



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**ESTRUTURA GENÉTICA E SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS
DE *Amphobotrys ricini*, AGENTE CAUSAL DO MOFO
CINZENTO DA MAMONEIRA.**

CÍNTIA DE SOUSA BEZERRA

NATAL-RN

2007



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**ESTRUTURA GENÉTICA E SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS
DE *Amphobotrys ricini*, AGENTE CAUSAL DO MOFO
CINZENTO DA MAMONEIRA.**

CÍNTIA DE SOUSA BEZERRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Centro de Bociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Dra. Márcia Soares Vidal - Embrapa Agrobiologia
Co-orientador: Dr. Nelson Dias Suassuna – Embrapa Algodão

NATAL-RN

2007

Agradecimentos

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho. A Deus, por tudo que tem me proporcionado, especialmente os últimos dois anos que não foram perfeitos, mas nos quais eu pude aprender muito.

A professora Dra. Márcia Soares Vidal pela orientação, amizade e confiança,

Ao Dr. Nelson Dias Suassuna pela co-orientação, apoio, oportunidade e amizade,

A secretária Leila por ser tão dedicada e prestativa;

Aos colegas da turma de pós-graduação Leonardo, Valeska, Vanessa, Cristiane, Givanilson, Thiago, Rodrigo, Jales, Ingrid, Viviane, Lorena, Lourena, Leonã e Mateus; pela amizade, troca de conhecimento e ajuda.

Aos professores do PPGGBM: Lucymara, Sílvia, Kátia, Wagner, Carlos, especialmente a Wagner e Carlos pelas sugestões para melhorara o trabalho;

A Embrapa Algodão, em especial aos pesquisadores Wirton Macedo Coutinho e Nair Castro Arriel pelas valiosas sugestões ao trabalho,

Aos colegas do laboratório de fitopatologia Clarice, Amanda, Fabíola, Jefersson, Pedro, Pollyne e Litervaldo pelas agradáveis e instrutivas conversas.

À minha família, minha avó Alice que tanto se importou comigo, ao meu tio Ulisses e tias Tatiana e Sônia;

A Thiago Vinícius pela companhia, amor e apoio por todo este tempo,

Aos meus pais e irmãs Lílian, Priscila, Natalia, Cindy e Izis

Aos laboratoristas Josenir (Josa), Juarez e Seu Chico.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo

RESUMO

O mofo cinzento, causado pelo fungo *Amphobotrys ricini*, é um dos principais problemas fitossanitários da cultura mamoneira. Esta doença causa prejuízos a cultura podendo levar à perda total da produção caso medidas de controle não sejam implementadas a tempo. A determinação da estrutura genética de populações de patógenos e o monitoramento sistemático das populações com o intuito de compreender a dinâmica de seus aspectos genéticos é importante para que programas de melhoramento visando a resistência durável tenham êxito. O controle químico do patógeno também é necessário, entretanto, não existem fungicidas registrados para o controle da doença. O objetivo deste trabalho foi determinar a variabilidade genética entre e dentro de subpopulações de *A. ricini* no estado da Paraíba, empregando marcadores moleculares do tipo RAPD e analisar a sensibilidade de isolados de *A. ricini* aos fungicidas carbendazim e azoxistrobina. Para a determinação da estrutura genética foram analisados 23 isolados de duas subpopulações (SPs), sendo a SP1 formada por isolados coletados nos municípios de Campina Grande, Lagoa Seca e Esperança e a SP2 com isolados oriundos dos municípios de Areia, Remígio, Solânea e Alagoa Nova. Amostras de DNA purificadas dos isolados foram submetidas a reações RAPD com 22 oligonucleotídeos da série OPERON, gerando 80 fragmentos polimórficos que foram analisados pelo programa PopGene. Para verificar a sensibilidade a fungicidas, 30 isolados de duas populações, sendo uma da Paraíba e outra de Alagoas foram testados contra o Carbendazim avaliando-se o crescimento micelial em meio V8 acrescido do fungicida nas dosagens 0, 0.01, 0.1, 1, 10 e 100 µg/ml; e azoxistrobina avaliando-se a germinação de esporos. Os dados foram analisados pelo procedimento PROBIT do pacote estatístico SAS que calculou a dosagem necessária para inibir 50% do crescimento micelial (DL_{50}). A diversidade genética total ($H_T=0,293$) é devida à diversidade genética dentro das SPs ($H_S=0,271$). O número de migrantes foi estimado em 6,15 indivíduos a cada geração entre as subpopulações. A fração da variação genética distribuída entre as subpopulações – G_{st} foi 0,075. Houve baixa diferenciação entre as subpopulações com base na média de identidade genética (Nei, 1973) entre as subpopulações em todos os locos analisados (0,9468). Os valores de DL_{50} variaram entre 0,026 e 0,316 µg/ml para carbendazim e 0,0036 e 0,168 µg/ml para azoxistrobina. Neste estudo, há evidências de que a estrutura genética da população de *A. ricini* no estado da Paraíba seja clonal e que há intensa migração e que os isolados da Paraíba e Alagoas são sensíveis a carbendazim e azoxistrobina.

ABSTRACT

The gray mold, causal organism *Amphobotrys ricini*, is one of the major diseases of castor bean. Difficulties in managing plant disease arises from the limited understanding of the genetic structure of *A. ricini*, their complexity and variability make it difficult to control. Genetic structure can be used to infer the relative impact of different forces that influence the evolution of pathogen populations, that allow to predict the potential for pathogen populations to involve in agricultural ecosystems. Growers protect their crop by applying fungicides, but there aren't fungicides to provide significant control of gray mold of castor bean. The objectives of this work were use RAPD to determine the genetic structure of *A. ricini* subpopulations in Paraíba and assay the sensitivity of *A. ricini* isolates to azoxystrobin and carbendazim. To determine the genetic structure of *A. ricini* subpopulations in Paraíba, 23 isolates were collected from two different geographic location (subpopulation). These isolates were analysed by RAPD using 22 random decamer primers, purchased from OPERON, produced a total of 80 markers polymorphics. The resulting matrixes were analysed using PopGene version 1.32. Sensitivity to azoxystrobin and carbendazim of 30 isolates, collected from Paraíba and Alagoas, was estimated based on spore germination and colony growth inhibition. The stock solutions were added to V8 medium after sterilization to produce final concentrations of 0, 0.01, 0.1, 1, 10, and 100 µg/ml of carbendazim and 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, and 10 µg/ml of azoxystrobin. All statistical analyses were performed using SAS to estimate the dose that inhibited fungal growth by 50% (ED₅₀ values). The genetic diversity within subpopulations ($H_s=0,271$) accounted for 92% of the total genetic diversity ($H_t=0,293$), while genetic diversity between subpopulations ($G_{st} = 0,075$) represented only 7,5%. The estimated number of migrants per generation (N_M) was 6,15. Nei's average gene identity across 80 RAPD loci was 0,9468. Individual ED₅₀ values, for the 30 isolates screened for their sensitivity to azoxystrobin, ranged from a maximum of 0,168 µg/ml to a minimum of 0,0036 µg/ml. The ED₅₀ values for carbendazim varied within the range of 0,026 to 0,316 µg/ml.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Isolados de <i>Amphobotrys ricini</i> coletados na Paraíba, com as coordenadas geográficas, cultivar do hospedeiro e número do isolado.....	24
Tabela 2 – Seqüência e conteúdo GC dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para análise de <i>A. ricini</i> por marcadores RAPD.....	28
Tabela 3 – Concentração de ingrediente ativo para inibir 50% (DL ₅₀) do crescimento micelial (carbendazim) ou germinação de esporos (azoxistrobina).....	31
Tabela 4 – Freqüência alélica de 80 locos RAPD na população total de <i>Amphobotrys ricini</i>	33
Tabela 5 – Freqüência alélica de 80 locos RAPD em duas subpopulações de <i>Amphobotrys ricini</i>	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Percentual de germinação de esporos de duas populações de <i>A. ricini</i> em diferentes concentrações do fungicida azoxistrobina.....	30
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

B.O.D. – Biological oxygen demand,
DL₅₀ – Dose letal capaz de inibir 50% do desenvolvimento do fungo,
DMSO – Dimetil sulfóxido,
DNA – Ácido desoxirribonucleotídico,
dNTP – desoxirribonucleotídeo trifosfatado,
GPS – Global position system,
G_{ST} – Diversidade genética interpopulacional,
H – Diversidade gênica ou heterozigosidade,
H_S – Diversidade genética intrapopulacional,
H_T – Diversidade genética total,
ICC – Inibição do crescimento da colônia,
J – Identidade gênica ou homozigosidade,
MgCl₂ – Cloreto de magnésio,
N_M – Número de migrantes,
Pop – População,
PopGene – Population genetic analysis
ppm – partes por milhão,
RAPD – Random amplified polymorphic DNA ou polimorfismo do DNA amplificado
ao acaso,
SAS – Statistical analysis system,
SDS – Dodecil sulfato de sódio,
SHAM – Ácido salicílico-hidroxâmico,
SP – Subpopulação,
TBE – Tris borato EDTA,
UFAL – Universidade Federal de Alagoas.

