

Comparação das técnicas de PCR-RFLP e sequenciamento de região ITS-rDNA para análise filogenética de isolados de *Colletotrichum* spp

Comparison of the PCR-RFLP and ITS-rDNA sequencing technique for phylogenetic analyze of Colletotrichum spp isolates

Diorvania Cardoso Ribeiro¹, Amauri Bogo², Adriana Cibele de Mesquita Dantas³, Eliane Aparecida Gomes⁴, Cileide Maria Medeiros Coelho², Altamir Frederico Guidolin²

Recebido em 17/07/2007; aprovado em 03/04/2009.

RESUMO

O gênero *Colletotrichum* é dos grupos fitopatogênicos mais importantes, principalmente em regiões tropicais e subtropicais do mundo. A identificação das suas espécies é difícil, devido à grande variação morfológica intraespecífica. Métodos moleculares, como PCR-RFLP e o sequenciamento, têm ganhado destaque em estudos de filogenia deste fitopatógeno. Este trabalho objetivou comparar as técnicas de PCR-RFLP e sequenciamento para análise filogenética entre isolados de *Colletotrichum* spp. Todos os isolados foram cultivados em meio Batata-Sacarose (BS), por uma semana a 24 °C. Inicialmente foi realizada a amplificação do rDNA, utilizando-se iniciadores ITS1 e ITS4. A seguir foi feita a digestão da região ITS utilizando enzimas de restrição (*Rsa* I, *Alu* I, *Hinf* I, *Hpa* II, *Hha* I, *Xho* I, *Acc* I, *Eco* RI e *Taq* I) e revelação em gel de agarose 2%. Obteve-se uma grande variação com produtos da clivagem, de 500 a 90 pb. Os fragmentos amplificados foram purificados com o kit QIAquick Gel Extraction Kit 250 e as amostras foram sequenciadas na região ITS do rDNA de todos os isolados. As sequências foram alinhadas no software ClustalW e a árvore filogenética foi construída no software Mega 3.1. Os produtos obtidos na amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA, com a utilização do par de iniciadores ITS1 e ITS4, revelaram um fragmento de aproximadamente 600 pb para todos os isolados

analisados. A técnica PCR-RFLP não foi muito eficiente para a diferenciação das espécies de *Colletotrichum* spp, pois algumas das enzimas escolhidas tinham o seu sítio de clivagem em regiões conservadas, sobrepondo e mascarando os resultados. Já a técnica de sequenciamento possibilitou a separação dos isolados por espécies e hospedeiro e permitiu a comparação com os sequenciamentos dos bancos de genes. A técnica de PCR-RFLP deve ser utilizada atrelada à técnica de sequenciamento para se obter uma maior economia e veracidade dos resultados em estudos de filogenia de microorganismos.

PALAVRAS-CHAVE: filogenia, variabilidade genética, *Malus domestica* Borkh.

SUMMARY

The genus *Colletotrichum* is one of the most important pathogenic fungi group, mainly in tropical and subtropical areas of the world. The identification of *Colletotrichum* species is difficult due to their large morphological variation. Molecular methods, such as PCR-RFLP and rDNA sequence, have been very useful for phylogenetic studies of this pathogen. The objective of this work was to compare the PCR-RFLP and rDNA sequence techniques for phylogenetic analysis of *Colletotrichum* spp. Isolates. All isolates were cultivated from cultures

¹ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal - Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Laboratório de Análises Genéticas - CAV/UEDESC. Av. Luiz de Camões, 2090, 88520-000, Lages, SC.

² Eng. Agr., Dr., Professor do Departamento de Agronomia - CAV/UEDESC.

³ Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, SC.

⁴ Pesquisadora Embrapa Milho e Sorgo – CNPMS, Sete Lagoas, MG.

grown on Potato Sucrose Broth (PSB), for one week at 24°C. The amplification of the rDNA was accomplished by the ITS1 and ITS4 initiators, followed by digestion of the ITS area using restriction enzymes (*Rsa* I, *Alu* I, *Hinf* I, *Hpa* II, *Hha* I, *Xho* I, *Acc* I, *Eco* RI and *Taq* I). The revelation was made in agarose gel 2%. The primers produced fragments from 600 to 90 pb. The amplified fragment was purified with the kit QIAquick Gel Extraction Kit 250 (Uniscience of Brazil) and the internal transcribed spacer region of the rDNA (ITS1-ITS2) was sequenced. The ITS1- 5.8S-ITS2 sequences were aligned with the software ClustalW and the phylogenetic tree was constructed using the software Mega 3.1. The products obtained with the amplification of the ITS-rDNA produced a fragment of approximately 600 pb, for all the isolated analyzed. The PCR-RFLP technique is not very efficient to separate *Colletotrichum* spp because some of the restriction enzymes acted in conserved regions of the rDNA, affecting the results. However, the sequencing technique was accurate to separate *Colletotrichum* isolates per species and hosts, allowing the inclusion of published GenBank sequences. The PCR-RFLP technique should be used together with the rDNA sequencing technique in order to get cheaper and more reliable results in the phylogenic studies of microorganisms.

