

## Estimativa da Diversidade Genética de *Colletotrichum graminicola* com Marcadores ISSR

Douglas F. Parreira,<sup>1</sup> Laércio Zambolim<sup>1</sup>; Eliane A. Gomes<sup>2</sup>; Rodrigo V. Costa<sup>2</sup>; Dagma D. Silva<sup>2</sup>; Luciano V. Cota<sup>2</sup>; Ubiraci G. P. Lana<sup>2</sup> e Emanuelle C. F. Silva<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Viçosa CEP 36570-000, Viçosa, MG, E-mail: douglas2002ufv@yahoo.com.br. <sup>2</sup>Embrapa Milho e Sorgo, C.P.151, CEP 35701-970, Sete Lagoas, MG.

Palavras-chave: antracnose, *Colletotrichum*, ISSR.

### Introdução

O gênero *Colletotrichum* agrupa alguns dos patógenos mais importantes na agricultura, em virtude das perdas potenciais que podem causar, sendo primordial a capacidade de diagnóstico desta doença. Em milho, a antracnose causada por *C. graminicola*, destaca-se como uma das principais doenças da cultura (BERGSTROM; NICHOLSON, 1999; COSTA et al., 2008), uma vez que o patógeno é capaz de infectar praticamente toda a planta. Na fase foliar, a doença caracteriza-se pela presença de lesões de formas variadas e necróticas, podendo ocorrer extensa queima das folhas. Nas nervuras, é comum a presença de lesões elípticas com acérvulos do patógeno. A fase de podridão de colmo é caracterizada pela formação, na casca, de lesões estreitas e elípticas, as quais tornam-se, posteriormente, marrom-escuras a negras e pela formação de acérvulos do patógeno. Estimativas dos efeitos da antracnose foliar e podridão de colmo na produção de grãos de milho variam de 0 a 40%, dependendo da cultivar, das condições ambientais, da época de ocorrência das epidemias e da ocorrência de outras pragas (PERKINS; HOOKER, 1979; COTA et al., 2009).

A principal medida de manejo da antracnose do milho é o uso de cultivares resistentes. Para o sucesso do uso da resistência genética, é importante o conhecimento da diversidade genética da população do patógeno, assim como a correta identificação da espécie ou da raça predominante na população. Alguns problemas de ordem taxonômica têm sido resolvidos através do uso de ferramentas moleculares, pois, para este grupo, os critérios taxonômicos geralmente se sobrepõem, tendo ainda algumas espécies uma ampla gama de hospedeiros e, dentre esses hospedeiros, alguns são infectáveis por mais de uma espécie de *Colletotrichum* (CROUCH; BEIRN, 2009; HYDE et al., 2009b). Estudos realizados com espécies de *Colletotrichum* possuidoras de conídios falciformes, utilizando os genes DNA liase (*Apn2*), *mating type* (*Mat1*), manganês superóxido desmutase (*Sod2*) e espaçadores ITS (espaçador transcrito interno do DNA ribossômico) conseguiram separar as espécies levando em conta alguns caracteres taxonômicos como dimensões e tamanho do apressório (CROUCH et al., 2006; CAI et al., 2009; CROUCH et al., 2009b). Outro fator importante é a presença de sequências erroneamente depositadas no *GenBank*, sendo considerado que, para fungos, mais de 20% das sequências depositadas podem estar comprometidas (BIDARTONDO et al., 2008), o que pode ser remediado nos trabalhos de filogenia com o uso de isolados tipo, provenientes de coleções de culturas internacionais (CAI et al., 2009; CROUCH et al., 2009a; HYDE et al., 2009a).



O uso de marcadores moleculares se encontra bem difundido, existindo uma grande demanda quanto aos marcadores baseados nas reações de PCR devido à simplicidade e à necessidade de pequenas quantidades de DNA da amostra. Os marcadores ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) são amplificados via PCR e não necessitam do sequenciamento da região, resultando ainda na obtenção de padrões altamente polimórficos (NAGAOKA; OGIHARA, 1997). Além disso, são dominantes, podendo gerar um grande número de alelos reproduzíveis e altamente polimórficos utilizando um *primer* complementar a um microssatélite alvo. No trabalho realizado por Nghia et al. (2008), além de marcadores ISSR, foram utilizados outros caracteres como morfologia de colônia e dos conídios nos estudos de isolados de *Corynespora cassiicola* provenientes de plantios de seringueira (*Hevea brasiliensis*) na Malásia. Neste trabalho, os autores concluíram que apenas os caracteres morfológicos não seriam suficientes para diferenciar os isolados de *C. cassiicola*. Esses e outros trabalhos têm demonstrado o crescente uso destes marcadores sozinhos ou em conjunto com outras ferramentas no estudo da variabilidade dos fungos.

