

## CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *Fusarium graminearum* SCHWABE ATRAVÉS DE TÉCNICAS MOLECULARES

### GENETICAL CHARACTERIZATION OF *Fusarium graminearum* SCHWABE THROUGH MOLECULAR TECHNIQUES

Mirian Fernandes Brancão<sup>1\*</sup>; Valmor João Bianchi<sup>2</sup>; Cândida R.J. de Farias<sup>3</sup>; Juliano dos Santos<sup>4</sup>; Edegar Antonio Rossetto<sup>5</sup>

#### RESUMO

A simplicidade de uso, rapidez, segurança e amplitude dos resultados vêm consolidando cada vez mais a adoção de marcadores moleculares no diagnóstico e determinação da diversidade genética de fitopatógenos. Tal tecnologia permite acessar a informação genética a nível molecular (DNA) com maior agilidade nas avaliações no que diz respeito à variabilidade genética, uma vez que a influência do ambiente muitas vezes dificulta as análises baseadas em caracteres morfológicos. Neste trabalho foram avaliados 20 isolados de *Fusarium graminearum* provenientes de diferentes locais do Rio Grande do Sul (RS) Brasil, tendo como objetivo caracterizar geneticamente tais isolados, através de marcadores moleculares. Foram utilizadas duas técnicas moleculares RAPD e SCAR e a combinação destas. Na técnica de RAPD, os 12 *primers* usados geraram 174 produtos amplificados (bandas), com o número de perfis produzidos pelos oligonucleotídeos variando de 11 (AC17) até 18 (AF11), com média de 14,5 perfis por *primer*. Desses 102 foram polimórficos (58,62% do total). Considerando todos os isolados, a similaridade genética foi superior a 76%, porém, os marcadores utilizados foram eficientes em diferenciar os isolados em dois grupos distintos.

Palavras-chave: fungos, marcadores moleculares, DNA.

#### ABSTRACT

The simplicity, speed, reliability and amplitude of the results have ensured the use of molecular marker techniques for diagnosis and genetic diversity determination of phytopathogens. This technology allows the assessment of genetic information at the molecular level (DNA), without the environmental influences frequently seen in morphological analyses. This study aimed to evaluate the genetic variability of 20 *Fusarium graminearum* isolates from different Rio Grande do Sul-Brazil regions, by means of molecular markers. The RAPD, SCAR and a combination of these techniques were used. With 12 RAPD *primers*, 174 electrophoretic profiles were generated, being 102 polymorphic (58.62%). The profile number ranged from 11 (AC17) to 18 (AF11) with an average of 14.5 profiles per *primer*. The genetic similarity was higher than 76%, considering all the isolates, but the molecular markers were efficient to differentiate the isolates in two distinct groups.

Key words: fungus, molecular markers, DNA.

#### INTRODUÇÃO

Diferentes espécies de *Fusarium* são importantes patógenos em quase todos os cereais cultivados, sendo responsáveis pela significativa redução no rendimento, além de suas micotoxinas causarem sérios problemas para a saúde animal e humana.

<sup>1</sup> Eng<sup>a</sup> Agr<sup>a</sup> Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade DFS/FAEM/UFPel, bolsista CAPES. Endereço Rua Peru, nº255, bairro América, Rio Grande-RS, e-mail [mbrancao@gmail.com](mailto:mbrancao@gmail.com)

<sup>2</sup> Professor Dr. do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal - UFPel.

<sup>3</sup> Eng<sup>a</sup> Agr<sup>a</sup> Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade DFS/FAEM/UFPel.

<sup>4</sup> Biólogo Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade DFS/FAEM/UFPel.

<sup>5</sup> Professor Dr. do Programa de Pós-graduação em Fitossanidade DFS/FAEM/UFPel.

(Recebido para publicação em 02/06/2007 aprovado em 03/12/2008)

R. Bras. Agrociência. Pelotas, v.14, n.3-4, p.67-76, jul-set, 2008

O desenvolvimento de genótipos resistentes ou tolerantes é a estratégia preferida de controle. Para isso o conhecimento sobre a variabilidade genética e a estrutura populacional dos patógenos que ocorrem naturalmente é indispensável (SHARAN et al., 2007).

A caracterização morfológica, embora útil, é bastante limitada devido ao baixo número de caracteres passíveis de serem analisados (FUNGARO, 2000). Marcadores morfológicos, como pigmentação, textura, forma marginal e velocidade de crescimento da colônia, produção de estruturas típicas, presença ou ausência de zonas concêntricas (BURGESS et al., 1995; URBEN & OLIVEIRA, 1999) têm se mostrado instáveis e dependentes da composição do meio utilizado, condições de incubação e da própria variabilidade do patógeno. Portanto, revertendo-se de caráter subjetivo, principalmente na caracterização de colônias atípicas podendo conduzir a erros de interpretação e até mesmo falhas quanto à identificação das espécies.