KEY WORDS: phylogenetic, genetic variability, *Malus domestica* Borkh.

INTRODUÇÃO

O gênero *Colletotrichum* é um dos mais importantes entre os fungos fitopatogênicos, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Este gênero apresenta espécies que causam doenças economicamente importantes em cereais, leguminosas, hortaliças e culturas perenes, incluindo muitas fruteiras (SERRA e SILVA, 2004). As espécies de *Colletotrichum* têm sido identificadas quase que exclusivamente através de características morfológicas e culturais.

Considerando que a identificação de espécies de *Colletotrichum*, quase sempre é difícil, devido a enorme variação de sua morfologia, métodos

moleculares têm ganhado popularidade nos últimos tempos (FREEMAN et al., 1998). Técnicas que utilizam marcadores moleculares vem sendo disseminadas para os estudos de diversidade genética em um grande número de grupos de organismos (STRALIOTTO e RUMJANEK, 1999).

O rDNA consiste em regiões do genoma conservadas separados por regiões variáveis, por isto vem sendo muito utilizado para estudos de identificação de raças com o objetivo de caracterizar aspectos adicionais dos patógenos que poderiam contribuir para melhor entendimento da sua evolução, bem como para obter um controle mais eficaz do mesmo (WHITE et al., 1990). Uma das técnicas mais utilizada na Micologia é a amplificação de rDNA por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR). Esta técnica permite a amplificação de regiões específicas do genoma, como o Espaço Interno Transcrito (ITS), localizado entre regiões altamente conservadas. O ITS é altamente conservado na espécie, mas é variável entre espécies, sendo frequentemente usado para taxonomia (WHITE et al., 1990). Os marcadores ITS podem gerar um grande número de informações e determinar uma medida mais precisa das distâncias genéticas entre espécies, facilitando a análise filogenética com inferência na variação taxonômica das espécies (LEE e TAYLOR, 1992).

O uso de endonucleases de restrição para digerir fragmentos de DNA amplificados por PCR é denominado de PCR-RFLP. A análise de PCR-RFLP é um método que tem contribuído para a taxonomia de fungos (SARTORI, 2005). A análise do rDNA após o corte com várias enzimas de restrição, vai gerar uma variação nos fragmentos obtidos, o que facilita os estudos de diversidade genética. O uso das enzimas de restrição é bastante indicado para estudos de diversidade com fins taxonômicos, devido a especificidade destas enzimas de restrição em clivar o DNA de qualquer organismo permitindo isolar fragmentos de DNA (STRALIOTTO e RUMJANEK, 1999). Esta técnica tem sido muito utilizada em análises de diversidade genética, por ser mais rápida e econômica (GARCIA et al., 2005).

As técnicas de PCR aliada ao sequenciamento direto, principalmente de DNA ribossomal, tornaram possível a comparação de ITS de muitos isolados e tem permitido avanços significativos na organização

taxonômica dos fungos, tendo como vantagem a determinação da ordem dos nucleotídeos com rapidez e eficácia. (SARTORI, 2005; WHITE, 1990).

Este trabalho objetivou comparar as técnicas de PCR-RFLP e sequenciamento da região ITS para análise filogenética entre isolados de *Colletotrichum* spp, agente causal de fitomoléstias em várias culturas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Biológico

Foram utilizados 39 isolados de *Colletotrichum* spp. de macieira, cedidos pela Estação Experimental da Epagri de São Joaquim, SC, dois isolados de citros, cedidos pela Fundecitros-SP e 10 isolados de goiaba serrana (*Feijoa sellowiana*) da Micoteca do Laboratório de Fitopatologia do CAV/UEDESC (Tabela 1).

Os fungos foram cultivados em meio de cultura BDA (Batata Agar Dextrose) e mantidos em câmara de crescimento a temperatura de 25 °C ± 1 °C por sete dias. Os isolados foram cultivados em meio líquido de Batata Sacarose (BS) no escuro a temperatura de 25 °C, por sete dias. Após este período, o micélio foi filtrado, lavado com água ultra-pura e liofilizado por 24 horas. Os isolados foram armazenados em tubos herméticos de 2 mL e mantidos a temperatura de 4 °C até a extração do DNA.