SUMÁRIO

Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Lista de tabelas	vi
Lista de figuras.....	vii
Lista de abreviaturas.....	viii
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. Mofo cinzento	13
2.1.1 Histórico e distribuição.....	13
2.1.2 Etiologia.....	14
2.1.3 Sintomatologia.....	15
2.1.4 Gama de hospedeiros.....	15
2.1.5 Manejo.....	15
2.2. Resistência a fungicidas.....	16
2.3. Estrutura genética de populações.....	17
2.4. Marcadores Moleculares	19
2.4.1. Classes de marcadores moleculares	20
2.4.1.1 Polimorfismo do DNA amplificado ao acaso – RAPD	20
3. OBJETIVOS	22
3.1. Objetivo geral	22
3.2. Objetivos específicos	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1. Coleta das Amostras	23
4.2. Isolamento e manutenção dos isolados	23
4.3. Ensaio de Resistência a Fungicidas.....	24
4.3.1. Teste preliminar para Germinação de esporos.....	24
4.3.2. Germinação de esporos.....	25
4.3.3. Crescimento micelial.....	25

4.3.4. Análise dos dados.....	26
4.4. Extração de DNA Genômico.....	26
4.5. Reação de RAPD	27
4.6. Análise dos dados.....	29
5. RESULTADOS	30
5.1. Resistência a fungicida	30
5.2. Reação RAPD	32
6. DISCUSSÃO	35
6.1. Variabilidade genética em isolados de <i>Amphobotrys ricini</i> por marcadores tipo RAPD	35
6.2. Resistência de <i>Amphobotrys ricini</i> a fungicida	37
7. CONCLUSÕES	39
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1. INTRODUÇÃO

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma planta com grande potencial econômico com mais de 400 utilidades. Das suas sementes é extraída a torta, utilizada como fertilizante e o óleo, seu principal produto, é tido como um dos mais versáteis da natureza (Santos *et al.*, 2001). Atualmente, o óleo de mamona é uma importante fonte de energia renovável, podendo ser associado ao diesel de petróleo para formar o biodiesel.

O cultivo da mamona está em expansão no Brasil, tanto no Cerrado, com cultivos mecanizados em grandes áreas, quanto no Nordeste brasileiro, com áreas menores e mão-de-obra familiar. A produtividade média no país teve incremento positivo entre as safras 2005 e 2006, com uma variação de 26,62% (IBGE, 2006) assumindo um importante papel sócio-econômico em algumas regiões do Brasil.

Os problemas fitossanitários relacionados à mamoneira têm sido pouco estudados, contrastando com sua importância atual. Apesar de ser considerada uma planta rústica, é susceptível a várias doenças, dentre as quais se destaca o mofo cinzento da mamoneira, causado pelo fungo *Amphobotrys ricini*, que afeta as inflorescências em todas as fases de seu desenvolvimento podendo causar perda total na produção de grãos.

O mofo cinzento pode ocorrer em praticamente todas as regiões produtoras de mamona no Brasil. Muito embora a tática mais aceitável de manejo da doença encontra-se baseada no emprego de cultivares resistentes, é de extrema importância conhecer alguns atributos inerentes ao patógeno, como variabilidade genética, modo de reprodução, compatibilidade vegetativa e resistência a fungicidas, de modo a implementar técnicas alternativas de manejo da doença, como uso de fungicidas e plantios em áreas desfavoráveis ao patógeno.

A pressão de seleção exercida por fungicidas específicos contribui para o estabelecimento de populações resistentes. A seleção e a recombinação são, do ponto de vista populacional, mecanismos evolutivos que tem implicações para o manejo de doenças por interferirem na predominância de indivíduos

resistentes a fungicidas (Reis *et al.*, 2006), portanto é necessário caracterizar populações para que se conheça seu potencial evolutivo (McDonald *et al.*, 2002).

O conhecimento da estrutura genética é um componente importante na compreensão da biologia populacional de fungos patogênicos. A caracterização morfológica dos isolados, embora útil, é bastante limitada devido ao 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. Atualmente, com a utilização de marcadores moleculares, que detectam polimorfismos de DNA, há um grande potencial para a diferenciação de indivíduos, em menor tempo e com maior precisão.

Nos últimos anos tem aumentado significativamente a aplicação de marcadores moleculares na detecção de variabilidade genética. As técnicas RAPD e AFLP estão sendo utilizadas com sucesso para analisar o genoma de várias espécies de fungos fitopatogênicos (Van der Lee *et al.*, 1997; Baayen *et al.*, 2000; Bock *et al.*, 2002; Silva-Mann *et al.*, 2002; Tooley *et al.*, 2002). Os marcadores RAPD, são dominantes e particularmente bem apropriados para estudos genéticos de fungos haplóides, porque não há perda da informação genética causada pela herança dominante (Moyano *et al.*, 2003).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. MOFO CINZENTO

2.1.1. Histórico e distribuição

A dimensão do problema causado pelo mofo cinzento pode ser visualizada pela investida dos Estados Unidos da América (EUA) no decorrer da Primeira Guerra Mundial em produzir óleo de mamona para uso como lubrificante em seu arsenal bélico, uma vez que a Índia, principal produtor, desviara toda sua produção para a Inglaterra. Em todo o cinturão sul dos EUA foi cultivado mamona e os resultados foram desastrosos devido às condições climáticas favoráveis ao patógeno (Godfrey, 1923).

O mofo cinzento da mamoneira, causado pelo fungo *Amphobotrys ricini* (Buchwald), foi observado pela primeira vez em 1918, infectando as partes florais e cápsulas de sementes de mamoneira nos Estados Unidos, particularmente no estado da Flórida, onde a cultura havia sido plantada em larga escala. Esta doença era nova em cultivos de mamoneira na América, e devido à grande capacidade de dispersão e destruição do patógeno, passou de algumas infecções primárias esporádicas para uma epidemia em poucos meses onde as condições de clima favoreciam o desenvolvimento da doença (Godfrey, 1923). As condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento do fungo são temperaturas amenas e alta umidade relativa (Godfrey, 1923). Sob tais condições pode haver completa deterioração das inflorescências ou dos frutos e os cachos tornam-se frouxos e com as cápsulas pendentes. As perdas variam de redução no teor de óleo até não desenvolvimento das sementes das cápsulas afetadas, dependendo do estágio em que ocorreu a infecção. No Brasil, o mofo cinzento foi constatado em 1932, no Estado de São Paulo (Gonçalves, 1936). Atualmente é considerada, em algumas regiões do país, uma das principais doenças da cultura, ocasionando perdas na produção. Sua

distribuição é praticamente generalizada, ocorrendo nas regiões produtoras cujas condições climáticas são favoráveis ao seu desenvolvimento (Lima *et al.*, 2001).

No Nordeste, o mofo cinzento tem sido constatado nos estados da Paraíba e Pernambuco. No município de Surubim, localizado na região Agreste do Estado de Pernambuco, onde as condições ambientais são mais favoráveis à doença, observou-se alta incidência de plantas afetadas com alta severidade que, expresso em índice de doença variou; de 9,02 a 80,99%, dependendo da cultivar (Lima e Soares, 1990).

2.1.2. Etiologia

O fungo *Amphobotrys ricini* (Buchwald) Hennebert, correspondendo em sua forma teleomórfica a *Botryotinia ricini* (Godfrey) Whetzel, pertence à classe dos Ascomycetes, ordem Helotiales e família Sclerotiniaceae (Lima *et al.*, 2001). Inicialmente, o fungo foi descrito como *Botrytis ricini* Godfrey e o seu teleomorfo foi denominado de *Sclerotinia ricini* Godfrey. O nome do gênero foi modificado por Whetzel para *Botryotinia* e Hennebert estabeleceu o novo gênero *Amphobotrys* para acomodar a forma conidial semelhante a *Botrytis* de *B. ricini* (Hennebert, 1973). O gênero *Amphobotrys* possui uma única espécie típica, *A. ricini* (Buchw.) Hennebert (Holcomb *et al.*, 1989).

As colônias de *A. ricini* são efusas, tornando-se branco acinzentado para castanho, com hifas hialinas, septadas e ramificadas. O conidióforo é ereto, único e grande; haste cilíndrica, de coloração marrom claro, septada, próximo à metade da altura bifurca-se formando um ângulo largo, com ramificações quase simétricas, longas e cilíndricas, bifurcando-se repetitivamente a intervalos curtos para produzir grupos aos pares, globosos, inflados, células conidiogênicas terminais. Cada conídio desenvolve-se simultaneamente em pedicelos curtos, que entram em colapso na maturidade. Os conídios são regularmente globosos, sub-hialinos para castanho, lisos, produzindo uma discreta ornamentação no septo basal (Hennebert, 1973), com dimensões de 6 a 12 µm, normalmente 7 a 10 µm. Os microconídios são globosos, hialinos, com dimensões de 2 a 3,5 µm (Godfrey, 1923).

2.1.3. Sintomatologia

O fungo afeta principalmente a inflorescência ou racemo em qualquer fase do seu desenvolvimento, causando, inicialmente, pequenas manchas de coloração azulada nos frutos. Sob condições de alta umidade relativa, ocorre abundante desenvolvimento de hifas do fungo na superfície dos tecidos, seguido de esporulação intensa, o que confere à área lesionada um aspecto pulverulento de coloração cinza (Lima *et al.*, 2001). Esse mofo a principio cinzento, torna-se mais tarde de cor olivácea (Figura 1). Retirando-se as sementes das cápsulas assim emboloradas nota-se que elas estão chochas e inteiramente inutilizadas (Gonçalves, 1936). Os sintomas em folhas e hastes ocorrem com menor freqüência (Massola Jr. e Bendendo, 1997).

2.1.4. Gama de hospedeiros

Além da mamona, o fungo *A. ricini* foi detectado nos Estados Unidos infectando plantas de *Euphorbia supina*, uma erva daninha anual, plantas cultivadas de poinsétia (*Euphorbia pulcherrima*) (Holcomb *et al.*, 1989), erva-mexicana (*Caperonia palustris* (L.)), presente em campos de arroz e soja (Whitney e Taber, 1986).

2.1.5. Manejo

Os problemas com o mofo cinzento se agravam a partir da intensificação do cultivo da mamoneira e da introdução de variedades mais produtivas, porém nem sempre mais resistentes (Lima *et al.*, 2001).