A grande versatilidade aliada a rapidez, a sensibilidade, a segurança, a facilidade de execução, e a amplitude dos resultados, reveste as técnicas moleculares numa ferramenta com grande aplicabilidade nas mais variadas áreas biológicas, consolidando cada vez mais a adoção de marcadores moleculares no diagnóstico e determinação da diversidade genética de fitopatógenos.

Atributos inerentes a esta técnica foram confirmados por VIEIRA (1996), quando utilizados na distinção de isolados de *Colletotrichum gossypii* South e de *Colletotrichum gossypii* (South) var. *cephalosporioides* obtidos de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). Outros fitopatógenos também têm sido estudados quanto à variabilidade genética, como por exemplo, *Fusarium graminearum* (QUELLET & SEIFERT, 1993; BUSSO et al., 2007), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder & Hansen (ANDRADE et al., 1997), *Fusarium moniliforme* Sheldon (CAMARGO et al., 1997), *Botryodiplodia theobromae* Pat. (LIMA et al., 1997), *Myrothecium roridum* Tode ex. Fr. (MACHADO et al., 1997) e *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque (VÉRAS et al., 1997), além de algumas espécies de bactérias (HALFELD-VIEIRA, 1998).

O fato das técnicas de marcadores moleculares possibilitarem o acesso a informação genética ao nível de DNA, permite uma maior agilidade nas avaliações no que diz respeito à variabilidade genética, uma vez que a influência ambiental muitas vezes dificulta as avaliações baseadas em caracteres morfológicos, conforme relatado por BRANCÃO (2007), onde caracterizou através da utilização de atributos morfológicos isolados de *Fusarium graminearum* SCHWABE.

Para tanto, dentro desse contexto, o objetivo deste trabalho consistiu em caracterizar molecularmente uma coleção de isolados de *F. graminearum* obtidos de diferentes localidades tritícolas do estado do Rio Grande do Sul.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido nos laboratórios de Patologia de Sementes da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel e de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de Botânica, no Instituto de Biologia, pertencentes à Universidade Federal de Pelotas.

Das sementes e grãos trazidos do campo foi obtidos um número variável de isolados de *F. graminearum*, os quais foram conservados em tubos de ensaio contendo BDA comercial (Batata Dextrose Agar), sob refrigeração (4-6 °C) e quando necessário foram realizadas repicagens para manutenção da viabilidade dos isolados.

A partir da coleção foram avaliados 20 isolados de *F. graminearum* provenientes de diferentes locais (Tabela 1), escolhidos através de sorteio.

A extração de DNA dos patógenos foi baseada no protocolo realizado por FALEIRO et al. (2004) com algumas modificações, sendo utilizado o micélio fresco coletado de duas placas de Petri, contendo meio de cultura BDA, as quais foram incubadas sob fotoperíodo alternado de 12 horas de luz e 12 horas de escuro à temperatura de 22 °C ± 3 °C durante 10 dias.

**Tabela 1-** Isolados de *Fusarium graminearum* utilizados no estudo de caracterização genético-molecular. Pelotas-RS, 2006.

identificação	Município de coleta	Cultivar
62	Chapada	BRS 194
64	Entre Ijuis	Onix
72	Palmeira das Missões	BRS 179
73	Condor	BRS 194
77	Cruzaltinha	Onix
79	Alto Uruguai	BRS 179
84	Tapejara	BRS 179
87	Machadinho	Rubi
88	Getúlio Vargas	Rubi
90	Cruz Alta	EMBRAPA 40
93	Carazinho	BRS 177
96	Quatro Irmãos	BRS Louro
97	Pontão	BRS Tarumã
98	Santa Bárbara	BRS Cambota
99	Ronda Alta	BRS Guatambu
100	Mato Castelhano	BRS Camboim
102	Não me Toque	BRS Figueira
103	Lagoa Vermelha	BRS Canela
104	Stº Ant. Planal	BRS Guabiju
105	Passo Fundo	BRS Timbauva

O micélio foi macerado com nitrogênio líquido em cadinho de porcelana e colocado em microtubos de 2 mL, sendo a cada um adicionado 1000 µL de tampão de extração (CTAB 2% + 0,5% β-mercaptoetanol). A mistura foi homogeneizada e colocada em banho-maria por 30 minutos, sendo agitada a cada 7 minutos e, logo após foi adicionado 400 µL de Fenol: clorofórmio: álcool iso-amílico (25:24:1). Em seguida, as amostras foram agitadas, através de suaves inversões (50 a 60 vezes) e centrifugadas a 10.000 rpm por 8 minutos. Uma alíquota de 700 µL do sobrenadante foi transferida para outro tubo ao qual adicionou-se 700 µL de clorofórmio: álcool iso-amílico (CIA – 24:1) e mantido sob agitação por 5 minutos. A seguir foi centrifugado a 10.000 rpm por 8 minutos sendo, posteriormente, coletados 500 µL do sobrenadante ao qual foi adicionado 400 µL de isopropanol gelado. Após duas horas em geladeira, procedeu-se outra centrifugação a 10.000 rpm por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 100 µL de etanol absoluto por 10 minutos. Após algumas horas secando, em temperatura ambiente, foi adicionado 50 µL de tampão TE+RNase na concentração de 10 µg mL<sup>-1</sup>, deixando-se por 24 horas em geladeira.