Considerando a inexistência de informações na literatura sobre o uso de marcadores ISSR para o fungo *C. graminicola* e o potencial do marcador para estudo da diversidade do patógeno, o objetivo deste trabalho é estimar a diversidade genética de populações de *C. graminicola* por meio de marcadores moleculares ISSR. Os objetivos específicos são avaliar o nível de variação de ISSRs entre isolados de *C. graminicola* provenientes de diferentes regiões e entre o material utilizado para o isolamento (colmo, folha e nervura).

## Material e Métodos

### Obtenção dos isolados monospóricos de *C. graminicola*

Foram coletadas amostras de fragmentos de colmo, folhas e nervura com sintomas típicos de antracnose, provenientes dos estados de Goiás, Minas Gerais, Santa Catarina, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul. Para obtenção dos isolados monospóricos de *C. graminicola*, as amostras foram desinfestadas durante dois minutos em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% e transferidos para placas de Petri contendo meio de farinha de aveia-ágar-tetraciclina (FAAT) (aveia: 60 g/L, ágar: 20 g/L, tetraciclina: 300 mg/100 mL). As placas foram mantidas em condição de luz fluorescente intermitente a  $\pm 25^{\circ}\text{C}$ , durante sete a oito dias, para induzir a esporulação do patógeno. Após a esporulação, os conídios foram colhidos, adicionando-se, aproximadamente, 10 mL de água estéril em cada placa, seguindo-se uma raspagem superficial para sua liberação.

A partir das suspensões originais, foram realizadas diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ , para obtenção de suspensões de esporos com a concentração de 50-100 conídios/mL. Um mililitro dessa suspensão foi transferido para placas de Petri contendo meio ágar-água a 2%, sendo mantidas em câmaras de crescimento sob luz fluorescente intermitente a  $25^{\circ}\text{C}$  durante 12 horas, para induzir a germinação dos conídios. Conídios germinados foram retirados individualmente do meio ágar-água, sob microscópio óptico e examinados individualmente para a verificação da presença de outros esporos. Confirmada a presença de um único conídio, este foi transferido para tubo de ensaio contendo o meio FAAT. Após o desenvolvimento das culturas nos tubos de ensaio, foram adicionados 10 mL de óleo mineral estéril para preservação das culturas.

### Obtenção de massa micelial de *C. graminicola*

Para a obtenção de massa micelial de *C. graminicola*, 144 isolados monospóricos de *C. graminicola* foram transferidos para placas de Petri contendo meio FAAT e mantidos a



25°C por 7 dias. Fragmentos de micélio foram transferidos para Erlenmeyers contendo 100 mL de meio líquido YES (10 g/L de sacarose, 6g/L de extrato de levedura e 6g/L de caseína) previamente esterilizado, adicionado de 1mL dos antibióticos estreptomicina e tetraciclina (0,300 mg/mL). Os frascos foram mantidos em agitador a 90 rpm a 28°C por 72 horas. A massa micelial foi filtrada em duas camadas de gaze esterilizada, e em seguida em papel de filtro esterilizado. As amostras de micélio foram armazenadas em freezer a -20°C, envoltas por papel alumínio até o momento da extração do DNA.

### Extração de DNA genômico

Utilizou-se a metodologia de extração de DNA descrita por Saghai-Marroof et al., (1984), modificada. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido até obtenção de um pó fino e adicionados 350 µL de tampão CTAB [2 % (m/v) CTAB; 0,2 M Tris- HCl (pH 7,5); 1,4 M NaCl; 0,02 M EDTA (pH 8,0); 2 % (v/v) 2-mercaptoetanol]. A mistura foi mantida em banho-maria a 65°C durante uma hora. Após resfriamento por 5 minutos em condição ambiente, promoveu-se a lavagem com igual volume de solução de clorofórmio-octanol (24:1 v/v), com homogeneização constante por 20 minutos. O material foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante transferido para novo microtubo, onde foram adicionados 300 µL de isopropanol mantido a -20°C por, no mínimo, uma hora. Os microtubos foram levados à centrífuga e o material contido neles centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com 140 µL de etanol 70% (v/v) gelado. Os tubos foram novamente levados à centrífuga por 10 minutos a uma rotação de 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o etanol residual seco em estufa a 65°C por cinco minutos. Os DNAs precipitados foram ressuspensos em 50 µL de tampão TE contendo de RNase A (10 mM Tris- HCl; 1 mM EDTA, pH 8,0; 0,1 µg/µL RNase A). A concentração das amostras foi quantificada em espectrofotômetro Nanodrop e ajustada para 10 ng/µL, diluindo-se o DNA estoque em água ultrapura. O DNA foi armazenado a -20°C até o momento da amplificação.