O controle do mofo cinzento da mamoneira tem como base medidas preventivas, uma vez que medidas curativas são poucos eficazes ou indisponíveis. O uso de sementes sadias, combinado com a escolha criteriosa dos locais de plantio em áreas isentas do patógeno, poderá resultar na produção de uma cultura livre da doença (Lima *et al.*, 2001). Regiões onde as condições climáticas sejam desfavoráveis ao desenvolvimento de epidemias devem ser priorizadas.

A utilização de cultivares resistentes é o método mais recomendado para o controle desta doença. No entanto, cultivares com níveis elevados de resistência a essa doença ainda estão sendo desenvolvidas, pois são poucas as informações sobre a reação de cultivares de mamoneira à infecção por *A. ricini* no Brasil (Milani *et al.*, 2005).

O tratamento químico de sementes de mamoneira, visando à eliminação ou redução do inóculo de *A. ricini*, é uma tática restrita na prevenção da introdução do patógeno via sementes em novas áreas de cultivo, pois o fungo está amplamente distribuído nas regiões produtoras e sua dispersão pelo ar é muito eficiente. Também inexitem informações acerca da eficiência de produtos nem registro de fungicidas para o controle do mofo cinzento da mamoneira no Brasil (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006).

O controle químico pode ser usado em regiões de condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da doença e com cultivares sensíveis, apesar de ainda não existirem produtos registrados (Cartaxo *et al.*, 2004).

2.2. RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS

A resistência a fungicida é um marcador fenotípico que tem sido avaliado em estudos genéticos e concomitantemente com marcadores moleculares para diversos fins, desde estabelecer a estrutura genética de populações de patógenos a identificação de genes envolvidos na resistência à fungicidas (Avila-Adame e Köller, 2003a; Cooke *et al.*, 2004; Imazaki *et al.*, 2006; Judelson e Senthil, 2006)

Com *Botrytis cinerea* já foi possível estabelecer uma relação entre fenotipos resistentes a fungicida e a diversidade genética revelada por RAPD. (Paplomatas *et al.*, 2004). Para o mofo cinzento causado pelo fungo *B. cinerea* também existem muitos estudos inferindo sobre a perda de sensibilidade de isolados a alguns fungicidas (Kimura 2001; Leroux *et al.*, 2002). Entretanto para o mofo cinzento da mamoneira, causado por *Amphobotrys ricini*, não existem fungicidas registrados e praticamente não há histórico de uso no Brasil, sendo portanto, fundamental verificar em isolados nunca expostos a fungicidas qual a sensibilidade destes, visando prever o risco de surgimento de resistência e

uma possível relação dos fenótipos com a diversidade genética.

O fungicida carbendazim, pertencente ao grupo dos benzimidazoles, é efetivo contra fungos da classe dos Ascomycetos, fungos mitóspóricos e alguns Basidiomycetos. Os benzimidazoles tipicamente param o crescimento de patógenos fúngicos por interferir na formação dos microtúbulos (Imazaki *et al.*, 2006). Embora o fungicida carbendazim ou outros precursores de carbendazim possam permitir um bom nível de supressão da doença, estão tendendo ao fracasso comercial devido a evolução de isolados resistentes (Omar *et al.*, 2006).

Atualmente, o grupo de fungicidas das estrobilurinas, tais como azoxistrobina, é o mais importante pois são altamente eficazes contra uma ampla gama de patógenos fúngicos em várias culturas (Ishii, 2004). Eles inibem o transporte de elétrons entre o citocromo *b* e o citocromo *c1* na cadeia respiratória mitocondrial, assim perturbando a produção de ATP. Este novo modo de ação pode prevenir ou retardar o desenvolvimento de patógenos resistentes a outros fungicidas (Bubici *et al.*, 2006).

Inibidores de respiração com alta afinidade ao sítio Qo do citocromo *b* constituem a principal classe de fungicidas da agricultura moderna. Muitos organismos fúngicos inclusive fitopatógenos podem sobrepor este sítio de inibição expressando respiração alternativa, uma via dependente de oxidase alternativa e outros produtos gênicos não identificados (Avila-Adame e Köller, 2003b).

2.3. ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES

A predição de estratégias sustentáveis de manejo de doenças é claramente dependente da compreensão do patógeno e da sua dinâmica populacional (Cooke e Lees, 2004), pois estes fatores podem prever como as populações irão desenvolver respostas a diferentes estratégias de controle (Alfonso *et al.*, 2000). Patógenos com maior potencial evolutivo impõem um maior risco de sobrepor os efeitos de genes de resistência ou o desenvolvimento para anular outros métodos de controle como aplicações de fungicida ou antibióticos (McDonald *et al.*, 2002).

Vários marcadores são utilizados para determinar a estrutura genética

ao se estimar a diversidade genética total (H_t), a diversidade genética dentro das populações (H_s) e entre as populações (G_{ST}). Os marcadores moleculares são muito úteis para este tipo de análise as primeiras foram feitas com RFLP analisando a estrutura de vários fitopatógenos como o *Rhynchosporium secalis*; após o desenvolvimento da técnica PCR os marcadores RAPD e AFLP são usados para estas análises em muitos fungos como *Erysiphe necator* e *Botrytis cinerea* por serem mais rápidos e simples em sua execução (McDonald *et al.*, 1999; Núñez *et al.*, 2006).

Inexistem estudos sobre a variabilidade de populações no caso de *Amphobotrys ricini*. Estrutura genética pode ser definida como a quantidade e distribuição da variação genética dentro e entre populações. A estrutura genética é uma consequência de interações entre as forças que afetam a evolução das populações dando uma visão dos processos evolutivos que formaram uma população no passado (McDonald e Linde, 2002). Entender a contribuição relativa de taxas de mutação, recombinação, seleção natural, fluxo gênico, deriva genética e migração para a geração e manutenção da variação genética nas populações de patógenos é importante, apesar de tais fatores permanecem pouco estudados e, portanto, pouco compreendidos (Cooke e Lees, 2004).

O sucesso evolutivo dos fitopatógenos pode ser atribuído a vários fatores entre eles a alta capacidade em gerar diversidade permitindo uma vantagem seletiva imediata dentro da população de patógenos (Hammond-Kosack, 2000). A estrutura genética pode ser usada para inferir o impacto relativo de diferentes forças que influenciam a evolução da população de patógenos. O conhecimento da quantidade e distribuição da variação genética dentro e entre populações é um componente importante na compreensão da biologia populacional de fungos patogênicos. Uma grande quantidade de diversidade genética distribuída sobre uma pequena escala espacial sugere a possibilidade de rápida adaptação por um patógeno a mudanças ambientais (novos genes de resistência no hospedeiro ou fungicidas). Um alto grau de similaridade genética, entre populações coletadas de regiões geográficas amplamente separadas, sugere a ocorrência de dispersão a longa distância e fluxo gênico (McDonald *et al.*, 1999).

O fluxo gênico pode ser quantificado a partir de medidas diretas e indiretas. As medidas diretas referem-se ao fluxo gênico contemporâneo, enquanto que as indiretas são baseadas na estrutura de populações e referem-se ao fluxo gênico histórico ou passado (Zuchii, 2002)

Entre os métodos indiretos estão aquele via F_{ST} que é rotineiramente utilizado para estimar o número de migrantes por geração (Nm) pela fórmula:

$$Nm = \frac{1}{4} \left[\frac{1}{F_{ST}} - 1 \right], \text{ Wright, 1951}$$

A estatística F de Wright se aplica a estudos de populações com dois alelos por loco, para estudar populações com múltiplos alelos Nei (1973) sugeriu um novo método de medir o grau de diferenciação gênica entre populações. No seu modelo a diferenciação gênica entre populações é dada pelo coeficiente G_{ST} que é equivalente ao F_{ST} de Wright. Mais tarde Nei(1987) propôs a seguinte fórmula para calcular o G_{ST} com base no H_T e H_S :

$$G_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

A probabilidade de dois genes escolhidos aleatoriamente serem idênticos ou não idênticos pode ser dada pela identidade gênica ou homozigosidade (J) e pela medida da variação gênica de uma população (H) geralmente chamada de heterozigosidade ou diversidade gênica. A diversidade gênica máxima é 1, o valor de H é dado pela fórmula: $H = 1 - J$, em que a variação gênica da população estudada é igual a 1 menos o valor da identidade gênica encontrada nesta população (Nei, 1973).

2.4. MARCADORES MOLECULARES

As tecnologias de análise molecular da variabilidade do DNA permitem determinar pontos de referência nos cromossomos, tecnicamente denominados marcadores moleculares. Por marcador molecular define-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA correspondente a regiões expressas ou

não do genoma (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Marcadores moleculares revelam polimorfismos de DNA entre indivíduos geneticamente relacionados. Por isso, os marcadores de DNA se prestam para estudos de genética de população, mapeamento e análises de similaridade e distância genética. Também as marcas de DNA podem ser usadas para *DNA fingerprinting* isto é, visando à identificação de acessos de plantas ou isolados de um microorganismo, para completar estudos de sistemática (Lopes *et al.*, 2002). Marcadores moleculares baseados no polimorfismo de DNA têm inúmeras vantagens, destacando-se o fato de não serem influenciados pelo meio ambiente e serem independentes do estágio de vida (Sacchet, 1999).

2.4.1. Classes de Marcadores Moleculares

Há várias técnicas disponíveis de marcadores moleculares, cada uma usando uma estratégia em particular para determinar polimorfismos de DNA (Lopes *et al.*, 2002). Os marcadores moleculares tiveram início a partir dos marcadores isoenzimáticos e, à medida que as técnicas de biologia molecular se desenvolviam outros tipos foram surgindo. Muitas delas baseadas em duas estratégias, a clássica que é a hibridização que envolve o corte do DNA por endonucleases de restrição seguida pela separação eletroforética dos fragmentos de DNA, o RFLP é um exemplo. A PCR é a outra estratégia que envolve a amplificação *in vitro* de seqüências particulares de DNA usando oligonucleotídeos específicos ou arbitrários, os produtos amplificados são separados por eletroforese, o RAPD é uma das técnicas que usa esta estratégia.