O produto da extração foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% e quantificado através da comparação da intensidade das bandas com o padrão de DNA do Fago Lambda digerido com a enzima *Hind* III (0,5 µg µL<sup>-1</sup>), ficando estabelecida uma concentração final de DNA de 10 ng µL<sup>-1</sup>, para uso nas reações de PCR (Polymerase Chain Reaction).

Para checar a acurácia das reações de PCR no que diz respeito à repetibilidade, foram realizadas duas extrações independentes de DNA e duas repetições de cada reação de PCR. As reações de amplificação foram realizadas em tubos de 0,2 mL contendo 2,5 µL de Tampão 10X (10mM Tris-HCl pH 9,5, 50 mM KCl); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de cada dNTPs; 0,2 µM de cada *primer*; 1 Unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen); 20 ng de DNA genômico e água MilliQ esterilizada q.s.p. 25 µL.

Os *primers* ou oligonucleotídeos iniciadores foram obtidos da INVITROGEN e passaram inicialmente por um *screening* nos genótipos visando a identificação daqueles que apresentavam um maior número de polimorfismos. Desses, foram utilizados cinco *primers* SCAR (Sequence Characterized Amplification Region) específicos para detecção de *F.*

*graminearum* e outros 12 primers RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), além da combinação de primers SCAR + RAPD (Quadro 1).

Para realizar as reações de PCR foi utilizado um termociclador modelo PTC-100 (MJ Research,

Inc.), cujo perfil térmico de amplificação foi: 2 minutos 94 °C (1 ciclo), 1 minuto 92 °C, 2 minutos 72 °C e um ciclo final de 8 minutos 72 °C; apresentando diferenças na temperatura de anelamento, conforme apresentado no Quadro 1.

**Quadro 1-** Sequência de primers de RAPD, SCAR e combinações RAPD/SCAR usados na caracterização genética de *F. graminearum*. Pelotas-RS, 2006.

Primer	Seqüência (5'→3')	Descrição	Tempo e Temperatura de anelamento
OPT01	GGG CCA CTC A	RAPD	1min36°C
OPT16	GGT GGA CGC T		
OPU17	ACC TGG GGA G		
OPW01	CTC AGT GTC C		
OPW02	ACC CCG CCA A		
AC04	ACG GGA CCT G	RAPD	1 min 38°C
AC17	CCT GGA GCT T		
AC20	ACG GAA GTG G		
AD16	AAC GGG CGT C		
AF11	ACT GGG CCT C		
AF12	GAC GCA GCT T		
AF13	CCG AGG TGA C		
TOX 5-1 (F)	GCT GCT CAT CAC TTT GCT CAG	SCAR	1 min 55°C
TOX 5-2 (R)	CTG ATC TGG TCA CGC TCA TC		
Gao A-v2 (R)	AGG GAC AAT AAG TGC AGA		
Gao A-v2 (R)	AGG GAC AAT AAG TGC AGA	SCAR	1 min 40°C
+	+		
OPT16	GGT GGA CGC T		
Gao A-v2 (R)	AGG GAC AAT AAG TGC AGA		
+	+		
OPU17	ACC TGG GGA G		
Gao A-v2 (R)	AGG GAC AAT AAG TGC AGA	SCAR	1 min 40°C
+	+		
AC07	GTG GCC GAT G		

Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 1,5%, com 3 µL de uma solução de

R. Bras. Agrociência. Pelotas, v.14, n.3-4, p.67-76, jul-set, 2008

brometo de etídio de 5 µg mL<sup>-1</sup> e submetidos a uma corrida eletroforética em cuba horizontal, por um tempo

aproximado de 60 minutos, e a uma voltagem de 5 V  $\text{cm}^{-1}$ . Dos produtos da reação de PCR foi aplicado no gel 15  $\mu\text{L}$  com tampão contendo azul de bromofenol e para o controle do tamanho dos alelos amplificados utilizou-se um marcador de massa DNA Ladder 100bp.

Após a eletroforese os géis foram expostos à luz UV para a visualização e registro dos resultados da amplificação, sendo as imagens captadas com sistema de fotodocumentação modelo E-BOX-100 – marca Vilber Lourmat.