### Amplificação do DNA

Foi realizada uma pré-seleção dos *primers*, primeiramente utilizando 16 *primers* ISSR: AAC, GACA, CGA, ACA, CCA, GT, CAC, ACTG, GTG, GCGT, CTCGC, AGTC, GAGG, GAAT, AAG e TGGT, sendo escolhidos os nove que resultaram em um maior polimorfismo AAC, GACA, ACA, GT, ACTG, CTCGC, GAGG, GAAT e AAG. As reações de amplificação por PCR foram preparadas em um volume final de 20µL, consistindo de 3µL de DNA (10ng/µL); 20 mM Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM KCl; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,125 mM dNTPs e 0,5 µM de cada *primer*. Os ciclos de amplificação foram: 94°C por 2 minutos, 94°C por 1 minuto, 45°C por um minuto, 72°C por dois minutos. Sendo este último ciclo repetido 35 vezes, seguido por um ciclo de 72°C por 10 minutos, mantendo as reações a 10°C até a retirada da amostra. Todas as amplificações foram realizadas em termociclador Applied Biosystems - PCR System 9700. Às reações foram adicionados 4 µL de corante, sendo essas submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v) a 100 V durante uma hora e trinta minutos em tampão TAE (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA, pH 8,0). Em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1µg/mL) por 20 minutos, descorado em água por 5 minutos, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento Kodak - Gel logic 200.

### Análise dos dados



Os fragmentos de DNA gerados pelas análises de ISSR foram avaliados mediante inspeção visual dos géis. Bandas de mesmo peso molecular, em indivíduos diferentes, foram consideradas idênticas e designadas em função da ausência (0) e presença (1) no gel e nos casos de amostra degradada ou ausência de amplificação as amostras foram classificadas como indeterminadas (?). Os dados foram analisados empregando o programa Statistica 7. Foi produzido um dendrograma pelo método de ligação UPGA (Unweighted Pair Group Average), utilizando como medida de distância o percentual de dissimilaridade (percent disagreement).

## Resultados e Discussão

Neste trabalho foi obtida uma coleção de 144 isolados monospóricos de *C. graminicola*, devidamente identificados (Tabela 1). Os nove *primers* ISSR amplificaram de forma consistente o DNA dos 144 isolados, produzindo um total de 66 bandas polimórficas, com média de 49 bandas amplificadas por isolado. O *primer* que resultou em maior número de bandas amplificadas foi GT com 15 bandas e aquele com menor número foi GACA com apenas três bandas, sendo a média de 7,33 bandas por *primer*. Um exemplo de um perfil de bandas gerado por PCR utilizando ACTG é mostrado na Figura 1. Na análise do dendrograma, foi traçada uma linha divisória no valor da distância genética de 0,375 dividindo os isolados em 13 grupos (Figura 2). Baseado na análise dos dados, a relação entre distância genética e distância geográfica não foi significativa, o mesmo ocorrendo em relação à parte da planta utilizada no isolamento de *C. graminicola*, colmo, folha e nervura. O primeiro grupo agregou 112 isolados pertencentes aos estados de GO, MG, PA, RS, SC e SP; o segundo grupo, 13 isolados de GO, MG, PR e SC; e o terceiro grupo, três isolados de MG e PR. Os grupos quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze e treze apresentaram 1 (MG), 4 (MG e PR), 1 (MG), 1 (MG), 1 (GO), 1 (RS), 2 (GO e PR), 3 (MG e PR), 1 (MG) e 1 (MG) isolados, respectivamente. Os isolados com maior similaridade foram os isolados 35 e 36 com menor distância genética (0,02), sendo os dois isolados da cidade de Passo Fundo (RS). Entre os seis estados, Minas Gerais foi o estado que apresentou maior variabilidade, com isolados presentes na maioria dos grupos e maiores distâncias genéticas.