2.4.1.1. Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso - RAPD

O polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (**R**andom **A**mplified **P**olymorphic **D**N – RAPD) surgiu como um avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR (Williams *et al.*, 1990). Welsh e McClelland (1990), publicaram um trabalho utilizando o mesmo princípio do RAPD e

denominaram a técnica de AP-PCR (Arbitrarily Primer – Polimerase Chain Reaction). Porém esta técnica utilizando oligonucleotídeos arbitrários ficou mais conhecida por RAPD que é a denominação mais comumente encontrada na literatura. Sua estratégia consiste em um único oligonucleotídeo de seqüência arbitrária, eliminando a necessidade de conhecimento prévio da seqüência (Ferreira *et al.*, 1998). Os oligonucleotídeos usados nos experimentos de RAPD são compostos de 10 pares de bases de seqüência arbitrária com no mínimo 50% de GC (Lopes *et al.*, 2002).

Os marcadores RAPD comportam-se como dominantes, assim nas análises dos perfis eletroforéticos gerados, quando a banda está presente não é possível saber se o segmento teve origem em uma ou duas cópias da seqüência que foi amplificada, ou seja se o indivíduo era homocigoto ou heterocigoto (Moreira *et al.*, 1999). Para que haja amplificação duas seqüências de DNA complementares ao oligonucleotídeo devem estar em orientação oposta e suficientemente adjacentes menos que 4.000 pares de bases (Ferreira *et al.*, 1998). Alguns autores relatam que essa distancia não deve exceder 3.000 pares de bases. Como a seqüência de cada iniciador é determinada de modo aleatório, este pode encontrar várias regiões complementares à sua seqüência e, por isso, revelar vários locos (Lopes *et al.*, 2002).

Desde a introdução da análise RAPD, esta técnica tem provado ser uma ferramenta muito poderosa nas análises genéticas e é aplicada a uma ampla gama de organismos. No caso dos fungos especialmente os fitopatogênicos esta técnica foi inicialmente empregada na caracterização destes a exemplo de *Botrytis cinerea* o qual pela análise de RAPD foi possível identificar isolados geneticamente diferentes empregando 50 oligonucleotídeos resultando em 139 marcadores (Van der Vlugt-Bergmans *et al.* 1993). Ainda existem muitos estudos de caracterização de isolados atualmente (Colauto *et al.*, 2002; Leisova *et al.*, 2005); entretanto, há um maior interesse em estudar populações e entender sua estrutura e dinâmica como no estudo da diversidade genética entre populações de *Rhynchosporium secalis* na Africa que revelou haver uma diversidade entre populações de 80 % indicando que estas surgiram de fontes diferentes e assim requeriam estratégias de manejo diferentes (Korff *et al.*, 2004).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Determinar a estrutura genética e a sensibilidade à fungicidas de *Amphobotrys ricini* no estado da Paraíba e Alagoas.

3.2. Objetivos específicos

- Quantificar a variabilidade entre e dentro de populações de *Amphobotrys ricini* com base no marcador molecular RAPD
- Testar a sensibilidade de isolados aos fungicidas azoxistrobina e carbendazim

4. Material e Métodos

4.1. Coleta das Amostras

Cachos de mamoneira apresentando sintomas típicos do mofo cinzento foram coletados entre os dias 06/09/06 e 20/10/06 em diferentes municípios do estado da Paraíba, a localização de cada isolado foi determinada por GPS (**G**lobal **P**osition **S**ystem). No momento da coleta foi observada a cultivar de mamoneira hospedeira do patógeno. As amostras foram acondicionadas em sacos de papel e enviadas ao Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Algodão onde o fungo foi isolado.

Sete isolados de *A. ricini* coletados nos municípios de Ceca, Estrela (Lagoa Dantas), Olho d'água, Santana do Ipanema e Satuba do estado de Alagoas; foram cedidos pelo departamento de fitopatologia da UFAL, enviados ao laboratório de Fitopatologia da Embrapa Algodão e incluídos nas análises.

4.2. Isolamento e Manutenção dos Isolados

O fungo *A. ricini* foi submetidos a isolamento direto com o auxílio de bastões de vidro com uma ponta bem fina retirando os esporos das estruturas do fungo encontradas na lesão e transferidos a uma placa de Petri com meio V8 10% (Miller, 1955). Os isolados foram identificados de acordo com sua localidade de origem mantidos em meio V8 10% e incubados em B.O.D. a 25°C com fotoperíodo de 12 horas por três a cinco dias até a formação das colônias.

As colônias que surgiram após o isolamento foram purificadas, sendo os conidióforos contendo conídios observadas em lupa binocular retirados e cultivados em outra placa. Foram obtidos 23 isolados a partir dos cachos coletados na Paraíba.

Tabela 1. Isolados de *Amphobotrys ricini* coletados na Paraíba, com as coordenadas geográficas, cultivar do hospedeiro e número do isolado.

Local	Latitude	Longitude	Cultivar	Nº do isolado
Campina Grande	07°.13'28,9"	035°54'26,4"	Mirante 10	CNPA0024
Campina Grande	07°.13'26,8"	035°54'18,1"	Pajé	CNPA0025
Campina Grande	07°.13'29,3"	035°54'15,2"	Vermelha	CNPA0026
Campina Grande	07°.13'29,1"	035°54'14,6"	Nordestina	CNPA0027
Areia	06°58'06,4"	035°44'33,5"	Nordestina	CNPA0028
Areia	06°58'06,0"	035°44'04,3"	Nordestina	CNPA0029
Areia	06°58'05,7"	035°44'03,9"	Nordestina	CNPA0030
Areia	06°58'04,5"	035°44'04,7"	Nordestina	CNPA0031
Areia	06°58'04,2"	035°44'04,5"	Nordestina	CNPA0032
Lagoa Seca	07°08,507"	035°55'00,7"	Nativa	CNPA0033
Lagoa Seca	07°08,507"	035°55'00,7"	Nativa	CNPA0034
Lagoa Seca	07°08,507"	035°55'00,7"	Nativa	CNPA0035
Lagoa Seca	07°08,507"	035°55'00,7"	Nativa	CNPA0138
Esperança	07°00,096"	035°58'867"	Paraguaçu	CNPA0139
Esperança	07°00,095"	035°50'885"	Paraguaçu	CNPA0140
Esperança	07°01,420"	035°51'310"	Paraguaçu	CNPA0141
Esperança	07°00,095"	035°50'865"	Paraguaçu	CNPA0142
Remígio	06°08,105"	035°47'909"	Paraguaçu	CNPA0143
Remígio	06°58'106"	035°47'909"	Paraguaçu	CNPA0144
Solânea	06°45,392"	035°40'731"	Paraguaçu	CNPA0145
Solânea	06°45,423"	035°40'466"	Paraguaçu	CNPA0146
Alagoa Nova	-	-	Nativa	CNPA0147
Alagoa Nova	-	-	Nativa	CNPA0148

4.3. Ensaio de Resistência a Fungicidas

4.3.1. Teste preliminar para germinação de esporos

Muitos fitopatógenos podem sobrepor *in vitro* o sítio de inibição sobre o qual atua o azoxistrobina expressando respiração alternativa, uma via dependente de oxidase alternativa, podendo interferir no resultados dos testes *in vitro*. Assim para validar os resultados quatro isolados de *A. ricini* foram aleatoriamente selecionados e testados com uma concentração de 100 µg/ml de ácido salicil-hidroxiâmico (SHAM), inibidor de uma rota de oxidação

alternativa.

4.3.2. Germinação de Esporos

Foram testados os fungicidas Azoxistrobin (nome comercial Piori) diluído em dimetil sulfóxido (DMSO) e Carbendazin (nome comercial Derosal) diluído em etanol. O primeiro nas concentrações de 0,001; 0,01; 0,1; 1 e 10 ppm e o controle sem fungicida; o último nas concentrações 0,01; 0,1; 1; 10 e 100 ppm e o controle.

Os ensaios foram conduzidos com placas de 15 cm de diâmetro contendo 4 lâminas de microscopia sobre as quais foram distribuídos 500 µl de meio agar-água acrescido com os fungicidas nas concentrações testadas. Em cada placa contendo 4 lâminas foi colocada a mesma concentração de fungicida e o mesmo isolado. Sobre o meio foram colocados 25 µl de suspensão de esporos. A suspensão de esporos foi preparada acrescentando 10 ml de água destilada esterilizada e uma gota de Tween 20 às placas de Petri com os isolados esporulados.

As placas foram mantidas em B.O.D. por 5 horas a 25°C após esse período colocou-se 25 µl de sulfato de cobre, sobre o meio com a suspensão de esporos antes da avaliação, para impedir que os esporos continuassem germinando. Cada lâmina foi visualizada no microscópio onde foram feitas contagem de 50 esporos por lâmina avaliando o número de germinados e não germinados. Foi considerado como germinado o esporo com tubo germinativo de comprimento igual ou superior ao diâmetro do esporo. O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo a unidade amostral uma lâmina.

4.3.3. Crescimento Micelial

Em placas de Petri descartáveis foram distribuídos 10 ml de meio V8 em concentrações de 0; 0,01; 0,1; 1, 10 e 100 ppm do fungicida Carbendazin (Derosal) diluído em etanol 95%. Em diferentes erlenmeyers cada um contendo 250 ml de meio V8 foram acrescentados 2,5 µl, 25 µl e 250 µl do fungicida estoque com concentração de 1.000 ppm, gerando as concentrações de 0,01;

0,1 e 1 ppm, respectivamente; do fungicida estoque com concentração de 10.000 ppm foram acrescentados 250 µl e 2,5 ml aos erlenmeyers, neste último antes de adicionar o fungicida foi retirada uma alíquota de 2,5 ml, assim obtendo as concentrações de 10 e 100 ppm.