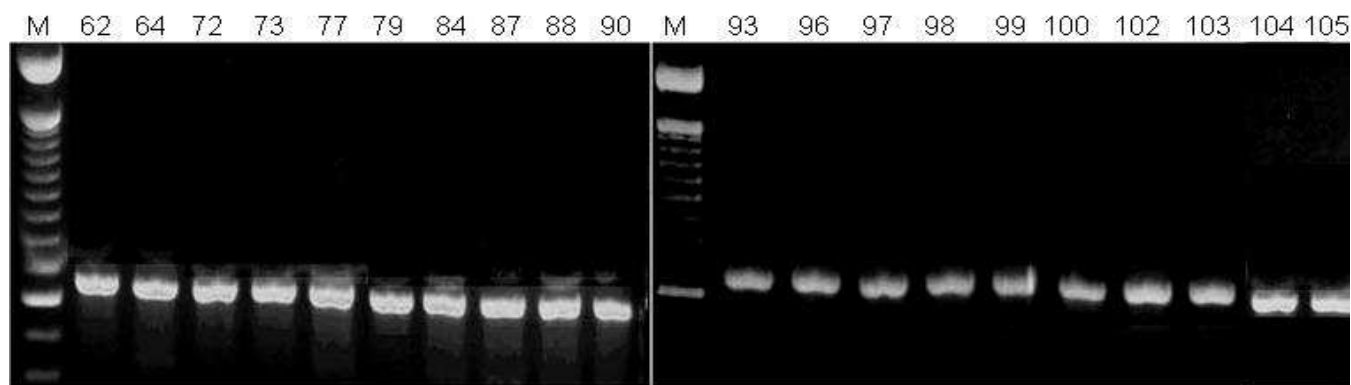
A partir dos dados obtidos dos perfis eletroforéticos gerou-se uma planilha de dados binários (0 para a ausência e 1 para a presença da banda) com os produtos da amplificação gerados com cada *primer*. Para análise só foram consideradas as bandas constantes e que se repetiram nas duas reações de PCR.

A análise de similaridade entre os diferentes genótipos foi efetuada empregando-se o coeficiente Dice (Nei & Li, 1979) ( $GS_{(ij)} = 2a / 2a + b + c$ , em que a = número de bandas polimórficas compartilhadas entre isolados, b = número de bandas polimórficas presentes no isolado i, c = número de bandas polimórficas presentes no isolado j). Com base na matriz de similaridade, a análise de agrupamento foi realizada

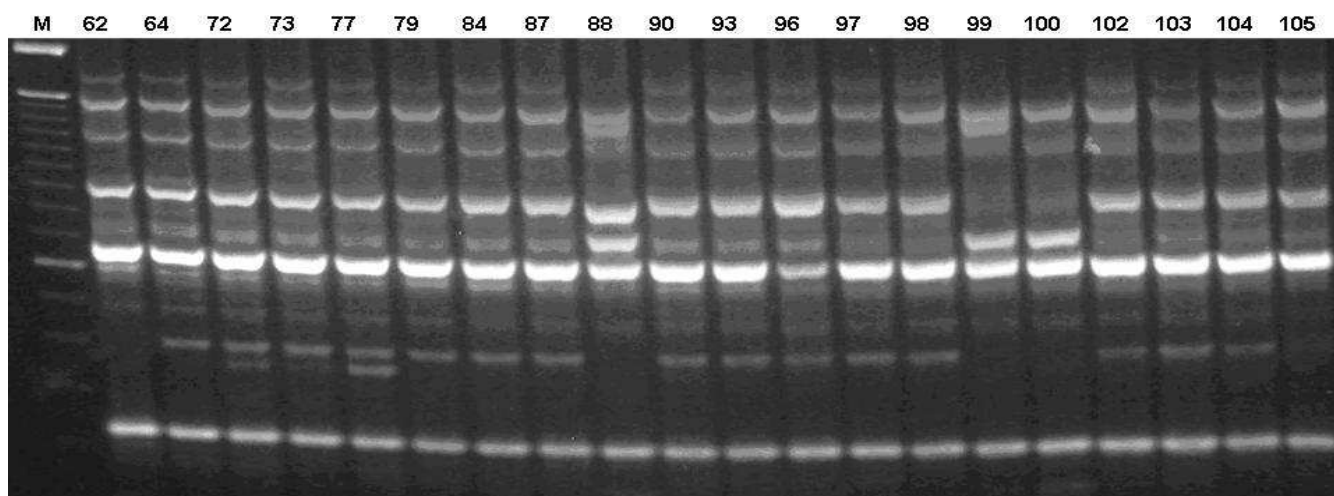
pelo método das distâncias genéticas médias (UPGMA – Unweighted Pair-Group Method With Arithmetic Means) para posterior elaboração do dendrograma com auxílio do software NTSYSpc versão 2.1 (Rohlf, 2000).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, utilizando *primers* do tipo SCAR (Tox 5-1 e Tox 5-2), foi possível confirmar que os 20 isolados analisados eram de *Fusarium*. Tais *primers* permitem amplificar a região genômica do fungo, denominada *Tri-5*, que está relacionada à produção da toxina trichothecene (KIMURA et al., 2007). A grande vantagem no uso da técnica SCAR é a maior reprodutibilidade dos resultados, uma vez que usa *primers* mais longos e são específicos para um dado loco, comparados aqueles utilizados na técnica RAPD. Na figura 1, é possível verificar que o produto da PCR foi uma banda monomórfica de aproximadamente 690 pares de bases, nos 20 isolados estudados. Por outro lado, quando *primers* RAPD foram associados ao *primer* Scar Gao-A-v2 foi possível obter alta reprodutibilidade da técnica, além de consistente polimorfismo (Figura 2).