Um dos primeiros estudos da diversidade de *C. graminicola* foi realizado por Forgey et al. (1978), utilizando dez isolados e dez progênies de milho que, baseados nos resultados do teste de inoculação cruzada onde cada um dos isolados foi inoculado nas dez progênies de milho, propuseram a ocorrência de 8 raças fisiológicas. Posteriormente, Nicholson e Warren, (1981), utilizando sete dos dez isolados empregados no trabalho de Forgey et al. (1978), contestaram a presença de raças, atribuindo a diferença quanto a sintomatologia ao fato dos autores não terem padronizado os inóculos no experimento. Ratanacherdchai et al. (2010) trabalharam com variabilidade de *C. gloeosporioides* e *C. capsici* com três genótipos de pimenta utilizando marcadores ISSR. O dendrograma obtido correlacionou os isolados quanto a sua origem geográfica, propondo assim o uso de marcadores ISSR no estudo da diversidade genética em *Colletotrichum* spp., afirmando ainda que tais técnicas ajudam no estudo da dinâmica populacional do patógeno permitindo estratégias de controle com uma melhor eficiência.

Neste trabalho foi encontrada uma grande variabilidade entre os isolados, corroborando as inferências sobre a variabilidade de *C. graminicola* proposta por Bergstrom e Nicholson (1999). A alta variabilidade detectada é um indicativo e alerta para a utilização de cultivares resistentes. Sendo assim, existe uma alta probabilidade do patógeno suplantará genes de resistência e a necessidade de utilização de rotação ou mistura de cultivares para aumentar a vida útil das cultivares resistentes. A ausência de relação entre distância genética e distância



geográfica é um forte indicativo da ocorrência de fluxo gênico entre as populações de *C. graminicola*. O fluxo gênico entre as populações do patógeno é facilitado pelo plantio de milho praticamente o ano inteiro (safra e safrinha) e o plantio de milho em praticamente todos os estados brasileiros.

A variabilidade genética é uma condição presente em patossistemas silvestres preservados e é aumentada em agroecossistemas. A alteração dos cultivos por meio do melhoramento, a ampliação de fronteiras agrícolas e o uso desmedido de defensivos sistêmicos são fatores que aumentam a força da seleção exercida sobre as populações de patógenos, favorecendo novos genes de virulência e o polimorfismo na estrutura dessas populações (ARAYA, 2003).

### Conclusões

1. Marcadores ISSR são eficientes na determinação da variabilidade de *C. graminicola*.
2. A variabilidade genética de *C. graminicola* é alta.
3. Os isolados de *C. graminicola* utilizados no presente trabalho não apresentam estruturação geográfica no Brasil.
4. Os isolados de *C. graminicola* utilizados no presente trabalho não apresentam estruturação em relação à parte da planta utilizada na obtenção do isolado.

### Referências

ARAYA, C. M. Coevolución de interacciones hospedante-patógeno en frijol común. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 221-228, 2003.

BERGSTROM, G. C.; NICHOLSON, R. L. The biology of corn anthracnose: knowledge to exploit for improved management. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, p. 596-608, 1999.

BIDARTONDO, M. I. Preserving accuracy in GenBank. **Science**, Washington, v. 319, n. 5870, p. 1616a, 2008.

BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 19, p. 209-215, 2001.

CAI, L.; HYDE, K. D.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B. S.; WALLER, J.; ABANG, M. M.; ZHANG, J. Z.; YANG, Y. L.; PHOULIVONG, S.; LIU, Z. Y.; PRIHASTUTI, H.; SHIVAS, R. G.; MCKENZIE, E. H. C.; JOHNSTON, P. R. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 183-204, 2009.

COSTA, R. V. da; FERREIRA, A. da S.; CASELA, C. R.; SILVA, D. D. da. **Podridões fúngicas de colmo na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. 7 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 100).

COTA, L. V.; COSTA, R. V. da; CASELA, C. R.; LANZA, F. E. **Efeito da podridão de colmo, causada por *Colletotrichum graminicola*, na produção da cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. 5 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 120).





CROUCH, J. A.; BEIRN, L. A. Anthracnose of cereals and grasses. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 19-44, 2009.

CROUCH, J. A.; CLARKE, B. B.; HILLMAN, B. I. Unraveling evolutionary relationships among the divergent lineages of *Colletotrichum* causing anthracnose disease in turfgrass and corn. **Phytopathology**, St. Paul, v. 96, p. 46-60, 2006.

CROUCH, J. A.; CLARKE, B. B.; HILLMAN, B. I. What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematics and species diagnosis? A case study using the falcate-spored, graminicolous *Colletotrichum* group. **Mycologia**, New York, v. 101, p. 648-656, 2009a.