A partir de placas com os isolados foram retirados discos de micélio de 0,7 cm de diâmetro e colocados no centro de cada placa com as concentrações testadas. Cada isolado foi testado com as cinco concentrações e o controle. As placas foram mantidas em temperatura constante de 25°C com 12 horas de luz por cinco dias. Após cinco dias de crescimento micelial, foram realizadas duas medidas perpendiculares do diâmetro da colônia. O valor máximo foi de 8,5 cm que é o diâmetro da placa e o mínimo foi de 0,7 cm que foi o diâmetro do disco de micélio colocado na placa. O ensaio foi realizado duas vezes.

4.3.4. Análise dos dados

Os dados foram analisados por meio do procedimento PROBIT do pacote estatístico SAS, que gerou a DL₅₀ (concentração do ingrediente ativo capaz de inibir 50% do crescimento micelial) de cada isolado.

4.4. Extração de DNA Genômico

O micélio dos isolados foram coletados de culturas com 15 dias, colocados em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml rotulados e congelados em nitrogênio líquido. O DNA genômico foi extraído utilizando o protocolo descrito por Weising *et al* (1995) que consistiu em macerar o micélio congelado com o auxílio de pistilos de vidro previamente resfriados até obter-se um pó, ao qual foram adicionados 600 µl de tampão de extração (SDS 0,5%, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM e Tris-HCl 200 mM). Os tubos foram misturados vigorosamente por 30 segundos para misturar bem o tampão ao micélio pulverizado e, em seguida, colocados em banho-maria por 10 minutos a uma temperatura de aproximadamente 90°C. Após retirados do banho-maria foram adicionados 300 µl de acetato de sódio 3 M, que foram misturados por inversão e, em seguida, incubados por 20 minutos a -20°C. Finalizado o tempo de incubação, os tubos contendo as amostras foram centrifugados por 15 minutos a 12.000 g.

Seiscentos microlitros de sobrenadante foram transferidos para outro tubo, onde foi adicionado o mesmo volume de isopropanol. As amostras foram então incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugadas por 15 minutos a 12.000 g para precipitar os ácidos nucléicos. Com o ácido nucléico precipitado o sobrenadante foi descartado, o precipitado foi então lavado com etanol 70% e, em seguida, com etanol absoluto para acelerar a evaporação e secagem do precipitado. Ao precipitado seco foram adicionados 100 µl de água MilliQ™ para ressuspendê-lo.

A concentração dos DNAs extraídos foi estimada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% e TBE (Tris-borato 0,09 mM, EDTA 0,002 Mm, pH 8,0) 1X por meio da comparação de massa de padrão comercial (Lambda DNA) de concentração conhecida.

4.5. Reação de RAPD

Após a quantificação, as amostras foram diluídas para 2,5 ng/µl com água MilliQ™, e foram armazenadas a -20°C. As reações de amplificação foram realizadas em solução total de 25 µl contendo: 0,2 mM de dNTP; tampão da *Taq* DNA polimerase (200 mM de Tris-HCl, 500 mM de KCl); 0,3 mM de oligonucleotídeos; 10 ng de DNA total de *A. ricini*; 2,5 mM de MgCl₂; 1 µl de *Taq* DNA polimerase produzida no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão. Cada um dos isolados foi amplificado com 20 oligonucleotídeos iniciadores com 10 pares de bases previamente selecionados para *A. ricini* (Vidal, *et al* 2005), pertencentes aos Kits de oligonucleotídeos A, C, E, M, e P (OPERON Technologies, Inc. Alameda, CA), além deles foram testados outros dois oligonucleotídeos o OPA-09 e OPN-01, as seqüências de todos estão na tabela 2.

A ciclagem foi obtida em termocicladores (Eppendorf-Mastercycler Gradient), com 45 ciclos de amplificação; cada ciclo foi constituído por uma etapa de desnaturação do DNA a 94°C por 1 minuto, anelamento de oligonucleotídeos a 35°C por 1 minuto e amplificação do DNA a 72°C, por 2 minutos e, ao final dos 45 ciclos, uma extensão adicional de 5 minutos a 72°C.

Tabela 2. Seqüência e conteúdo GC dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para análise de *A. ricini* por marcadores RAPD.

Oligonucleotídeo	Seqüência	Conteúdo GC (%)
OPA-01	CAG GCC CTT C	70
OPA-09	GGG TAA CGC C	70
OPC-13	AAG CCT CGT C	60
OPE-06	AAG ACC CCT C	60
OPE-09	CTT CAC CCG A	60
OPE-11	GAG TCT CAG G	60
OPE-12	TTA TCG CCC C	60
OPE-14	TGC GGC TGA G	70
OPE-15	ACG CAC AAC C	60
OPE-20	AAC GGT GAC C	60
OPM-11	GTC CAC TGT G	60
OPM-15	GAC CTA CCA C	60
OPM-16	GTA ACC AGC C	60
OPM-17	TCA GTC CGG G	70
OPN-01	CTC ACG TTG G	60
OPP-03	CTG ATA CGC C	70
OPP-06	GTG GGC TGA C	70
OPP-11	AAC GCG TCG G	70
OPP-12	AAG GGC GAG T	60
OPP-13	GGA GTG CCT C	70
OPP-14	CCA GCC GAA C	70
OPP-15	GGA AGC CAA C	60

Às reações com volume de 25 µl foram acrescentados 4 µl de tampão de amostra (sacarose 4 g, azul de bromofenol 0,025 g) e, então, os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal, em gel de agarose (agarose 1%, tampão TBE 1X [Tris-borato 0,09 mM, EDTA 0,002 M, pH 8,0] e brometo de etídio [12 µg/ml]) a uma corrente elétrica de 100 V. Visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentado.

4.5.1. Análise dos dados

Para a determinação da estrutura genética foram analisados 23 isolados de duas subpopulações (SPs), sendo a SP1 formada por isolados coletados nos municípios de Campina Grande, Lagoa Seca e Esperança e a SP2 com isolados oriundos dos municípios de Areia, Remígio, Solânea e Alagoa Nova. Os dados obtidos nos géis de eletroforese foram transformados em dados binários – 1 para presença de bandas e 0 para ausência de bandas. O programa PopGene (Population Genetic Analysis – Version 1.32, University of Alberta) foi utilizado para executar a análise combinada dos dados obtidos e gerar os valores de diversidade gênica (H), diversidade genética total (H_T), diversidade genética intrapopulacional (H_S), diferenciação genética interpopulacional (G_{ST}), Número de migrantes (N_m).

5. RESULTADOS

5.2. Resistência a Fungicida

No teste de efeito dos fungicidas azoxistrobina e carbendazim sobre germinação de esporos *in vitro* de *A. ricini*, o carbendazim não impediu a germinação dos esporos dos isolados testados em nenhuma das concentrações utilizadas. Já para o azoxistrobina com apenas 0,001 ppm houve um pequeno declínio no percentual de germinação de esporos, a medida que a concentração utilizada foi maior, menor foi a germinação de esporos chegando a menos de 2% de germinação em 10 ppm na população 1 composta por isolados da Paraíba e menos que 1% para a população 2 composta por isolados de Alagoas (Figura 1).

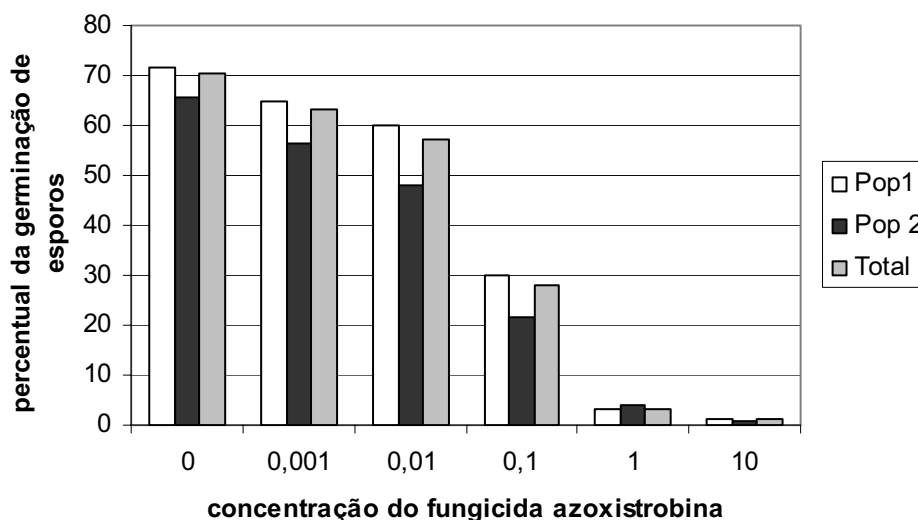


Figura 1: Percentual de germinação de esporos de duas populações de *A. ricini* em diferentes concentrações do fungicida azoxistrobina.

Nas duas repetições do ensaio avaliando o efeito do fungicida Carbendazim sobre o crescimento micelial realizado *in vitro* todos os isolados testados desenvolveram-se normalmente na testemunha, as concentrações de fungicidas de 0,01 e 0,1 ppm resultaram em valores nulos ou baixos de ICC (inibição do crescimento da colônia) nos isolados o maior valor obtido foi de 19,37 para o isolado VI. A partir da concentração 1 ppm até a de 100 ppm

nenhum dos isolados foi capaz desenvolver-se no meio de cultura, tendo um ICG de valor 100 calculado para todos os isolados, ou seja para estas concentrações houve 100% de inibição do crescimento da colônia.