**FIGURA 1-** Padrão de amplificação de isolados de *F. graminearum*, obtido com os *primers* SCAR Tox 5-1 e Tox 5-2. M= Marcador DNA Ladder 100pb. Pelotas-RS, 2006.



**FIGURA 2-** Perfil eletroforético de isolados de *F. graminearum*, obtido com a combinação dos *primers* OPAC7 + GAO-A-V2 (RAPD + SCAR). M = marcador DNA Ladder 100 pb; 62 a 105 isolados descritos na tabela 01. Pelotas, 2006.

Os 12 *primers* RAPD usados geraram 174 perfis amplificados, variando de 11 (AC17) até 18 (AF11), com média de 14,5 por *primer*. Desses, 102 foram polimórficos (58,62% do total) (Tabela 2), resultado que corrobora os relatos de COLOMBO et al.

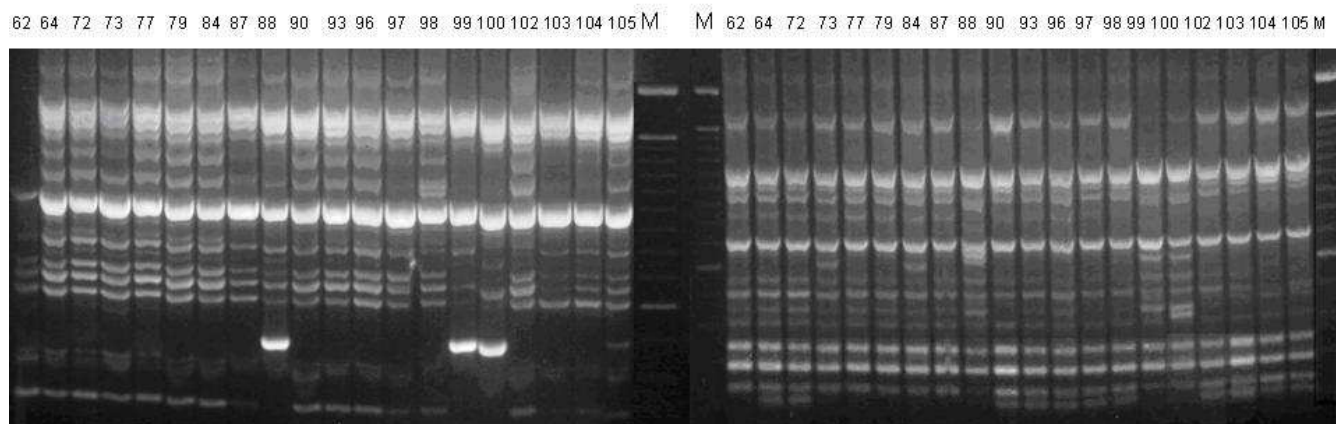
(1998), ou seja, 10 a 30 *primers*, gerando 50 a 100 bandas e/ou perfis polimórficos, são suficientes para estimar relações genéticas entre isolados e entre espécies.

**Tabela 2-** *Primers* RAPD utilizados e polimorfismos revelados em 20 isolados de *Fusarium graminearum*. Pelotas-RS, 2006.