CROUCH, J. A.; CLARKE, B. B.; WHITE, J. F.; HILLMAN, B. I. Systematic analysis of the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* and a description of six new species of the fungus from warm season grasses. **Mycologia**, New York, v. 101, p. 717-732, 2009b.

FORGEY, W. M.; BLANCO, M. H.; LOEGERING, W. Q. Differences in pathological capabilities and host specificity of *Colletotrichum graminicola* on *Zea mays*. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, v. 62, p. 573-576, 1978.

HYDE, K. D.; CAI, L.; CANNON, P. F.; CROUCH, J. A.; CROUS, P. W.; DAMM, U.; GOODWIN, P. H.; CHEN, H.; JOHNSTON, P. R.; JONES, E. B. G.; LIU, Z. Y.; MCKENZIE, E. H. C.; MORIWAKI, J.; NOIREUNG, P.; PENNYCOOK, S. R.; PFENNING, L. H.; PRIHASTUTI, H.; SATO, T.; SHIVAS, R. G.; TAN, Y. P.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B. S.; YANG, Y. L.; ZHANG, J. Z. *Colletotrichum*: names in current use. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 147-182, 2009a.

HYDE, K. D.; CAI, L.; MCKENZIE, E. H. C.; YANG, Y. L.; ZHANG, J. Z.; PRIHASTUTI, H. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. **Fungal Diversity**, v. 39, p 1-17, 2009b.

NAGAOKA, T.; OGIHARA Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 94, p. 597-602, 1997.

NGHIA, N. A.; KADIR, J.; SUNDERASAN, E.; ABDULLAH, M. P.; MALIK, A.; NAPIS, S. Morphological and Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers analyses of *Corynespora cassiicola* isolates from rubber plantations in Malaysia. **Mycopathologia**, The Hague, v. 166, p. 189-201, 2008.

NICHOLSON, R. L.; WARREN, H. L. The issue of races of *Colletotrichum graminicola* pathogenic to corn. **Plant Disease**, St. Paul, v. 65, p. 143-145, 1981.

PERKINS, J. M.; HOOKER A. L. Effects of anthracnose stalk rot on corn yields in Illinois. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, v. 63, p. 26-30, 1979.

RATANACHERDCHAI, K.; WANG, H. K.; LIN, F. C.; KASEM SOYTONG, K. ISSR for comparison of cross-inoculation potential of *Colletotrichum capsici* causing chilli anthracnose. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, p. 76-83, 2010.



SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Population Biology**, v. 81, p. 8014-8018, 1984.



Tabela 1. Relação dos isolados utilizados no trabalho, seguindo a ordem presente no dendrograma, da esquerda para a direita, com descrição do número do isolado, parte da planta utilizada para o isolamento (folha-F, colmo-C, nervura-N e indeterminado-?), local de coleta e grupo do isolado baseado no UPGA

