p.17-20. 1985.
- REYES-FRANCO, M. C. ; HERNÁNDEZ-DELGADO, S. ; BEAS-FERNÁNDEZ, R. MEDINA-FERNÁNDEZ, M. , SIMPSON J., and MAYER-PÉREZ, N. Pathogenic and Genetic Variability within *Macrophomina phaseolina* from Mexico and Other Countries. **J. Phytopathology**. 154 Aguascalientes , Mexico , 447-453, 2006.
- ROHLF, F. L. J. **Numeral taxanomy and multivariate analysis system**: version 2.10. New York: [sn.], 2000.
- ROSA, D. D.; MARQUE J. M; FENILLE, R. C.; SOUZA, N. L E KURAMAE, E. E. Análise filogenética de *Phytophthora capsici* Leonian do Estado de São Paulo baseada na seqüência de nucleotídeos da região ITS-5,8S rDNA. **Acta Scientiarum, Biological Sciences**. Maringá, v. 25, no. 2, p.429-434, 2003.
- ROSA Jr, V. E. de ; NOGUEIRA, F. T. S. ; MENOSSI, M. ; ULIAN, E. C. ; ARRUDA, P. Identification of Methyl jasmonate-reponsive genes in sugarcane using cDNA arrays. **Braz. J. Plant Physiol**, 17(1): 173-180, 2005.
- RIDOUT, C. J. ; DONINI, P. Use of AFLP in cereal research. **Trends in Plant Science** 4:76-79, 1999.
- ROSSMAN, A. Y. ; PALM, M. E. & SPIELMAN, L. J. A literarature guide for the identification of palm pathogenic fungi. St. Paul: **APS Press**. 252p.1987.
- ROUX, J. ; WINGFIELD, M. J. Survey and virulence of fungi occurring on diseased *Acacia mearnsii* in South Africa. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 99, n. 3, p. 327-336, Dec. 1997.

RUBINI, M. R. ; SILVA-RIBEIRO, R. T. ; POMELLA, A. W. V. ; MAKI, C. S. ; ARAÚJO, W. L. ; SANTOS, D. R. ; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches`Broom Disease. *Int. J. Biol. Sci.* 1: 24-33, 2005.

SAITOU, N. , NEI, M. The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. **Molecular Biology and Evolution**, Paris, v. 4, n. 4, p. 406-425, Jul. 1987.

SALDANHA , R. L. ; GARCIA, J. E. ; DEKKER, R. F. H. ; VILAS BOAS, L. A. ; BARBOSA, A. M. Genetic diversity among *Botryosphaeria* isolates and their correlation with cell wall-lytic enzyme production. **Brazilian Journal of Microbiology**. ISSN 1517-8283. 38:259-264. 2007.

SALDANHA, R. L. **Diversidade Genética de Isolados de Botryosphaeria e a produção de lacases, pectinases e β -1,3-Glucanases**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre. Londrina, 116p, 2006.

SALEH, A. A. ; ZELLER, K. A. ; ISMAEL, A. S. M. ; FAHMY, Z. M. ; EL-ASSIUTY, E. M. ; LESLIE, J. F. Amplified fragment length polymorphism diversity in *Cephalosporium maydis* from Egypt. *Phytopathology*, v.93, p.853-859, 2003.

SALISBURY, F. B. ; ROSS, C. W. *Plant Physiology*. Wassworth Publishing Company, Four Edition, California, USA, 1992.

SAMBROOK, J. ; RUSSEL, D. W. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 3a. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SAMUELS, G. J. ; SEIFERT, K. A. The impact of molecular characters on systematics of filamentous ascomycetes. **Annual Review Phytopathology**, v. 33, p.37-67, 1995.

SANCHEZ, M. E. ; VENEGAS, J. ; ROMERO, M. A. ; PHILLIPS, A. J. L. ; TRAPER, A. *Botryosphaeria* and related taxa causing oak canker in southwestern Spain. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, n. 12, p. 1515-1521, Dec. 2003.