Extração e quantificação do DNA

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Análises Genéticas do Instituto de Melhoramento e Genética Molecular da UDESC Lages (IMEGEM UDESC). O DNA foi extraído de acordo com metodologia proposta por Schäfer e Wöstemeyer (1992) modificado por Junghans et al. (1998). Em um almofariz foi adicionado 0,5 g de micélio liofilizado, macerando-se as amostras com nitrogênio líquido até virar um pó e então transferindo para um micro tubo de 1,5 mL. Em seguida 500 µL do tampão de lise (Tris-HCl 50mM pH 7,2; EDTA 50mM pH 8,0; SDS 3%; β-Mercaptoetanol 1%) foram adicionados a cada amostra. Após a homogeneização, os tubos foram incubados 65 °C em banho-maria por 1 hora. Decorrido o período, foram adicionados 500 µL de fenol:clorofórmio (1:1) agitando suavemente e centrifugando as amostras a

12.000 g por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo adicionando-se 500 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) sendo novamente agitada e centrifugada nas mesmas condições anteriores. A fase aquosa foi retirada e adicionado 500 µL de isopropanol, homogeneizado e mantido por uma hora a -20 °C. Após a precipitação do DNA, procedeu-se uma centrifugação a 23.700 g por 20 minutos. A fase aquosa descartado e o DNA foi lavado com etanol 70% e centrifugado a 12.000 g por 5 minutos. Em seguida foi descartado todo o etanol e as amostras foram invertidas na bancada por 20 minutos para secagem do DNA. O DNA foi ressuscitado com 100 µL de água ultra-pura e mantido em câmara de fluxo laminar durante a noite. Posteriormente, 4 µL de RNase (10 mg mL⁻¹) foram adicionados e a solução incubada por 30 minutos a 37 °C. Os DNAs extraídos foram estocados a -20 °C. Para a utilização do DNA nas reações de PCR, as amostras foram diluídas com água ultra-pura em concentração final de 20 ng µL⁻¹, armazenados no freezer a - 20 °C.

Amplificação da região ITS do rDNA

As regiões ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA foram amplificadas utilizando os iniciadores ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') (WHITE et al., 1990). As amplificações foram realizadas em um Termociclador Hybaid PCR Express e GeneAmp® PCR System 9700, programado para realizar uma desnaturação inicial de 4 minutos a 94 °C, seguida de 30 ciclos, compostos de uma etapa de desnaturação (30 segundos a 94 °C), uma etapa de pareamento (60 segundos a 55 °C) e uma etapa de extensão (90 segundos a 72 °C) e uma extensão final de 72 °C por 10 minutos.

Na reação de amplificação das amostras, foram utilizados: 60 ng de DNA; 1 µL de tampão 10X; 0,25 mM de DNTP's; 3mM de MgCl₂; 1µM do oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4; 1,25 unidades da enzima Taq polimerase (5 unidades/µL); 28,25 µL de água ultra-pura para completar o volume da reação para 50µL. Após a amplificação 4 µL da reação de PCR, mais 4 µL de tampão de corrida foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 2%, em tampão TBE 1X (Tris – HCl 0,89M; Ácido

Tabela 1 - Isolados, hospedeiro, espécie e procedência dos isolados de *Colletotrichum* spp. utilizados no trabalho.

Acesso	Hospedeiro	Espécie	Procedência
M1	Macieira	<i>C. acutatum</i>	Caçador/ SC
M2	Macieira	<i>C. acutatum</i>	Caçador/ SC
M3	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Caçador/ SC
M4	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Vacaria/ RS
M5	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Vacaria/ RS
M6	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Frei Rogério/ SC
M7	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Frei Rogério/ SC
M8	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Frei Rogério/ SC
M9	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Frei Rogério/ SC
M10	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Curitibanos/ SC
M11	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	São Joaquim/ SC
M12	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	São Joaquim/ SC
M13	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	São Joaquim/ SC
M14	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Palmas/ PR
M15	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Fraiburgo/ SC
M16	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Fraiburgo/ SC
M17	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Campo Tenente/ PR
M18	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Campo Tenente/ PR
M19	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Campo Tenente/ PR
M20	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Campo Tenente/ PR
M21	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Campo Tenente/ PR
M22	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Palmeira/ PR
M24	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Palmeira/ PR
M25	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Palmeira/ PR
M26	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Palmeira/ PR
M27	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Palmeira/ PR
M28	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Palmeira/ PR
M29	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Palmeira/ PR
M30	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Palmeira/ PR
M31	Macieira	<i>C. acutatum</i>	Fraiburgo/ SC
M32	Macieira	<i>C. acutatum</i>	Fraiburgo/ SC
M33	Macieira	<i>C. acutatum</i>	Fraiburgo/ SC
M34	Macieira	<i>C. acutatum</i>	Fraiburgo/ SC
M35	Macieira	<i>C. acutatum</i>	Palmas/ PR
M36	Macieira	<i>C. acutatum</i>	Palmas/ PR
M37	Macieira	<i>C. acutatum</i>	Palmas/ PR
M38	Macieira	<i>C. acutatum</i>	São Joaquim/ SC
M39	Macieira	<i>C. acutatum</i>	São Joaquim/ SC
M40	Macieira	<i>C. acutatum</i>	São Joaquim/ SC
G1	Goiaba Serrana	<i>Colletotrichum</i> sp.	São Joaquim/ SC
G2	Goiaba Serrana	<i>Colletotrichum</i> sp.	São Joaquim/ SC
G3	Goiaba Serrana	<i>Colletotrichum</i> sp.	Nova Prata/ RS
G4	Goiaba Serrana	<i>Colletotrichum</i> sp.	Lages/ SC
G5	Goiaba Serrana	<i>Colletotrichum</i> sp.	Lages/ SC
G6	Goiaba Serrana	<i>Colletotrichum</i> sp.	São Joaquim/ SC
G7	Goiaba Serrana	<i>Colletotrichum</i> sp.	Vacaria/ RS
G8	Goiaba Serrana	<i>Colletotrichum</i> sp.	Lages/ SC
G9	Goiaba Serrana	<i>Colletotrichum</i> sp.	Anita Garibaldi/ SC
G10	Goiaba Serrana	<i>Colletotrichum</i> sp.	Anita Garibaldi/ SC
C1	Citros	<i>C. gloeosporioides</i>	Pardinho/ SP
C2	Citros	<i>C. acutatum</i>	Cordeirópolis/ SP