UPGA	ISOLADO	MAT./ISOLAM.	ESTADO	CIDADE	GRUPO	UPGA	ISOLADO	MAT./ISOLAM.	ESTADO	CIDADE	GRUPO
1	29.08	F	GO	CRISTALINA	1	73	56.09	F	MG	INDIANÓPOLIS	1
2	1.09	C	PR	CAMPO MOURÃO	1	74	74.09	N	SC	XAPECÓ	1
3	57.09	F	MG	SETE LAGOAS	1	75	107.07	C	SC	XAPECÓ	1
4	2.09	F	PR	CAMPO MOURÃO	1	76	79.07	C	MG	SETE LAGOAS	1
5	40.08	F	MG	SETE LAGOAS	1	77	80.07	C	MG	SETE LAGOAS	1
6	47.09	F	PR	CAMPO MOURÃO	1	78	72.07	C	MG	SETE LAGOAS	1
7	2.04	?	MG	SETE LAGOAS	1	79	92.07	C	MG	SETE LAGOAS	1
8	25.05	?	MG	SETE LAGOAS	1	80	61.07	C	MG	SETE LAGOAS	1
9	3.04	?	MG	SETE LAGOAS	1	81	31.09	F	MG	SETE LAGOAS	1
10	71.09	N	PR	LONDRINA	1	82	86.07	C	MG	SETE LAGOAS	1
11	108.07	C	PR	LONDRINA	1	83	9.04	?	PR	CAMPO MOURÃO	1
12	66.09	N	PR	CAMPO MOURÃO	1	84	18.05	?	MG	SÃO SEBASTIÃO DO PARAÍSO	1
13	55.09	C	MG	SETE LAGOAS	1	85	7.04	?	PR	CAMPO MOURÃO	1
14	20.09	F	PR	CAMPO MOURÃO	1	86	58.09	F	RS	PASSO FUNDO	1
15	4.09	F	MG	SETE LAGOAS	1	87	17.04	?	MG	SETE LAGOAS	1
16	3.07	?	PR	CAMPO MOURÃO	1	88	48.08	F	PR	CAMPO MOURÃO	1
17	103.09	N	PR	CAMPO MOURÃO	1	89	47.08	F	MG	SETE LAGOAS	1
18	76.07	C	MG	SETE LAGOAS	1	90	19.08	F	PR	CAMPO MOURÃO	1
19	23.04	?	MG	SETE LAGOAS	1	91	21.08	F	MG	INDIANÓPOLIS	1
20	14.09	F	PR	LONDRINA	1	92	73.09	N	PR	CAMPO MOURÃO	1
21	23.09	F	PR	LONDRINA	1	93	36.04	?	PR	LONDRINA	1
22	4.06	?	PR	CAMPO MOURÃO	1	94	64.07	C	PR	PONTA GROSSA	1
23	69.09	N	PR	CAMPO MOURÃO	1	95	60.07	?	MG	SETE LAGOAS	1
24	59.09	F	SC	XANXERÊ	1	96	23.07	N	PR	CASCADEL	1
25	27.07	F	PR	LONDRINA	1	97	11.07	C	PR	CAMPO MOURÃO	1
26	55.07	?	PR	LONDRINA	1	98	33.07	?	PR	CASCADEL	1
27	5.07	?	PR	CAMPO MOURÃO	1	99	21.07	N	MG	SETE LAGOAS	1
28	1.05	?	MG	UBERABA	1	100	87.07	C	MG	SETE LAGOAS	1
29	98.09	N	GO	GOIANÉSIA	1	101	6.07	?	MG	INDIANÓPOLIS	1
30	66.07	C	MG	SETE LAGOAS	1	102	5.06	?	MG	UBERABA	1
31	2.06	?	MG	SETE LAGOAS	1	103	18.04	?	SC	XAPECÓ	1
32	37.04	?	MG	SETE LAGOAS	1	104	1.08	C	PR	CAMPO MOURÃO	1
33	48.09	F	MG	SETE LAGOAS	1	105	20.07	?	PR	CAMPO MOURÃO	1
34	39.09	F	RS	PASSO FUNDO	1	106	1.06	?	PR	CAMPO MOURÃO	1
35	27.08	F	RS	PASSO FUNDO	1	107	67.07	C	PR	LONDRINA	1
36	12.09	F	RS	PASSO FUNDO	1	108	91.07	C	PR	CAMPO MOURÃO	1