SANGER, F. ; NICKLEN, S. ; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Washington, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SAVELKOUL, P. M. ; AARTS, H. M. ; HAAS, J. de ; DIJKSHOORN, L. ; DUIM, B. ; OTSEN, M. ; RADEMAKER, J. W. ; SCHOOLS, L. LENSTRA, J. A. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. **Journal of Clinical Microbiology** 37:3083-3091, 1999.

SCHALLER, F. Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signaling molecules. **Journal of Experimental Botany**. 52(354): 11-23. 2001.

SCHMIDT, H. ; NIESSEN, L. ; VOGEL, R. F. AFLP analysis of *Fusarium* species in the section Sporotrichiella-evidence for *Fusarium langsethiae* as a new species. *ELSEVIER - International Journal of Food Microbiology* (95) 297-304, 2004.

SERAFINI, L. A. ; BARROS, N. M. & AZEVEDO, J. A. Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria. Caxias do Sul: **EDUCS**.. 433p. 2002.

SILVA-MANN, R. ; MACHADO, J. da C. ; CARVALHO, K. C. S. ; VIEIRA, M. G. C. Estudo da variabilidade genética de isolados do complexo *Colletotrichum* associados a sementes de algodão por meio de técnicas moleculares e inoculação em plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 27-32, jan/fev. 2002.

SILVA, S.da C. ; Silva, M. F. das G. F. ; Filho Edson, R. ; Souza, A. Q. ; Muller, M. W. Identificação de Fungos Isolados de *Khaya ivorensis* (Meliaceae). **XXVII Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares**. Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Dez, 2004.

SILVA, S.da C. ; Silva, M. F. das G. F. ; Filho Edson, R. ; Fernandes, J. B. ; Vieira, P. C. ; Souza, A. Q. ; Muller, M. W. Estudo químico de *Botryosphaeria rhodina* um fungo patogênico Isolado de *Khaya ivorensis* (Meliaceae) Sociedade Brasileira de Química (SBQ) 29ª. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2007.

SILVEIRA, R. L. V. A. ; HIGASHI, E. N. ; SGARBI, F. ; MUNIZ, M. R. A. Principais doenças na cultura do *Eucalyptus*. *Informações Agronômicas*, Piracicaba, n. 93, p. 26-30. **Encarte Técnico**, mar. 2001.

SILVEIRA, R. L. V. A. ; KRUGNER, T. L. ; SILVEIRA, R. I. ; GONÇALVES, A. N. Efeito de boro na suscetibilidade de *Eucalyptus citriodora* a *Botryosphaeria ribis* e *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 2, n. 4, p. 482-485, 1996.

SIVANESAN, A. The bitunicate Ascomycetes and their anamorphs. **J. Cramer**, Vaduz. 701pp. 1984.

SMITH, H. ; WINGFIELD, M. J. ; PETRINI, O. *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus nitens* in South Africa. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 89, n. 1-3, p. 189-195, Dec. 1996.

SUTTON, B. C. The Coelomycetes. Kew: Commonwealth **Mycological Institute**, 1980.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. *Colletotrichum*: biology, pathology and control. Wallingford: Redwood, 388 p. 1992.

SWART, L. ; CROUS, P. W. ; PETRINI, O. ; TAYLOR, J. E. Fungal endophytes of Proteaceae, with particular emphasis on *Botryosphaeria proteae*. **Mycoscience**, Tokyo, v. 41, p. 123-127, 2000.

TeBEEST, D. O. ; SHILLING, C. W. .; HOPKINS, R. L. ; WEIDEMANN, G. J. The number of nuclei in spores of three species of *Colletotrichum*. *Mycologia*, Broux, v. 81, n. 1, p. 147-149, Jan/Fev. 1989.

TAMARIN, R.H. Principles of genetics. 4. ed. Dubuque: W. C. Brown, 1993.