Os valores de DL₅₀ variaram entre 0,0263 e 0,316 µg/ml para carbendazim e para azoxistrobina os valores de DL₅₀ ficaram entre 0,0036 e 0,168 µg/ml (Tabela 3). Para o carbendazim os isolados da população 1 (Paraíba) estiveram presentes em todas as Apesar da grande amplitude encontrada de valores de DL₅₀, todos estão compreendidos na faixa de sensibilidade utilizada para outros patógenos.

Na presença do inibidor da oxidase alternativa (ácido salicil-hidroxiâmico - SHAM) não foi verificada interferência na germinação esporos de *A. ricini* assim a média de DL₅₀ não diferiu quando comparada a testemunha e as doses do fungicida azoxistrobina utilizadas.

Tabela 3. Concentração de ingrediente ativo para inibir 50% (DL₅₀) do crescimento micelial (carbendazim) ou germinação de esporos (azoxistrobina).

Isolado	DL ₅₀		Isolado	DL ₅₀	
	Carbendazim	Azoxistrobina		Carbendazim	Azoxistrobina
A1	0,31660	0,0174	III	0,15794	0,0773
A2	0,31660	0,0036	IV	-	0,0591
A3	0,31660	0,0167	L1	0,17879	-
A4	0,31660	0,0251	L2	0,18610	0,0781
A5	0,31660	0,0400	L3	0,31738	0,0248
C1	0,02634	0,1526	L4	0,18295	0,0242
C2	0,20061	0,1421	N1	0,10107	0,1680
C3	0,31660	0,0968	N2	-	0,0466
C4	0,31660	0,1290	R1	0,22524	0,1046
E1	0,31660	0,0123	R2	0,27635	0,0855
E3	0,31660	0,0398	S1	0,22152	0,0234
E4	0,31660	0,0469	S2	0,17694	0,0664
E5	0,14934	0,0350	V	0,24643	0,0248
I	-	0,0366	VI	0,12053	0,0176
II	-	0,0060	VII	0,14841	0,0087

5.4. Reação RAPD

Os 20 oligonucleotídeos pré-selecionados utilizados na análise foram polimórficos confirmando os resultados obtidos por Vidal *et al* (2005), quanto aos outros dois oligonucleotídeos testados, OPN-01 também foi polimórfico podendo ser utilizado em trabalhos com o *A. ricini*. Entretanto o oligonucleotídeo OPA-09 foi monomórfico.

Foram obtidos 80 fragmentos polimórficos, ou seja, fragmentos que estiveram ausentes em pelo menos um isolado avaliado. A partir da análise combinada dos 80 fragmentos polimórficos gerada pelo PopGene foi estimado o valor da diversidade genética total (H_t), diversidade genética dentro das subpopulações (H_s) e entre as subpopulações – G_{st} para cada loco e a média da população (tabela 4). O valor estimado de (H_t) igual a 0,293 foi baixo, a estimativa da diversidade genética dentro das subpopulações (H_s) foi de 0,271, muito próximo ao valor de H_t , representando 92,5% da variação genética total. O número médio de migrantes (N_m) que deve ser trocado entre as subpopulações foi de 6,15 indivíduos a cada geração para manter o nível de similaridade genética observado. As freqüências alélicas dos 80 locos das duas subpopulações podem ser observadas na tabela 5.

A fração da variação genética distribuída entre as subpopulações – G_{st} foi, em média, 0,075, apenas 7,5% da variação gênica foi distribuída entre as subpopulações. Houve baixa diferenciação entre as subpopulações com base na média de identidade genética (Nei, 1978) entre as subpopulações em todos os locos analisados (0,9468). A distancia genética entre as subpopulações foi de 0,0362. Neste estudo, há evidências de que a estrutura genética da população de *A. ricini* no estado da Paraíba seja oriunda de sistema reprodutivo clonal e que há intensa migração entre as subpopulações estudadas.

Tabela 4. Frequência alélica de 80 locos RAPD na população total de *Amphobotrys ricini*.

Loco	T	Ht	Hs	Gst	G ²	Loco	T	Ht	Hs	Gst	G ²
1	0,739	0,386	0,385	0,001	0,015	42	0,043	0,086	0,082	0,047	1,525
2	0,173	0,292	0,274	0,061	1,478	43	0,826	0,292	0,274	0,061	1,478
3	0,782	0,342	0,337	0,016	0,380	44	0,956	0,086	0,082	0,047	1,525
4	0,782	0,342	0,337	0,016	0,380	45	0,173	0,292	0,275	0,061	1,478
5	0,782	0,347	0,307	0,113	2,780	46	0,782	0,347	0,308	0,113	2,780
6	0,217	0,342	0,337	0,016	0,380	47	0,043	0,086	0,083	0,047	1,525
7	0,816	0,292	0,274	0,061	1,478	48	0,782	0,347	0,308	0,113	2,780
8	0,043	0,086	0,082	0,047	1,524	49	0,652	0,460	0,308	0,332	8,415**
9	0,173	0,292	0,274	0,061	1,478	50	0,043	0,086	0,083	0,047	1,525
10	0,173	0,287	0,287	0,001	0,009	51	0,869	0,230	0,225	0,021	0,496
11	0,739	0,393	0,324	0,175	4,360*	52	0,043	0,079	0,076	0,043	1,343
12	0,434	0,494	0,337	0,317	7,79**	53	0,043	0,086	0,083	0,047	1,525
13	0,695	0,428	0,386	0,096	2,295	54	0,173	0,292	0,275	0,061	1,478
14	0,913	0,165	0,148	0,100	3,159	55	0,217	0,347	0,308	0,113	2,780
15	0,782	0,347	0,307	0,113	2,780	56	0,869	0,235	0,198	0,158	4,920*
16	0,217	0,347	0,307	0,113	2,780	57	0,565	0,492	0,470	0,045	1,058
17	0,782	0,347	0,307	0,113	2,780	58	0,521	0,499	0,491	0,016	0,382
18	0,043	0,086	0,082	0,047	1,524	59	0,217	0,342	0,337	0,016	0,380
19	0,130	0,235	0,198	0,157	4,921*	60	0,043	0,086	0,083	0,047	1,525
20	0,782	0,347	0,307	0,113	2,780	61	0,826	0,292	0,275	0,061	1,478
21	0,782	0,347	0,307	0,113	2,780	62	0,782	0,347	0,308	0,113	2,780
22	0,217	0,347	0,307	0,113	2,780	63	0,782	0,347	0,308	0,113	2,780
23	0,043	0,086	0,082	0,047	1,524	64	0,173	0,293	0,275	0,061	1,478
24	0,782	0,347	0,307	0,113	2,781	65	0,695	0,428	0,387	0,097	2,295
25	0,217	0,347	0,307	0,113	2,781	66	0,173	0,293	0,275	0,061	1,478
26	0,565	0,491	0,491	0,001	0,033	67	0,826	0,293	0,275	0,061	1,478
27	0,826	0,292	0,274	0,061	1,478	68	0,869	0,230	0,225	0,021	0,496
28	0,347	0,456	0,435	0,045	1,066	69	0,173	0,293	0,275	0,061	1,478
29	0,782	0,347	0,307	0,113	2,780	70	0,173	0,288	0,287	0,001	0,009
30	0,826	0,292	0,274	0,061	1,478	71	0,130	0,224	0,221	0,013	0,296
31	0,173	0,292	0,274	0,061	1,478	72	0,782	0,343	0,337	0,016	0,380
32	0,478	0,498	0,474	0,048	1,120	73	0,130	0,230	0,225	0,021	0,496
33	0,695	0,428	0,386	0,096	2,295	74	0,782	0,347	0,308	0,113	2,780
34	0,043	0,086	0,082	0,047	1,525	75	0,782	0,343	0,337	0,016	0,380
35	0,956	0,086	0,082	0,047	1,525	76	0,956	0,087	0,082	0,047	1,525
36	0,956	0,086	0,082	0,047	1,525	77	0,652	0,452	0,441	0,023	0,528
37	0,608	0,475	0,474	0,003	0,068	78	0,652	0,452	0,441	0,023	0,528
38	0,782	0,347	0,307	0,113	2,780	79	0,956	0,087	0,082	0,047	1,525
39	0,782	0,342	0,337	0,016	0,380	80	0,087	0,159	0,159	0,001	0,004
40	0,826	0,287	0,287	0,001	0,009	Média		0,293	0,271	0,075	
41	0,782	0,334	0,304	0,087	2,106	Desvio		0,015	0,013		

G² = teste de X². Hipótese de nulidade de não haver diferença na frequência alélica entre subpopulações (* indica P<0,05; ** P<0,01).

6. DISCUSSÃO

6.1 Variabilidade genética em isolados de *Amphobotrys ricini* por marcadores tipo RAPD

O valor estimado de variabilidade genética dentro das sub-populações ($H_S = 0,271$) representa 92% da variabilidade genética total da população estudada ($H_t = 0,293$), portanto a diferença genética entre as sub-populações é baixa 7,5%, ou seja, a probabilidade de dois isolados, escolhidos aleatoriamente nas subpopulações, possuírem alelos diferentes é de 7,5 a cada 100. Uma estrutura muito semelhante a deste estudo com *A. ricini* foi encontrada com populações de um patógeno da mesma família, *Botrytis cinerea*, no sudeste da Espanha. A análise da estrutura genética revelou que 98% da diversidade genética total estava dentro das sub-populações e, apenas 2%, entre as sub-populações (Alfonso *et al.*, 2000). Confirmando estes dados uma outra análise de populações de *B. cinerea* do oeste da Espanha revelou que a diversidade gênica dentro das sub-populações representou 96% da diversidade gênica total, enquanto a diversidade entre as subpopulações representou apenas 4% (Moyano *et al.*, 2003). Entretanto, o valor de H_t encontrado para população de *B. cinerea* foi alto 0,518 sugerindo que deve haver reprodução sexual, diferente do encontrado para *A. ricini*, onde o menor valor de H_t sugere não haver reprodução sexual nas subpopulações estudadas. Baixos valores de H_t são esperados em populações de patógenos onde a reprodução é assexuada (população clonal) e com alta dispersão de indivíduos.