37	17.09	F	SC	XAPECÓ	1	109	46.07	?	PR	CAMPO MOURÃO	1
38	10.09	F	MG	SETE LAGOAS	1	110	44.07	?	MG	SETE LAGOAS	1
39	34.09	F	PR	LONDRINA	1	111	41.07	?	PR	CAMPO MOURÃO	1
40	33.09	F	MG	SETE LAGOAS	1	112	68.07	C	PR	CASCADEL	1
41	32.09	F	MG	SETE LAGOAS	1	113	88.07	C	SP	COLÔMBIA	2
42	93.07	C	PR	CAMPO MOURÃO	1	114	85.07	C	PR	CAMPO MOURÃO	2
43	2.07	F	MG	UBERLÂNDIA	1	115	84.07	C	MG	SETE LAGOAS	2
44	99.09	N	MG	UBERABA	1	116	54.07	?	MG	INDIANÓPOLIS	2
45	23.08	F	MG	SETE LAGOAS	1	117	1.07	N	MG	SETE LAGOAS	2
46	74.07	C	MG	UBERLÂNDIA	1	118	16.05	?	MG	UBERABA	2
47	51.09	C	PR	CAMPO MOURÃO	1	119	16.04	?	GO	GOIANÉSIA	2
48	44.09	F	MG	SETE LAGOAS	1	120	15.04	?	MG	UBERLÂNDIA	2
49	46.09	F	MG	UBERLÂNDIA	1	121	14.04	?	PR	PONTA GROSSA	2
50	8.08	F	GO	GOIANÉSIA	1	122	22.09	F	MG	SÃO SEBASTIÃO DO PARAÍSO	2
51	27.04	?	MG	SETE LAGOAS	1	123	15.09	F	MG	CONQUISTA	2
52	21.05	?	SP	COLÔMBIA	1	124	11.09	F	PR	CAMPO MOURÃO	2
53	21.04	?	MG	SÃO SEBASTIÃO DO PARAÍSO	1	125	7.09	F	PR	CAMPO MOURÃO	2
54	100.09	N	MG	SETE LAGOAS	1	126	44.08	F	PR	CAMPO MOURÃO	3
55	29.09	F	MG	SETE LAGOAS	1	127	42.08	F	MG	SETE LAGOAS	3
56	73.07	C	MG	SETE LAGOAS	1	128	26.09	F	MG	INDIANÓPOLIS	3
57	18.09	F	MG	SETE LAGOAS	1	129	19.09	F	MG	UBERABA	4
58	89.07	C	PR	LONDRINA	1	130	45.08	F	MG	SETE LAGOAS	5
59	47.07	?	PR	PONTA GROSSA	1	131	25.09	F	PR	CAMPO MOURÃO	5
60	36.07	?	SC	XANXERÊ	1	132	26.08	F	PR	CASCADEL	5
61	72.09	N	PR	CAMPO MOURÃO	1	133	27.09	F	MG	SÃO SEBASTIÃO DO PARAÍSO	5
62	24.09	F	SC	XANXERÊ	1	134	9.09	F	MG	IRÁI DE MINAS	6
63	24.08	F	MG	SETE LAGOAS	1	135	8.09	F	MG	SÃO SEBASTIÃO DO PARAÍSO	7
64	37.08	F	PR	CAMPO MOURÃO	1	136	10.08	F	GO	CRISTALINA	8
65	46.08	F	MG	SETE LAGOAS	1	137	49.08	F	RS	PELOTAS	9
66	36.08	F	SC	XAPECÓ	1	138	22.08	F	GO	CRISTALINA	10
67	50.08	F	MG	SETE LAGOAS	1	139	16.09	F	PR	CASCADEL	10
68	3.09	F	MG	SETE LAGOAS	1	140	65.07	C	MG	SETE LAGOAS	11
69	38.08	F	MG	SETE LAGOAS	1	141	28.09	F	MG	SETE LAGOAS	11
70	97.07	F	MG	IRÁI DE MINAS	1	142	41.08	F	PR	PONTA GROSSA	11
71	96.07	F	MG	SÃO SEBASTIÃO DO PARAÍSO	1	143	21.09	F	MG	SETE LAGOAS	12
72	102.09	N	PR	PONTA GROSSA	1	144	1.04	?	MG	SETE LAGOAS	13