THOMPSON, J. D. ; GIBSON, T. J. ; PLEWNIAK, F. JEANMOUGIN, F. ; HIGGINS, D. G. The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research** 24: 4876-4882.1997.

TOOLEY, P. W. ; FRY, W. E. ; VILLAREAL GONZALEZ, M. J. Isozyme characterization of sexual and asexual Phytophthora infenstans populations. **Journal of Heredity**, v. 76, p. 431-435, 1985.

UEDA, J. ; MIYAMOTO, K. ; KANISAKA, S. Separation of a New Type of Plant Growth Regulation, Jasmonates, by Chromatographic Procedures. **Journal of Cromatographic A.. 65B**: 129-142. 1994.

VALIM-LAMBRES, M. E. ; PRESTES, A. M. ; SAND, S. van der; MATSUMURA, A. T. S. Variação no aspecto cultural, morfológico e virulência em isolados de *Bipolaris sorokiniana* de trigo. *Fitopatologia Brasileira, Brasília*, v. 22, n. 4, p. 487-487, dez. 1997.

VAN DER A. A. H. A. Studies in Phyllosticta I. Studies in **Mycology**. no. 5, 1973.

VAN ECK, H. J. ; VANDER VOORT, J. R. ; DRAAISTRA, J. ; VAN ZANDVOORT E. ; VAN ENCKEVORT. The inheritance and chromosomal localization of AFLP markers in a non-imbred potato offspring, **Molecular Breeding**, v. 1, p. 397-410, 1995.

VICK, B. ; ZIMMERMAN, D.C. Oxidative systems for modification of fatty acids: the lipoxygenase pathway. In: STUMPF, P.K., CONN, E.E. (Eds.) **The Biochemistry of Plants**. Orlando: Academic Press, 9:53-97, 1987.

von ARX, J. A.; *Plant-pathogenic Fungi*. J. Cramer, Berlin, Germany. 1987.

VOS, P. ; HOGERS, R. ; BLEEKER, M. ; REIJANS, M. ; LEE. T. Von de; HORNES, M. ; FRUTTERS, A. ; POT, J. ; PELEMAN, J. ; KUIPER, M. ; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**. 23(21): 4407-4414, 1995.

WANDLAW, C. W. Observation on *Botryodiplodia* Fruit Root of the Banana **Tropical Agriculture VIII**, 227-230, 1993.

WANG, Y. H. ; THOMAS, C E. ; DEAN, R. A. Genetic mapping of a fusarium resisance gene (*Fom-2*) in melon (*Cucumis melon (Cucumis melo L.)*). **Molecular Breeding**, v. 6, p. 379-389, 2000.

WARDLAW, C. W. Observation on *Botryodiplodia* Fruit Root of the Banana **Tropical Agriculture VIII**. 227-230. 1932.

WHITE, T. J. BRUNS, T. ; LEE, S. ; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. ; GELFAND, D. H. ; SNINSKY, J. J. ; White, T. J. (Ed). PCR Protocols: a guide to methods and applications. San Diego: **Academic Press**, p. 315-322. 1990.

YAMAGASHI, Y. ; MITSUMORI, C. ; TAKAHASHI, K. ; FUJINO, K. ; KODA, Y. KIKUTA, Y. Jasmonic Acid-inducible Gene Expression of a Kunitz-type Proteinase Inhibitor in Potato Tuber Disks. **Plant Molecular Biologic**. 2: 539-541. 1993.

YUAN, Z. Q. ; MOHAMMED, C. Pathogenicity of fungi associated with stem cankers of eucalypts in Tasmania, Australia. **Plant Disease**, St. Paul, v. 83, n. 11, p. 1063- 1069, Nov. 1999.

ZABEAU, M. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. **European Patent Application** no. 0534858 A1. 1993.

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

ZHU, Y. L. ; SONG, Q. J. ; HYTEN, D. L. ; TASSELL, C. P. ; MATUKUMALLI, L K. ;