Bórico 0,89M; EDTA 0,02M), juntamente com um padrão de peso molecular de 100 pb (pares de base). Após a corrida, o gel foi visualizado em luz ultravioleta e fotografado.

Análise pela técnica de PCR-RFLP

Os produtos de PCR foram digeridos com as seguintes endonucleases de restrição: *Rsa* I, *Alu* I, *Hinf* I, *Hpa* II, *Hha* I, *Xho* I, *Acc* I, *Eco* RI e *Taq* I (*Invitrogen*). Foram utilizados 5 µL do produto obtido na reação de PCR, seguindo as recomendações do fabricante e incubados durante a noite. O perfil de restrição foi visualizado em gel de agarose 2%, utilizando-se nas linhas de extremidade do gel um marcador de fragmentos de tamanho conhecido, 100 pb DNA Ladder e uma amostra do fragmento amplificado não digerido, como padrões. Após a corrida, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado. Para algumas enzimas foi necessário utilizar gel de poliacrilamida 6%, para separar fragmentos com pesos muito similares.

Purificação dos fragmentos amplificados para o sequenciamento

Os produtos de amplificação correspondentes a região ITS do rDNA de todos os isolados de *Colletotrichum* spp foram purificados utilizando-se o kit QIAquick Gel Extraction Kit 250 de acordo com as recomendações do fabricante, para posterior sequenciamento.

Sequenciamento da região ITS do rDNA e análise dos dados

As reações de PCR de sequenciamento correspondentes a região ITS1-5.8S-ITS2 foram realizadas utilizando-se o kit de sequenciamento ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v1.1 (*Applied Biosystems*). As reações foram processadas no analisador automático de DNA ABI PRISM 3100 Genetic Analyser (*Applied Biosystems – Hitachi*). A árvore filogenética pela técnica de PCR-RFLP foi construída utilizando-se o algoritmo de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean) o qual gerou uma matriz de similaridade pelo software Genes 2006.4.1 (CRUZ, 1997). As sequências obtidas foram editadas através do software SeqScape 2.5

da Applied Biosystems, e alinhadas no software ClustalW. As sequências editadas foram utilizadas para procurar sequências similares usando o software *Blast_n* do NCBI. Após o alinhamento estas sequências foram processadas no Software Mega 3.1, para que fosse construída a árvore filogenética dos isolados de *Colletotrichum* spp, utilizando Tamura e Nei (1993) para a construção da matriz de distâncias, pelo método de Neighbor-Joining (SAITOU e NEI, 1987). Foi realizado um “bootstrap” com 10.000 replicações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os produtos de PCR obtidos na amplificação para todos os isolados de *Colletotrichum* spp apresentaram um padrão de aproximadamente 600 pares de base (pb). O padrão de fragmento obtido da região ITS para os isolados de *Colletotrichum* está dentro dos encontrados por vários autores em isolados de *Colletotrichum* de diferentes fruteiras (BUDDIE et al., 1999; FREEMAN et al., 2001; CULEBRAS et al., 2003). Foi obtido após a digestão uma variação de fragmentos de 90 a 500 pb, com a utilização das enzimas *Rsa* I, *Alu* I, *Hinf* I, *Hpa* II, *Hha* I, *Xho* I, *Acc* I, *Eco* RI e *Taq* I. A enzima *Xho* I não clivou nenhuma amostra, corroborando com os dados observado por Saha et al. (2002) em estudo da variação genética de isolados de *C. acutatum* em seringueira.