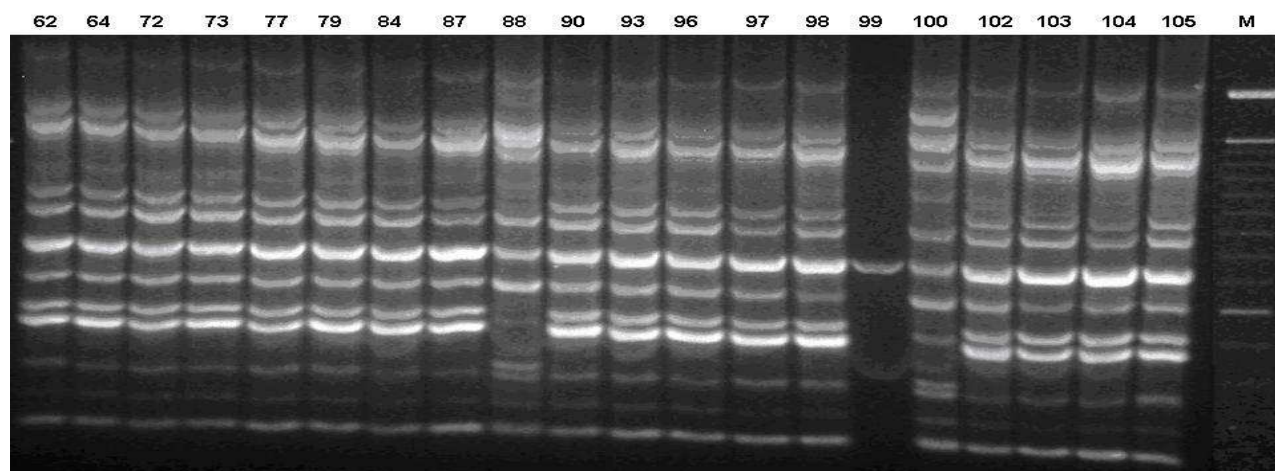
<i>Primer</i>	Seqüência (5'→3')	Bandas		
		Polimórficas	Monomórficas	Total de perfis
OPT01	GGG CCA CTC A	9	6	15
OPT16	GGT GGA CGC T	14	1	15
OPU17	ACC TGG GGA G	15	1	16
OPW01	CTC AGT GTC C	5	10	15
OPW02	ACC CCG CCA A	3	10	13
AC04	ACG GGA CCT G	9	8	17
AC17	CCT GGA GCT T	8	3	11
AC20	ACG GAA GTG G	9	4	13
AD16	AAC GGG CGT C	7	5	12
AF11	ACT GGG CCT C	7	11	18
AF12	GAC GCA GCT T	6	7	13
AF13	CCG AGG TGA C	10	6	16
Total		102	72	174
Média		8,5	6,0	14,5
%		58,62	41,38	100

A técnica RAPD foi um método viável e detectou significativo número de polimorfismos nos isolados analisados (Figuras 3 e 4). Comparado aos resultados obtidos com os primers SCAR, a diferença no número de bandas e polimorfismos produzidos por

primer RAPD são devido ao comprimento e sequência dos mesmos, por serem aleatórias e mais curtas, facilitam a interação *primer-DNA template* (WEIR et al., 1997).



**FIGURA 3-** Perfis eletroforéticos de 20 isolados de *F. graminearum*, utilizando-se os primers RAPD OPU17 (esquerda) e OPAD16 (direita). M - marcador DNA Ladder 100pb; 62 a 105 isolados descritos na tabela 01. Pelotas, 2006.



**FIGURA 4-** Produtos da amplificação do DNA de 20 isolados de *F. graminearum*, com o primer OPT16 (RAPD). M - marcador DNA Ladder 100 pb; 62 a 105 isolados descritos na tabela 01. Pelotas, 2006.

Com os dados moleculares obtidos no presente trabalho foi possível diferenciar os 20 isolados de *Fusarium* em dois grupos distintos (Figura 5). No grupo I, verificou-se a existência de quatro sub-grupos, sendo que o isolado 62 demonstrou maior distância genética em relação aos demais, não agrupando especificamente com nem um outro isolado. A similaridade genética estimada entre os