Para se manter um alto índice de similaridade genética interpopulacional é necessário que haja elevada migração entre os indivíduos das sub-populações. Para haver diferenciação entre sub-populações, é necessário que além do surgimento de novos alelos por mutação, estes sejam fixados na sub-população e que o fluxo gênico entre as sub-populações seja reduzido ou nulo. Segundo Wright (1951), quando $Nm \geq 1,0$, ou seja, quando um ou mais

indivíduos migram por geração, os efeitos da migração são suficientes para contrapor os efeitos da deriva, e portanto o número de migrantes por geração impede a divergência entre populações. O número de migrantes (N_m) estimado para as subpopulações de *A. ricini* foi de 6,15 indivíduos a cada geração, já para sub-populações de *B. cinerea* avaliadas por Alfonso 2000 o N_m foi de 8,6 e por Moyano 2003 foi de 13,3 indicando a importância da migração na prevenção da diferenciação genética. Os resultados confirmam que a dispersão da doença de um para outro local ocorre frequentemente. Para fungos como *A. ricini* e *B. cinerea* a migração de indivíduos é facilitada pelo modo de dispersão dos conídios, pois estes são transportados pelo vento (Garrido e Sonego, 2005; Milani *et al.*, 2005). A migração tem implicação para o manejo em particular a resistência a fungicidas e práticas de manejo. As estratégias de controle devem ser a nível local ou mesmo regional, apenas um produtor não aplicando a escala apropriada de fungicida irá resultar no aumento de fenótipos resistentes que irão competir com populações suscetíveis.

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que *A. ricini* é um patógeno com reprodução assexuada que exibe alta taxa de migração gênica e tem baixa diversidade genética. Estas características o colocam numa categoria de patógenos com fator de risco 3, numa escala entre 1 e 9, por ter um potencial evolutivo relativamente baixo. Esta escala elaborada por McDonald (2002) tem como base o tipo de reprodução e a taxa de migração, é atribuído valor 1 para patógenos de reprodução assexuada devido a ausência da recombinação existente na reprodução sexuada diminuindo a velocidade de surgir um gene de resistência nesses patógenos

Apesar de ter um baixo potencial evolutivo devido ao seu modo de reprodução, o *A. ricini* tem uma alta taxa de migração assim, quando linhagens virulentas surgem por mutação são movidas eficientemente a campos vizinhos ou regiões agrícolas adjacentes. Para estes patógenos é sugerida como estratégia de produção a piramidização de genes de resistência (que consiste em ter os principais genes de resistência presentes no hospedeiro), devido a maior probabilidade de ser durável porque é improvável que uma seqüência de múltiplas mutações para virulência (perda de vários elicitores simultaneamente) irá ocorrer na mesma linhagem clonal (McDonald *et al.*, 2002)

O mofo cinzento está crescendo em importância e não há relatos prévios

na literatura sobre o estudo da variabilidade genética do fungo *Amphobotrys ricini*. Dessa forma a realização do presente estudo representa um passo inicial da obtenção de informações sobre a estrutura genética desse patógeno.

6.2. Resistência de *Amphobotrys ricini* a fungicida

A hipótese para o estudo do nível de sensibilidade dos isolados de *Amphobotrys ricini* aos fungicidas carbendazim e azoxistrobin foi que tais isolados constituíssem uma população de base por terem sido coletados em locais em que sofreram pouca ou nenhuma exposição à fungicidas.

Os valores de DL₅₀ para todos os isolados variou entre 0,0036 e 0,168 ppm para azoxistrobin e entre 0,0263 e 0,314 para carbendazim. De acordo com a escala de Edgington *et al.* (1971) para benzimidazoles:

DL₅₀ < 1 ppm : alta fungitoxicidade e alta sensibilidade;

DL₅₀ 1-10 ppm : moderada fungitoxicidade e moderada sensibilidade;

DL₅₀ 10-50 ppm : baixa fungitoxicidade e baixa sensibilidade;

DL₅₀ >50 ppm : não fungitóxico e insensibilidade;

como o maior valor de DL₅₀ encontrado para os isolados de *A. ricini* foi de 0,314 ppm, confirmando que estes isolados são altamente sensíveis aos fungicidas estudados. Assim, estes isolados constituem uma população de base, e podem servir como referência para avaliações de ações posteriores. Estes resultados podem ser empregados no futuro para monitorar potenciais mudanças na sensibilidade a azoxistrobina e carbendazim entre populações de *A. ricini*. Essas mudanças que surgem como uma potencial causa de falha inesplicada de controle podem ser detectadas ao se testar periodicamente o sucesso de programas do manejo de resistência (Wong e Wilcox, 2000)

A ineficiência do carbendazim em inibir a germinação dos esporos no presente estudo atribui-se ao seu modo de ação. O modo de ação dos benzimidazois é baseado na sua ligação à β -tubulina interferindo na mitose durante a divisão na metáfase. O tubo mitótico é distorcido e os núcleos filhos fracassam em se separar resultando na morte da célula. A resistência ao carbendazim, é causada pela mutação em um único gene, resultando em

ligeiras alterações na tubulina que leva a redução da afinidade entre ambos (Reis *et al.*, 2001). O carbendazim inibiu o desenvolvimento do fungo com apenas 1 ppm, assim os isolados de *A. ricini* estudados são sensíveis ao fungicida. Segundo Kimura (2001), *B. cinerea* apresentou baixa sensibilidade ao carbendazim com DL₅₀ entre 10 e 50 ppm

Todos os isolados analisados de *A. ricini* mostraram-se sensíveis ao fungicida azoxistrobina com valores de DL₅₀ entre 0,0036 e 0,168 ppm provavelmente devido a ausência da pressão de seleção imposta pela aplicação do controle químico. Resultados semelhantes foram encontrados em populações de base de *Plasmopara viticola* testada com azoxistrobina em que a DL₅₀ variou de 0,037 a 0,78 ppm (Wong e Wilcox, 2000) e *Mycosphaerella fijiensis* testada trifloxistrobin, outro estrobilurina, com valores entre 0,0003 a 0,05 ppm (Chin *et al.*, 2001). Kimura (2001) analisando a sensibilidade de *B. cinerea* a vários fungicidas verificou que o azoxistrobina não foi fitotóxico permitindo o desenvolvimento normal do fungo mesmo em altas concentrações concluindo que o *B. cinerea* é insensível ao azoxistrobina com valores de DL₅₀ maiores que 50 ppm. A resistência a strobilurinas ocorre devido a mutação no sitio alvo levando a troca do aminoácido glicina para alanina na posição G143 do gene do citocromo b (Sierotzki *et al.*, 2000). Esta troca resulta em um novo fenótipo, que é facilmente distinguido dos isolados *baseline* por exibir pouca ou nenhuma resposta a dose de fungicida na germinação dos esporos (Chin *et al.*, 2001)

7. Conclusões

- Os isolados de *Amphobotrys ricini* dos estados da Paraíba e Alagoas são sensíveis aos fungicidas carbendazim e azoxistrobina.
- As subpopulações de *A. ricini*, do estado da Paraíba apresentam baixa variabilidade entre si, detectada por marcadores dominantes RAPD.
- O fluxo gênico estimado entre as subpopulações de *A. ricini* é suficiente para impedir a divergência entre as populações

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfonso, C.R.; Raposo, R.E.; Melgarejo, P.** (2000), Genetic diversity in *Botrytis cinerea* populations on vegetable crops in greenhouses in south-eastern Spain, *Plant Pathology*, v.49, p.243–251.
- Avila-Adame, C.; Köller, W.** (2003a), Characterization of spontaneous mutants of *Magnaporthe grisea* expressing stable resistance to the Qo-inhibiting fungicide azoxystrobin, *Current Genetics*, v.42, p.332-338.
- Avila-Adame, C.; Köller, W.** (2003b), Insertional mutagenesis of *Magnaporthe grisea* toward decreased responsiveness of alternative respiration to inhibition by azoxystrobin, *Journal of General Plant Pathology*, v.69, p.126-130.
- Baayen, R.P.; O'donnell, K.; Bonants, P.J.M.; Cigelnik, E.; Kroon, L.P.N.M.; Roebroek, E.J.A.; Waalwijk, C.** (2000), Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease, *Phytopathology*, v.90, p.891-900.
- Bock, C.H.; Thrall, P.H.; Brubaker, C.L.; Burdon, J.J.** (2002), Detection of genetic variation in *Alternaria brassicicola* using AFLP fingerprinting, *Mycological Research*, v.106, Apr, p.428-434.
- Bubici, G.; Amenduni, M.; Colella, C.; D'amico, M.; Cirulli, M.** (2006), Efficacy of acibenzolar-S-methyl and two strobilurins, azoxystrobin and trifloxystrobin, for the control of corky root of tomato and verticillium wilt of eggplant, *Crop Protection*, v.25, p.814-820.
- Cartaxo, W.V.; Beltrão, N.E.M.; Silva, O.R.F.; Severino, L.S.; Suassuna, N.D. ; Soares, J.J.** (2004), O cultivo da mamona no semi-árido brasileiro, Circular Técnica 77. Campina Grande, p.20

- Chin, K.M.; Wirz, M.; Laird, D.** (2001), Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* from banana to trifloxystrobin, *Plant Disease*, v.85, p.1264-1270.
- Colauto, N. B.; Dias, E. S.; Gimenes, M. A.; Eira, A. F.** (2002), Genetic characterization of isolates of the basidiomycete *Agaricus bazei* by RAPD, *Brazilian Journal of Microbiology* v. 33 p. 131-133.
- Cooke, D.E.L.; Lees, A.K.** (2004), Markers, old and new, for examining *Phytophthora infestans* diversity, *Plant Pathology*, v.53, p.692-704.
- Edginton, L. V.; Khew, K. L.; Barron, G. L.** (1971), Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds, *Phytopatology* v 61 p 42-44.
- Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D.** (1998), Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética, Brasília: EMBRAPA. 220 p.
- Fungaro, M.H.P.** (2000), PCR na micologia. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v.3, n.14, p.12-16.
- Garrido, L.R.; Sonego, O.R.** (2005), Podridão cinzenta da uva: Epidemiologia sintomatologia e controle. EMBRAPA Uva e vinho 59. Bento Gonçalves, p.8. (Circular técnica)
- Godfrey, G.H.** (1923), Gray mold of castor bean, *Journal of Agriculture Research*, v.13, n.9, p.679-715.
- Gonçalves, R.D.** (1936), O Mofo cinzento da mamoneira, *O Biológico*, v.11, p.232-235.
- Hammond-Kosack, K.; Jones, J.D.G.** (2000), Responses to plant pathogens
In (Buchanan, B.; Gruissem, W.; Jones, R. eds) p 1102-1156
- Hennebert, G.L.** (1973), Botrytis and Botrytis-like genera, *Persoonia*, v.7,

p.183-204.