A análise através da técnica de PCR-RFLP da região ITS, não se mostrou eficiente para a diferenciação dos isolados de *Colletotrichum*, visto que o agrupamento não teve relação direta entre espécies e hospedeiro. Houve a formação de dois grupos, sendo que no grupo I, a maioria dos isolados são de *C. gloeosporioides* e no grupo II, a maioria é de *C. acutatum* (Figura 1), mas mesmo assim não foi possível encontrar alguma relação mais lógica entre os isolados de *Colletotrichum*, devido ao fato de haver isolados de outras espécies e hospedeiros no mesmo grupo. Assim não foi possível relacionar geneticamente os isolados de *Colletotrichum* somente através da técnica de PCR-RFLP. A partir dos resultados obtidos através da técnica PCR-RFLP acredita-se que as enzimas de restrição utilizadas foram as responsáveis pelo insucesso dos resultados,

pois dependendo do sítio de clivagem de cada enzima podem gerar fragmentos diversos, alterando ou dificultando a interpretação dos resultados (Figura 02).

A falta de especificidade da enzima pode ter sido a explicação para o grande número de fragmentos gerados, portanto, nota-se a importância da escolha correta das enzimas, para evitar que um grande

número de fragmentos possa ser gerado, e que os mesmos sejam considerados erroneamente na análise dos resultados (Figura 2). Vários trabalhos apresentam a importância da utilização de um número expressivo de enzimas para poder selecionar as mais eficientes para a avaliação dos fragmentos em estudo, ou seja, aqueles que irão digerir os fragmentos desejados

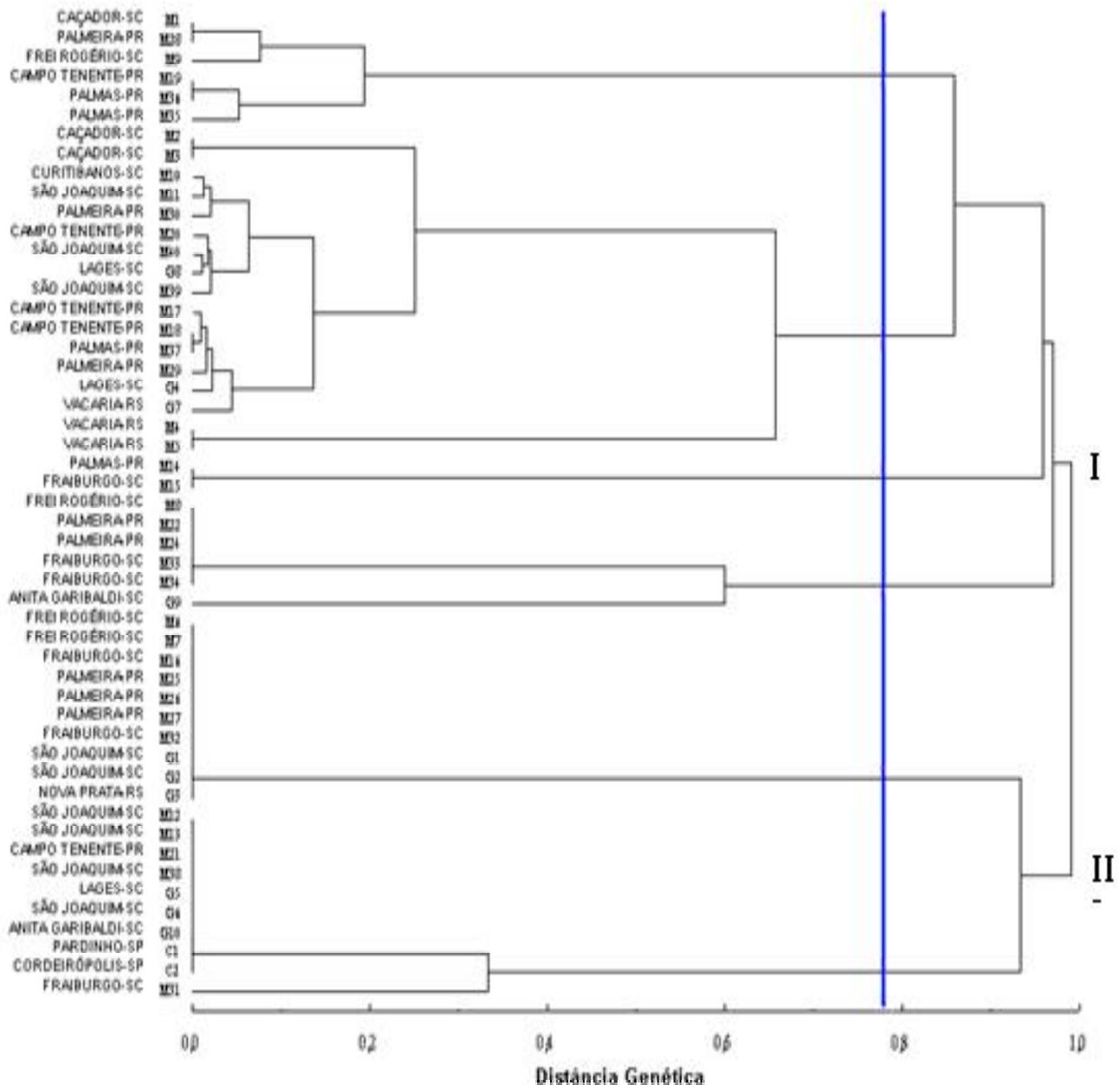


Figura 1- Árvore filogenética construída pelo software Genes 2006.4.1 a partir da matriz binária gerada pelos fragmentos obtidos pela técnica de PCR-RFLP, utilizando o coeficiente de Nei e Li (1979) ($2.a/2.a+b+c$) e o algoritmo de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*).