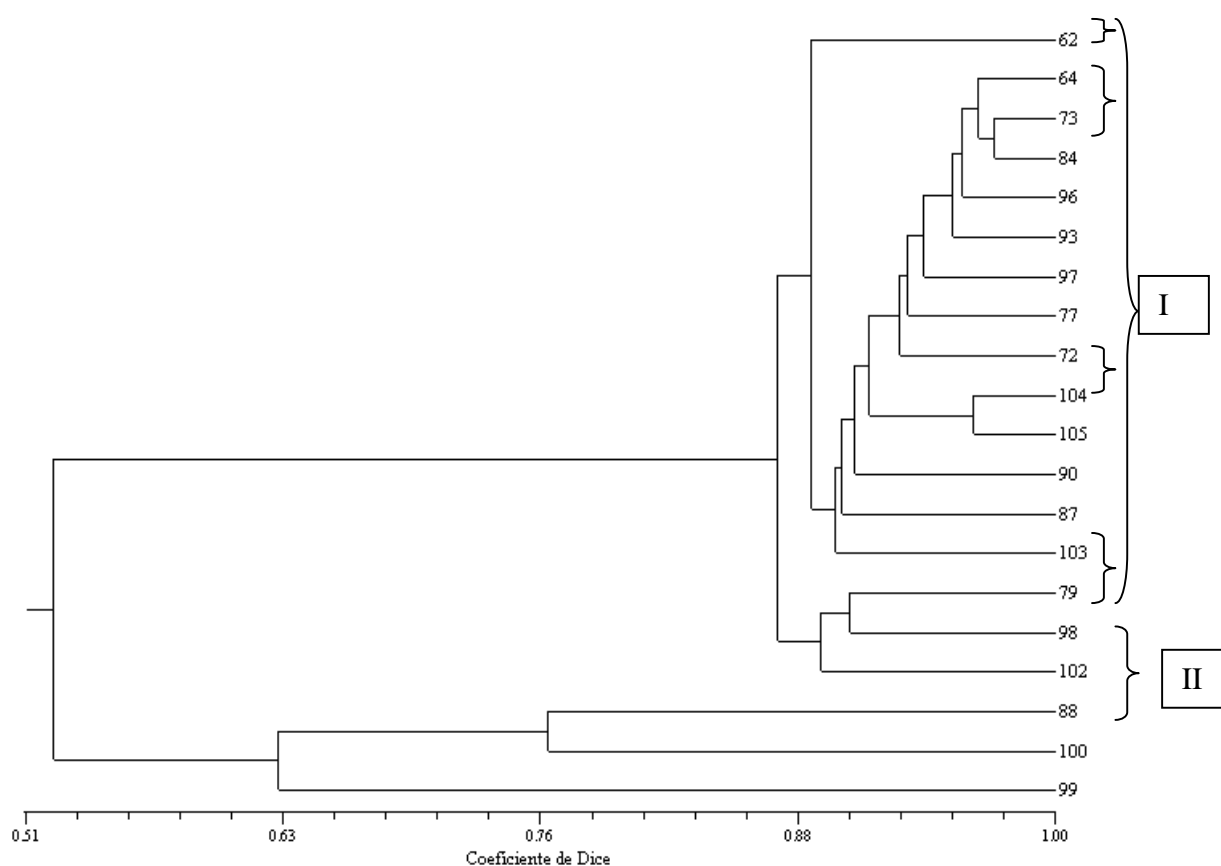
isolados do grupo I foi superior a 80%, sendo observada uma tendência de maior similaridade entre isolados proveniente de locais de coleta mais próximos. Essa tendência também foi registrada entre os isolados provenientes de Getulio Vargas (88) e Mato Castelhana (100), 77% de similaridade, e destes em relação ao isolado de Ronda Alta (99), 62% de similaridade. Entre o grupo I e o II houve um

coeficiente de similaridade média de 52%. O maior coeficiente de similaridade (97%) foi registrado entre os isolados provenientes de Condor (73) e o de Tapejara (84).

Independente da técnica utilizada, os isolados 88, 99 e 100 sempre apresentaram padrões eletroforéticos diferenciados em relação aos demais, fato que justifica a forma de agrupamento obtida.

Dada a importância das diferentes espécies de *Fusarium* na produção de cereais, estudos de

caracterização molecular vêm sendo conduzidos desde longa data. QUELLET & SEIFERT (1993) verificaram que a combinação de RAPD e PCR permitiram obter um padrão de diferenciação para 17 isolados de *F. graminearum*. Mais recentemente, SAHARAN et al. (2007), também utilizando marcadores RAPD, conseguiram diferenciar 15 isolados de *F. graminearum* em quatro grupos e estimar a similaridade genética, que variou entre 14,92 e 91,38%.



**FIGURA 5-** Dendrograma de similaridade de 20 isolados de *F. graminearum*, obtido por meio do método UPGMA. Pelotas-RS, 2006.

BUSSO et al. (2007) caracterizaram nove isolados de *F. graminearum* através de marcadores RAPD e da compatibilidade vegetativa. A similaridade genética estimada foi superior a 76% sugerindo tratar-se de isolados de origem clonal. Os 20 isolados *Fusarium* analisados no presente trabalho foram avaliados quanto as suas características morfológicas

e apresentaram alta similaridade (BRANCÃO, 2007), porém quando avaliados com técnicas moleculares ficou clara a separação dos isolados em dois grupos distintos, demonstrando também a existência de uma considerável variabilidade entre os isolados de diferentes regiões do Rio Grande do Sul. Essa variação genotípica revelada em isolados de *Fusarium*