Holcomb, G.E.; Jones, J.P.; Wells, D.W. (1989), Blight of prostrate spurge and cultivated poinsettia caused by *Amphobotrys ricini*. *Plant Disease*, v.73, n.1, Jan, p.74-75.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 10 julho 2006.

Ishii, H. (2004), Studies on fungicide resistance in phytopathogenic fungi, *Journal of General Plant Pathology*, v.70, p.379-381.

Judelson, H.S.; Senthil, G. (2006), A Investigating the role of ABC transporters in multifungicide insensitivity in *Phytophthora infestans*, *Molecular Plant Pathology*, v.7, p.17-29.

Kimura, M. R.; Souza, P. E.; Castro, H. A. (2001), Sensibilidade *in vitro* de *Botrytis cinerea* a fungicidas. *Ciênc. Agrotec. Lavras* v 25 n 5 p1150-1160.

Korff, M. V.; Udupa, S. M.; Yahyaoui, A.; Baum, M. (2004), Genetic variation among *Rhynchosporium secalis* populations of West Asia and North Africa as revealed by RAPD and AFLP analysis, *Journal of Phytopathology* v.152 p. 106.

Leroux, P.; Fritz, R.; Debieu, D.; Albertini, C.; Lanen, C.; Bach, J.; Gredt, M.; Chapeland, F. (2002), Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pesticide Management Sciences* v. 58 p. 876–888.

Leisova, L.; Minarikova, V.; Kucera, L.; Ovesna, J. (2005), Genetic Diversity of *Pyrenophora teres* Isolates as Detected by AFLP Analysis *Journal of Phytopathology* v. 153 p. 569

- Lima, E.F.; Araújo, A.E. ; Batista, F.A.S.** (2001), Doenças e seu Controle. In: *O Agronegócio da Mamona no Brasil*. (Azevedo, D.M.P. e Lima, E.F. ed.) Brasília: Embrapa, Doenças e seu Controle, p.191-212
- Lima, E.F.; Soares, J.J.** (1990), Resistência de cultivares de mamoneira ao mofo cinzento causado por *Botrytis ricini*, *Fitopatologia Brasileira*, v.15, n.1, p.96-97.
- Lopes, R.; Lopes, M.T.G.; Figueira, A.V.D.O.; Camargo, L.E.A.; Fungaro, M.H.P.; Carneiro, M.C.; Vieira, M.L.C.** (2002), Marcadores Moleculares Dominantes (RAPD e AFLP). *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n.29, p.56-60.
- Massola Jr., N.S.; Bendendo, I.P.** (1997), Doenças da mamoneira. In: *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. (KIMATI, H., AMORIM, L., et al ed.) São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, Doenças da mamoneira, p.497-500.
- McDonald, B.A.; Linde, C.** (2002), The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance, *Euphytica*, v.124, p.163-180.
- McDonald, B.A.; Zhan, J.; Burdon, J.J.** (1999), Genetic structure of *Rhynchosporium secalis* in Australia. *Phytopathology*, v.89, p.639-645.
- Medeiros, R. B.; Ferreira, M. A. S. V.; Dianese, J. C.** (2003), Mecanismos de agressão e defesa nas interações planta-patógeno; Editora universidade de Brasília, Brasília
- Milani, M.; Nóbrega, M.B.M.; Suassuna, N.D. ; Coutinho, W.M.** (2005), Resistência da Mamoneira (*Ricinus communis* L.) ao Mofo Cinzento Causado por *Amphobotrys ricini*, Embrapa Algodão. Documentos 137. Campina Grande, p.22

Miller, P. M. (1955), V-8 juice agar as general-purpose medium for fungi and bacteria. *Phytopatology* v. 45 p 461-462.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO.
AGROFIT 2006: sistema de informação. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006. <http://www.agricultura.gov.br/>

Moyano, C.; Alfonso, C.; Gallego, J.; Raposo, R.E.; Melgarejo, P. (2003), Comparison of RAPD and AFLP marker analysis as means to study the genetic structure of *Botrytis cinerea* populations, *European Journal of Plant Pathology*, v.109, p.515-522.

Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, v.70, n.12, p.3321-3323.

Nei, M. (1987) Molecular evolutionary Genetics. New York USA Columbia University Press.

Núñez, Y.; Gallego, J.; Ponz, F.; Raposo, R. (2006), Analysis of population of *Erysiphe necator* using AFLP markers, *Plant Pathology*, v. 55, p 650-656.

Omar, I.; O'neill, T.M. ; Rossall, S. (2006), Biological control of fusarium crown and root rot of tomato with antagonistic bacteria and integrated control when combined with the fungicide carbendazim, *Plant Pathology*, v.55, p.92-99.

Paplomatas, E. J.; Pappas, A. C.; Antoniadis,D. (2004), A Relationship among fungicide-resistant phenotypes of *Botrytis cinerea* based on RAPD analysis, *Journal of Phytopathology* v. 152 p. 503

Reis, E.M; Forcelin, C.A; Reis, A.C. (2001), Classificação dos fungicidas In

Manual de fungicidas. (MOURA, N.R. ed) Florianópolis: Insular cap 5, p 25-52.

Reis, A.; Ribeiro, F.H.S. ; Mizubuti, E.S.G. (2006), Caracterização de isolados de *Phytophthora infestans* do Distrito Federal e de Goiás, *Fitopatologia Brasileira*, v.31, p.270-276.

Sacchet, A.M.O.F. (1999), *Genética para que te quero?*, Porto Alegre-RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 285 p.

Santos, R.F.; Barros, M.A.L.; Marques, F.M.; Firmino, P.T. ; Requião, L.E.G. (2001), Análise econômica. In: *O agronegócio da mamona no Brasil*. (Azevedo, D.M.P. e Lima, E.F. ed.) Campina Grande: Embrapa, Análise econômica, p.17-35

Sierotzki, H.; Wullschleger, J. ; Gisi, U. (2000), Point mutation in cytochrome *b* gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* field isolates. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v.68, p.107-112.

Silva-Mann, R.; Salgado, K.C.C.; Vieira, M.G.G.C. ; Machado, J.C. (2002), Variabilidade genética de isolados do complexo *Colletotrichum* associados a sementes de algodoeiro, por meio de técnicas moleculares e inoculação em plantas. *Fitopatologia Brasileira*, v.27, p.27-32.

Tooley, P.W.; Goley, E.D.; Carras, M.M. ; O'neill, N.R. (2002), AFLP comparisons among *Claviceps africana* isolates from the United States, Mexico, Africa, Australia, India, and Japan. *Plant Disease*, v.86, p.1247-1252.

Van Der Lee, T.; De Witte, I.; Drenth, A.; Alfonso, C. ; Govers, F. (1997), AFLP Linkage Map of the Oomycete *Phytophthora infestans*. *Fungal Genetics and Biology*, v.21, p.278–291.

- Van Der Vlugt-Bergmans, C.J.B.; Brandwagt, B.F.; Van't Klooster, J.W.; Wagemakers, C.A.M.; Van Kan, J.A.L.;** (1993), Genetic variation and segregation of DNA polymorphisms in *Botrytis cinerea*, *Mycological Research*, v. **97**, p1193–200.
- Vidal, M. S.; Suassuna, N. D.; Bezera, C. S.; Menesses, C. H. S. G.** (2005), Seleção de marcadores do tipo RAPD para caracterização genética de *Amphobotrys ricini* EMBRAPA Algodão. Campina Grande, 5 p. (Circular técnica 85)
- Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; Lee, T.V.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M. ; Zabeau, M.** (1995), AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research*, v.23, n.21, p.4407-4414.
- Weising, K.; Nybom, H.; Wolf, K.; Meyer, W.** (1995), DNA fingerprinting in plants and fungi. Boca Raton, CRC Press,
- Weslh, J.; Mcclelland, M.** (1990), Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, *Nucleic Acids Research* v18 p 7213-7218.0
- Whitney, N.G. ; Taber, R.A.** (1986), First report of *Amphobotrys ricini* infecting *Caperonia palustris* in the United States, *Plant Disease*, v.70, n.9, p.892.
- Williams, J. G. K.; Kubelic, A.R.; Livak, K. J.; Rafalski, J.A.** (1990), DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Research* v18 p 6531-6535
- Wong, F.P. ; Wilcox, W.F.** (2000), Distribution of baseline sensitivities to azoxistrobin among isolates of *Plasmopara viticola*. *Plant Disease*, v.84, n.3, p.275-281.
- Wright, S.** (1951), The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, v 15, p 395-420

Zucchi, M. I. (2002) Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR. Tese de doutorado Escola superior de agricultura Luiz de Queiroz Piracicaba 130 p