(SAHA et al., 2002; RABELLO et al., 2005; MAKI, 2006 e TASSA et al, 2006).

Como se trata do estudo do gênero *Colletotrichum*, a semelhança genética entre isolados se torna maior, em relação a outros estudos onde se procura diferenciar isolados por gêneros (NAVAJAS et al., 1999; GOMES et al., 2002; MAKI, 2006).

Destéfano (2003) em um estudo para diferenciação de *Metarhizium* relata que só foi possível obter diferenciação entre as espécies deste gênero com uma das seis enzimas de restrição utilizadas. Isso ressalta a importância da escolha certa das enzimas de restrição a serem utilizadas nos estudos de relações genéticas entre organismos. Outro fator importante que deve ser levado em consideração é o fato de algumas enzimas de restrição cortarem fragmentos muito pequenos, em torno de 50 pb, ou tamanho similar que dificultam a interpretação em géis de eletroforese (UENO e JORGE, 2002). Contudo, tais fragmentos menores não foram considerados na análise.

Através do sequenciamento da região ITS do rDNA dos isolados de *Colletotrichum* foi possível distinguir com clareza as espécies e relacioná-los com os respectivos hospedeiros (Figura 03), porém essa técnica é mais onerosa que a PCR-RFLP. Pode-se notar que o isolado M7 (Figura 03) não foi agrupado com os demais isolados da mesma espécie, pois em

teste de patogenicidade não ocasionou nenhum tipo de sintoma nas folhas e nem em frutos de macieira quando inoculado com ferimentos, produziu apenas micélio sob os tecidos inoculados, acreditando-se, possivelmente, se tratar de um saprófita de gênero *Colletotrichum* (Sanhueza, R. M. comunicação verbal).

A sequência da região ITS do isolado M7, quando confrontado com as demais sequências do *GenBank* apresentou valores menores de 93% de similaridade entre as sequências, enquanto para os outros isolados, os valores ficaram acima de 97%.

Apesar da técnica de PCR-RFLP ser considerada mais rápida, econômica e de igual segurança e eficácia ao sequenciamento (GARCIA et al., 2005), nota-se a necessidade de estudos mais aprofundados a respeito.

Têm-se utilizado muito a técnica de PCR-RFLP como parte inicial dos estudos filogenéticos de microorganismo, onde através desta técnica é possível agrupar todos os isolados e a partir destes grupos escolher os mais representativos de cada grupo para que sejam submetidos ao sequenciamento, assim se obtém menos amostras para sequenciar e maior precisão nos resultados obtidos (SCHNABEL et al., 1999; FREEMAN et al., 2001; CULEBRAS, 2003; DESTÉFANO, 2003; SOBRAL, 2003; MARTINS, 2005; MAKI, 2006). Contudo, para os resultados

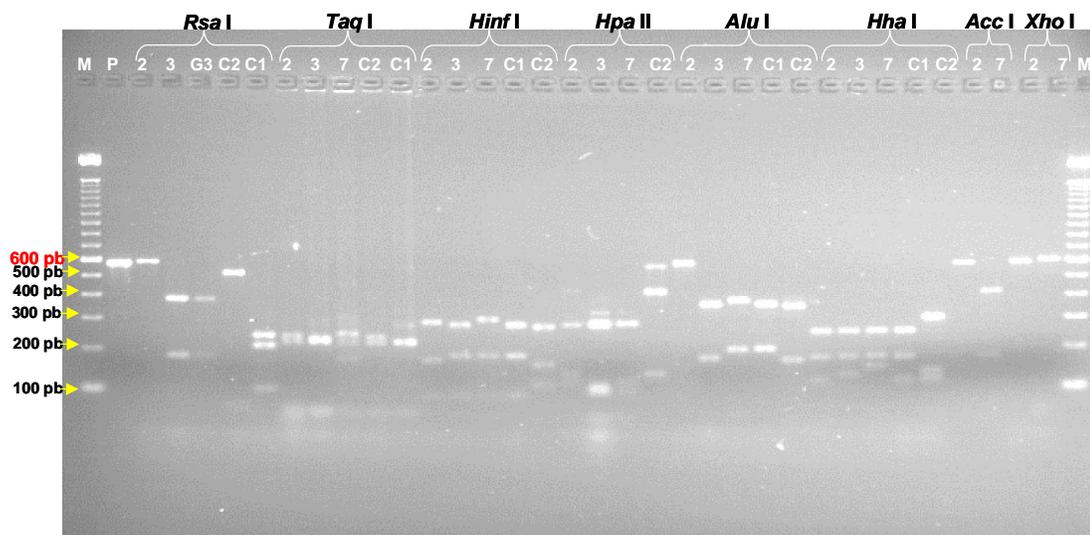


Figura 2 - Digestão dos produtos de amplificação gerados com um par de iniciadores ITS1/ITS4 com diferentes endonucleases de restrição (M – ladder 100 pb e P – padrão utilizado do fragmento original do PCR).