é um indicativo da habilidade de adaptação do fungo a diferentes condições no seu ciclo de vida, condicionado pelas variações do clima e pelas práticas culturais adotadas pelos agricultores. Sendo assim, o conhecimento da variabilidade genética entre isolados de diferentes regiões geográficas permite traçar estratégias mais adequadas de controle, seja através do uso de fungicidas, rotação de cultivares ou no desenvolvimento de genótipos resistentes ou mais tolerantes a este fungo.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram que o polimorfismo produzido pelos marcadores RAPD pode ser empregado na identificação genótipos de *F. graminearum*, bem como para acessar a variação genética dentro de coleções e populações.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, D.E.G.T.; ASSIS, T.C.; MICHEREFF, S.J. et al. Variabilidade isoenzimática entre isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* de uma área de plantio de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, p.243, 1997.
- BRANÇÃO, M. F. **Caracterização e micotoxidade de *Fusarium graminearum* Schwabe em sementes de trigo no Rio Grande do Sul**. Pelotas, 2007. 110f. : il. Tese (Doutorado em Fitossanidade) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. – Pelotas, 2007.
- BURGESS, T.; MALAJCZUK, N.; DELL, B. Variation in *Pisolithus* and basidiospore morphology, culture characteristics and analysis of polypeptides using 1D SDS-PAGE. **Mycological Research**, Amsteden, v.99, p.1-13, 1995.
- BUSSO, C.; KANESHIMA, E.N.; FRANDO, F. de A.; QUEROL, C.B.; CASTRO-PRADO, M.A.A. de. Vegetative compatibility and molecular characterization of *Fusarium graminearum* isolates from the State of Paraná, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 6, p. 1813-1816, 2007.
- CAMARGO, T.V.; MENEZES, M.; ASSIS, T.C. Caracterização de isolados de *Fusarium moniliforme* através da análise eletroforética em gel de poliacrilamida. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, p.254, 1997.
- COLOMBO, S.P.; MA, L.; CAUWENBERG, J. et al. Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **European Molecular Biology Organization**, Heidelberg, v.17, p.3326–3341, 1998.
- FALEIRO, F. G.; NIELLA, G. R.; CERQUEIRA, A. R. Mycelial production of *Crinipellis perniciosa* on four culture media for DNA extraction. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n.3, p.312-315. 2004.
- FUNGARO, M.H.P. PCR na micologia. **Biociência - Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 3, n. 14, p. 12-16, 2000.
- HALFELD-VIEIRA, B.A.; SOUZA, R.M.; FIGUEIRA, A.R.; ILARRÁZ, E.S. Eficiência da técnica de PCR na detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e sua variante *fuscans*. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 31, Fortaleza, Ceará, 1998. **Resumos...** Brasília: **Fitopatologia Brasileira**, Suplemento, v. 23, p. 217-218, 1998.
- KIMURA, M.; TOKAI, T.; TAKAHASHI-ANDO, N.; OHSATO, S.; FUJIMURA, M. Molecular, and genetics studies of *Fusarium* Thichothecene biosynthesis: pathways, genes and evolution. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo. 71, n. 9, p. 2105-2123, 2007.
- LIMA, J.A.S.; MARTINS, L.S.S.; TAVARES, S.C.C. Caracterização isoenzimática de quinze isolados de *Botryodiplodia theobromae* Pat. provenientes de diferentes hospedeiros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, p.322, 1997.
- MACHADO, M.C.V.; MACHADO, A.L.M.; MENEZES, M. Patogenicidade e caracterização isoenzimática de isolados de *Myrothecium roridum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, p.302, 1997.
- NEI, M.; LI, W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceeding of National Academy Science**. USA. n.76, p. 5269-5273, 1979.
- QUELLET, T.; SEIFERT, K.A.. Genetic characterization of *Fusarium graminearum* strains using RAPD and

PCR amplification. **Genetics**, São Diego, v. 83, n. 9, p. 1003-1007, 1993.

ROHLF, F. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**: version 2.10. New York: [s.n.], 2000.

SAHARAN, M.S.; NAEF, A.; KUMAR, J.; TIWARI, R. Characterization of variability among isolates of *Fusarium graminearum* associated with head scab of wheat using RAPD markers. **Current Science**, Bangalore, v. 92, n. 2, p.230-235, 2007.

URBEN, A.F.; OLIVEIRA, A.S. Caracterização morfológica em diferentes isolados de *Fusarium moniliforme* infectando sementes transgênicas de milho procedentes dos Estados Unidos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.24, p.339, 1999.

VÉRAS, S.M. de; GASPAROTTO, L.; MENEZES, M. Avaliação isoenzimática de *Colletotrichum guaranicola*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, p.323, 1997.

VIEIRA, M.G.G.C. **Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro**. Lavras, 1996. 114 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras. 1996.

WEIR, B.J., ST-PIERRE, R.G., CHIBBAR, R.N. RAPD marker polymorphism among saskatoon cultivars, clones, and seedlings. **HortScience**, Alexandria, v.32, n.6, p.1109–1113, 1997.