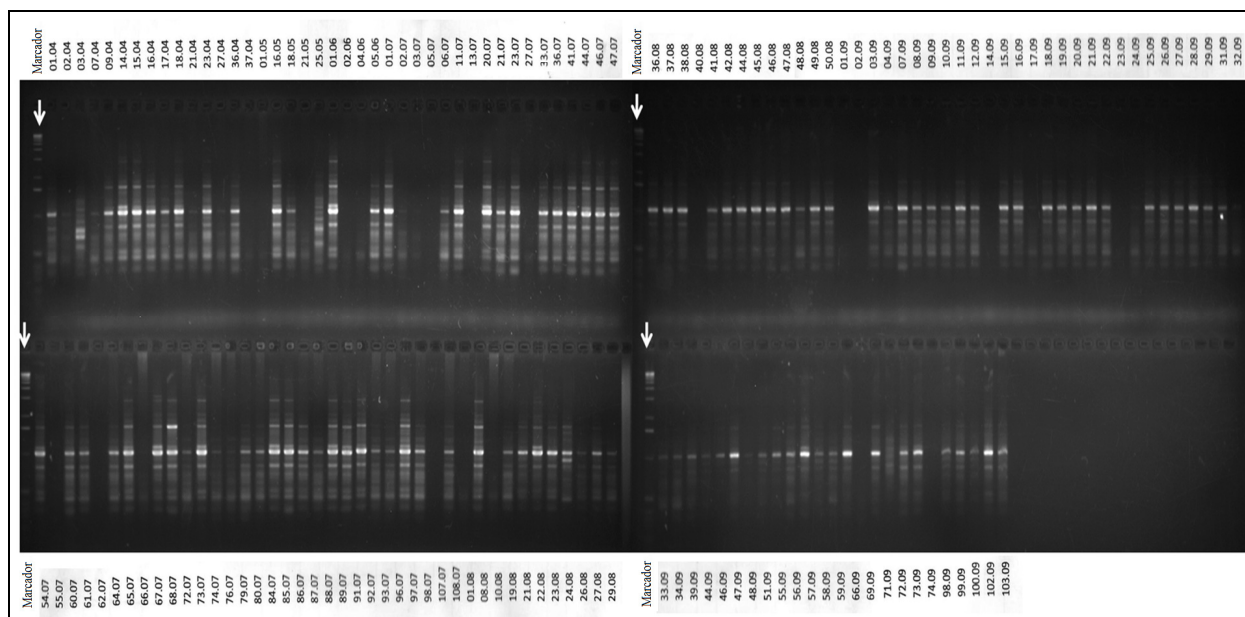


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos de DNA de 144 isolados de *C. graminicola* amplificados com o *primer* ACTG. Marcador M - 1 Kb ladder (setas brancas).

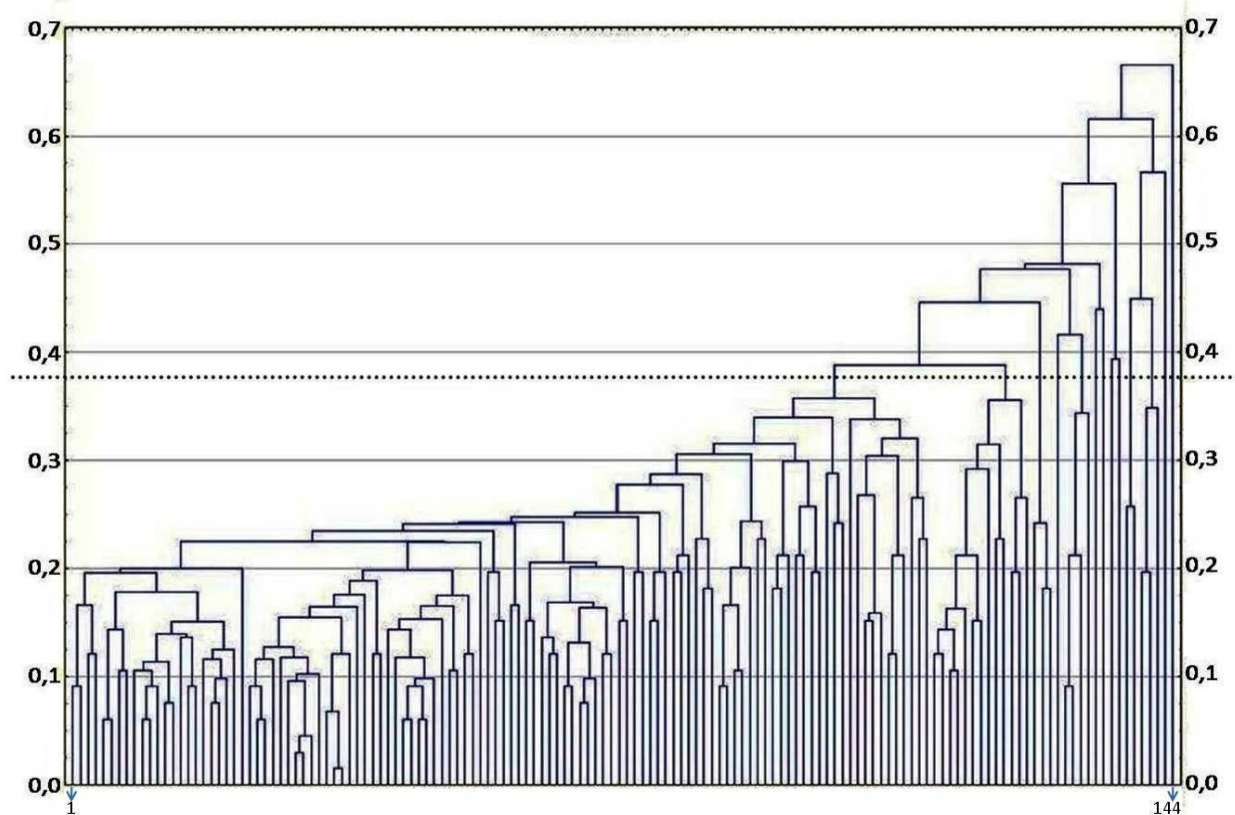


Figura 2. Dendrograma gerado pelo método UPGA, utilizando 66 bandas amplificadas pelos nove *primers* ISSR, detectadas em 144 isolados monospóricos de *C. graminicola*.