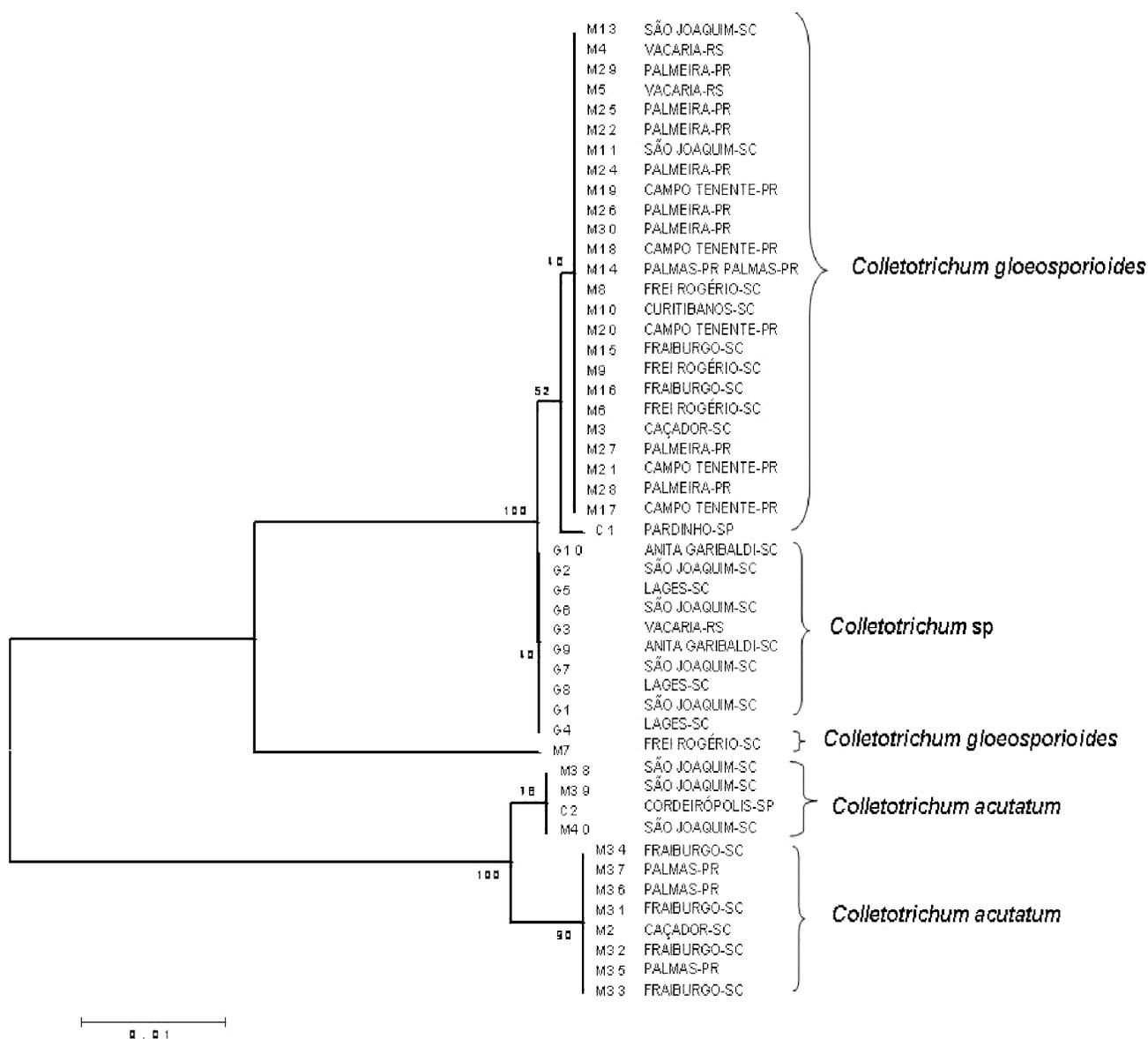


Figura 3 - Árvore filogenética construída pelo software Mega 3.1 a partir de seqüências da região ITS do rDNA, utilizando o método *Neighbor-Joining*. Uma análise de *bootstrap* foi feita com 10.000 repetições.

aqui apresentados não teve eficiência na separação dos isolados de *Colletotrichum*.

CONCLUSÕES

A técnica de PCR-RFLP não se mostrou eficiente na diferenciação das espécies de *Colletotrichum* spp, provavelmente pela atuação inadequada das enzimas de restrição, que são parte fundamental em análises filogenéticas.

A técnica do sequenciamento possibilitou a

separação filogenética eficiente das espécies dos isolados de *Colletotrichum* spp, vinculados a doença mancha da gala em macieira.

Apesar da técnica de PCR-RFLP ser considerada mais rápida, econômica e de segurança, deve-se associá-la com a técnica de sequenciamento para maior precisão nos resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BUDDIE, A.G. et al. Molecular characterization of *Colletotrichum* strains derived from strawberry. **Mycological Research**, London, v.103, p. 385-394, 1999.
- CULEBRAS, P. V. M. et al. Phylogenetic Relationships Among *Colletotrichum* Pathogens of Strawberry and Design of PCR Primers for their Identification. **Phytopathology**, St. Paul, v.151, p. 135-143, 2003.
- CRUZ, C. D. Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 1997.
- DESTÉFANO, R. H. R. **Deteção e identificação de *Metarhizium anisopliai* em larvas de *Diatraea saccharales* por primer específicos.** 2003. 72 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, St. Paul, v.82, p.596-604, 1998.
- FREEMAN, S. et al. Genetic Diversity Within *Colletotrichum acutatum sensu* Simmonds. **Phytopathology**, St. Paul, v.91, p. 586-592, 2001.
- GARCIA, F. C. B. et al. Métodos subsidiários para o diagnóstico da Leishmaniose tegumentar americana (LTA): comparação dos resultados do seqüenciamento de DNA e da PCR-RFLP para determinação da espécie de *Leishmania* em amostras cutâneo-mucosas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2005.p. 339-344.
- GOMES, E. A., et al. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v..25, p.477-483, 2002.
- JUNGHANS, D. T. et al. Genetic diversity of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* based on RAPD-PCR analysis. **Mycorrhiza**, Berlin, p.243–248, 1998.
- LEE, B.S.; TAYLOR, J.W. Phylogeny of Five Fungus-like Protoctistan *Phytophthora* Species, Inferred from the Internal Transcribed Spacers of Ribosomal DNA. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v.9, p.636-653, 1992.
- MAKI, C. S. **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau (*Theobroma cacao* L.).** 2006. 127 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MARTINS, M. K. **Variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp e estudo da interação com a planta hospedeira.** 2005. 110 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- NAVAJAS, M. et al. Sequence variation of ribosomal internal transcribed spacers (ITS) in commercially important Phytoseiidae mites. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdã, p.851-859, 1999.
- NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **National Academy of Sciences of the United States of America Proceedings**, Washington, v. 76, p. 5269-5273, 1979.
- RABELLO, A. R. **Diferenciação de biótipos de *Bemisia tabaci* utilizando PCR-RFLP e seqüenciamento da região ITS do rDNA.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnológicos, 2005. 25 p. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento.
- SAHA, T. et al. Identification of *Colletotrichum acutatum* from rubber using random amplified polymorphic DNAs and ribosomal DNA polymorphisms. **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, p. 215-221, 2002.
- SAITON, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**. Oxford, v.4, p.406-425, 1987.
- SARTORI, D. **Marcadores moleculares para detecção de espécies de *Aspergillus* produtoras de ocratoxina A em grãos de café.** 2005. 97 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Paraná.
- SCHÄFER, C., WÖSTEMEYER, J. Random primer dependent PCR differentiates aggressive from non-aggressive isolates of the oilseed rape pathogen *Phoma lingam* (*Leptosphaeria maculans*). **Phytopathology**, St. Paul, v.136, p.124-136, 1992.

- SCHNABEL, G.; SCHNABEL, E. L.; JONES, A. L. Characterization of Ribosomal DNA from *Venturia inaequalis* and Its Phylogenetic Relationship to rDNA from Other Tree-Fruit *Venturia* Species. **Phytopathology**, St. Paul, v.89, p. 100-108, 1999.
- SERRA, I. M. de S.; SILVA, G. S. Caracterização morfofisiológica de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* agente de antracnose em frutíferas no Maranhão. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.30, p. 475-480, 2004.
- STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N. G. **Aplicação e evolução dos métodos moleculares para o estudo da biodiversidade do rizóbio**. Seropédica/RJ, Embrapa Agrobiologia, 1999. 58p. Boletim Técnico.
- SOBRAL, J. K. **A comunidade bacteriana endofítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófitos-planta**. 2003. 174 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v.10, p. 512-526, 1993.
- TASSA, S. O. M. El.; DUARTE, V. Identificação de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* através de PCR-RFLP do Gene *recA*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, p. 23-28, 2006.
- UENO, M.; JORGE, A. O. C. Comparação de Técnicas Moleculares de Análise de DNA Cromossomal de *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina. **Revista de Biociências**, Taubaté, SP, v.8, p. 1-9, 2002.
- WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In. INNIS, M. A. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. Academic Press, San Diego, 1990, p. 315-322.